

令和3年度修士論文

南極湖沼での微生物群集の多様化と変遷に関する
研究

総合研究大学院大学 複合科学研究科 極域科学専攻

学籍番号 20191652

小山 寛

主任指導教員：工藤 栄 教授

指導教員：内田 雅己 准教授

2021年9月24日

研究概要

南極大陸は過酷な気候条件により多くの生物にとって生命活動を行う上で厳しい環境であることから、地球上で最も陸上環境の生物活性が低い地域の1つである (Chown *et al.* 2015). 南極大陸には数多くの湖沼が点在しており (Wand *et al.* 1997; Kimura *et al.* 2010), 湖沼内は、陸上環境よりも比較的安定した環境である (Vincent *et al.* 2004). 年間を通じて凍結を免れる湖沼底には、シアノバクテリアなどの細菌や藻類、コケを中心とした湖底マットが確認されており、湖沼によって湖底マットの色や形態などの特徴が異なることが知られている。しかし、湖底マット中の生物群集構造や、マットの多様性が生じる過程、その要因についてはほとんど知見がない。多様な湖底マットの成立過程を解明するためには、湖沼が成立したのち現在までにたどってきた地史や生物群集構造の変遷に関する研究が必要である。そこで本研究では、南極大陸沿岸部である昭和基地周辺の露岩域の湖沼環境における湖底マットにおける生物群集構造を解明し、湖沼間での多様性に違いがあるかを明らかにすること、露岩域や湖沼の変遷と湖底マットの生物群集構造との関係を解明し、現在の湖底マットの多様性がどのように成り立っているのか明らかにすることを目的とした。4つの氷河後退湖 (菩薩池, 如来池, 仏池, 長池) と1つの海址湖 (スカーレン大池) における湖底マット中の微細生物群集について、顕微鏡観察による細胞容積の定量、メタバーコーディング解析、窒素固定能の分析による生態学的機能の定量を組み合わせた多面的なアプローチで分析した。その結果、マット表層サンプルの細胞容積分析から、糸状性シアノバクテリアがコロニーを形成し優占する湖沼 (菩薩池, 如来池, 仏池), 珪藻類が優占する湖沼 (長池), 糸状性シアノバクテリアと糸状性緑藻類が優占する湖沼 (スカーレン大池) が確認され、湖底マット表層の光合成生物量は湖沼間で異なること (分散分析, $p < 0.05$), 光合成微生物群集構造は湖沼間で異なることが明らかになった (PERMANOVA, $p < 0.05$)。メタバーコーディング解析によって得られた細菌群集データからも、各湖沼は独自の群集構造を持つことが明らかになった (PERMANOVA, $p < 0.05$)。また、窒素固定能の分析からは、南極夏季に湖底マット中の微生物群集は窒素固定を行なっている可能性が長池を除く4湖沼で示された。堆積物コアサンプルの分析からは、深度ごとに出現する OTU が異なる傾向にあったことから、細菌群集構造の類似性は湖沼間よりも深度間で小さいことが示唆された。以上のことから、氷河後退湖の微細生物群集構造の変遷は、氷河作用によるゼロリセットからの生物蓄積であり、窒素固定能を持つシアノバクテリアが初期に貢献した可能性が推察された (Pessi *et al.* 2019)。海址湖の微細生物群集構造の変遷は、淡水化後、他の氷河後退湖と同様の変遷をたどったが、海成堆積物由来の栄養塩を利用できたことで生物活性が高くなった可能性が示唆された。長期的スケールでの細菌群集構造の変遷は湖沼の地史に影響を受け、短期的なスケールでの群集構造は湖底マット中の微環境や湖沼への栄養塩などの流出入といった物理化学的性質といった要因に影響を受けることが推測された。

目次

1	序論	3
1.1	南極大陸の陸上生態系	3
1.2	東南極, 昭和基地周辺露岩域の湖沼研究	4
1.3	目的	7
2	方法	10
2.1	調査地	10
2.2	サンプリング	11
2.3	湖底マット, 堆積物コアサンプルの分析	13
3	結果	22
3.1	湖底マット表層の微細藻類の生物量と細菌群集構造	22
3.2	湖底堆積物の物理化学的性質と生物学的性質	27
4	考察	30
4.1	各湖沼における湖底マット表層の光合成微生物群集構造と細菌群集構造	30
4.2	湖底マット表層における窒素固定能	31
4.3	湖沼の性質と湖底マット表層の群集構造との関係	32
4.4	湖底堆積物コアサンプルの細菌群集構造と湖沼の地史との関係	35
5	結論	39
6	謝辞	40
7	参考文献	41
8	図表	46

1 序論

1.1 南極大陸の陸上生態系

南極大陸は低温、少雨による乾燥や強紫外線、季節変動の激しい日射量といった過酷な条件により多くの生物にとって生命活動を行う上で厳しい環境であることから、地球上で最も陸上での生物多様性が低い地域の1つとなっている [1]。南極大陸は気候の特徴から、大きく南極半島地域と大陸性南極地域に区別される。比較的温暖な南極半島地域と比較して、大陸性南極地域は生命活動にとってより過酷な環境である。大陸性南極地域では、陸上生態系を構成する生物としては微生物が大部分を占めることが明らかになっている [1]。南極大陸陸上生態系の生物多様性が低く、生物相の主体が微生物であるのは、過酷な環境だけでなく、南極周極流を有する南大洋に周囲を囲まれ他の大陸と地理的、気候学的に隔離されており、周辺地域からの生物の分散、移入が困難なことも関係している [1]。

南極大陸の大部分は厚い氷床に覆われており、生命活動に必要な液体の水が利用できないため、陸上生物の分布は夏季に融雪し地表が露出する露岩域と呼ばれる地域に集中している。露岩域では、微生物を中心とする生物相が確認されている [3][4]。露岩域が占める面積は南極大陸の 0.18 % 程度の狭いエリアではあるが [2]、調査のためのアクセスの困難性などにより、陸上環境の生物相に関する研究例は多くないのが現状である [1]。

南極大陸の露岩域には、数多くの湖沼が存在している [5][6]。南極大陸の湖沼は、淡水湖～超塩湖、成層湖～季節性混合湖、通年覆氷湖～季節性融解湖といった様々な特性を持つことが知られている [1][6][9][17]。湖沼内は、低温、凍結、そして少雨による乾燥の影響が緩和されるため、陸上環境よりも比較的安定した環境である [7][9]。また、覆氷による凍結の生じない水深を持つ湖沼の底では、氷による攪乱が生じないため、

年間を通じた生命活動が可能となっている。凍結を免れる湖底環境では、シアノバクテリアなどの細菌や、藻類、コケを中心とした湖底マットが確認されている [8][23]。湖底マットや陸上環境の微生物群集は、光合成による一次生産や栄養塩循環、有機物分解といった生態学的に重要な役割を担っている。特に湖底では、年間を通じた生物活動が可能であることから、厚いマットが形成されており、それは南極大陸の陸上生態系において大きなバイオマスとなり、湖沼の成立から現在まで攪乱されることなく湖底に蓄積されていると考えられる [10][11]。故に、南極大陸における生物多様性や機能を解明するためには、南極陸上環境において大きなバイオマスを有する湖沼生態系に対する理解が重要である。

1.2 東南極，昭和基地周辺露岩域の湖沼研究

日本の南極観測の拠点となっている昭和基地の位置する東南極，リュツォホルム湾沿岸の宗谷海岸露岩域は、その景観から昭和オアシスとして知られる生物活動が認められる南極大陸上の地域の 1 つである。そこには、およそ 200 km² の範囲に 100 を超える湖沼が点在している [6][9]。日本の南極地域観測隊 (Japanese Antarctic Research Expedition, JARE) によって、昭和基地周辺露岩域における生態学的調査 [4][3][12][13][15]，陸水学的調査 [9][16]，地学的調査 [18][19][20] が行われ、水質や循環性、成立の起源の異なる湖沼があることが指摘されてきた。宗谷海岸に位置する露岩域は最終氷期以降、氷河後退に伴う表面露出と、荷重減少によるアイソスタティックな基盤の隆起によって形成されたことが知られている [18]。産出する二枚貝などの化石の年代測定や、岩石の表面露出年代の測定によって、宗谷海岸の露岩域の成立は 1 万～5 千年前であることが明らかになっており [18]，露岩域の成立とともに湖沼が成立したと考えられている。

露岩域に点在する湖沼は一般的に、植物プランクトンのバイオマスは極めて少なく、主要なバイオマスは

湖底マット中の生物相であることが知られている [9]。なぜならばこれらの湖沼は、氷河作用によって削られ、岩盤が露出した植生のほとんど見られない環境に囲まれていることと、大きな流域を持たないことから、集水域からの栄養塩供給が乏しく、貧栄養な水中環境であるためである [9]。一方で、湖底マットの間隙水中の栄養塩濃度は非常に高濃度であることが知られている [56]。

先行研究によって、湖沼ごとに湖底マットの形態や色、生物群集などが異なることが知られている [21]。例えば、宗谷海岸中央に位置するスカルプスネス露岩域に存在する長池などいくつかの湖沼の湖底では“コケボウズ”と呼ばれる、コケと微生物活動によって形成された円錐状に隆起した湖底マットが発見されている [22]。先行研究によって、コケボウズ中の微生物群集は構造中の環境に応じて異なることが知られており [23]、コケボウズ表面と内部とで微生物どうしが複雑に相互作用していると推測されている。コケボウズを構成するコケは、他の湖沼においても分布が確認されているが、円錐状の構造物、コケボウズ、を形成するのは一部の湖沼に限られることが知られている [13]。このように南極湖沼では、多様な湖底マットが確認されているが、その多様性が異なる要因についてはほとんど知見がない。多様性が異なる要因については、例えば、湖沼による光環境の違い [21] や栄養塩濃度の違い [56]、地理的種分散のしやすさ [58] の違いなどいくつかの先行研究が挙げられる。一方で、これまで湖沼が経た変遷や地理的履歴が現在の群集構造に影響しているはずであり [25]、多様性が異なる要因について理解するためには、多様な湖底マットが生じた成立過程を解明することも重要である。よって、湖沼が成立したのち現在までにたどってきた地史と微生物群集構造との関係に関する詳細な比較研究が必要となる [14]。

近年の分子生物学的手法の発展によって、群集網羅的な分析が簡便に実施できるようになってきた。どの生物も普遍的に持つ遺伝子配列を増幅するメタバーコーディング解析によって、培養・単離が困難な細菌

も含めた生物群集構造データを採集試料中から簡便に検出することが可能となってきた。微生物が主体である南極の陸上環境から得られたサンプルにもこれらの遺伝子解析が適用され、空間的に多様な群集構造を持つことが明らかになってきた [1]。しかしながら、宗谷海岸露岩域における多様な湖底マットの比較研究手法として分子生物学的手法が利用された研究はほとんどない。

露岩域に生息する生物は、最終氷期以前から南極大陸に生息している種、最終氷期以降に風などによって他の大陸から侵入した種、隆起によって海洋から取り残された種が知られる [1][32]。従って、湖沼の成立履歴の違いが、生物の定着過程や、現在見られる生物相となるまでの変遷過程に影響を及ぼし、その結果として湖沼ごとの湖底マットの違いを形成している可能性がある。例えば、多くの南極で見られる氷河後退後に融水を蓄えた湖沼のような、成立初期段階が貧栄養状態であった場合、窒素固定能力を有することで知られている *Nostoc* 属などのシアノバクテリアが、生物群集の定着に寄与した可能性が考えられる [30][31]。一方で、海を起源に持つ海址湖の場合、海底堆積物や海水中の栄養塩が生物活動を支える可能性もある。

湖沼の成立過程について解明するためには、湖底マットの直下に堆積している湖底堆積物に着目した研究が有効である。湖底堆積物は、湖沼やその集水域起源の様々な情報を蓄積しているからである [25]。昭和基地周辺露岩域に存在する湖沼の湖底堆積物コアの採取、分析はこれまでに複数回行なわれており、湖沼の成立過程や湖内環境の変遷過程について議論されてきた [19][20][24]。ここの研究から、このエリアの露岩域にある湖沼には、もともと氷床の下にあり削られた地表面(母岩)の窪地に融け水が溜まって成立した氷河後退湖や、もともと海面下にあった岩盤が氷床後退と基盤隆起による相対的な海面水準の低下によって成立した海址湖などがあることが明らかになっている。こうした地史的研究を踏まえると、氷河後退湖と海址湖とでは湖沼成立初期の生物相や栄養塩濃度に差異があり、生態系の変遷過程の違いに影響を

及ぼした可能性が考えられる。堆積物コアに残存する生物学的な証拠を分析することで、地史的研究に情報を付加することができ、湖底マットの生物多様性への理解にも繋げることが可能となる。堆積物コア中の生物学的な分析には、化石などの生物の遺骸や色素体、脂肪酸分析などが採用されてきたが [25]、近年堆積物中に残存する DNA を利用して生物群集構造の変遷に着目する研究例が増加傾向にある [26][27][28]。しかしながら、宗谷海岸露岩域の湖沼における湖底堆積物にこれらの分子生物学的手法を適用した研究例はほとんどない [20]。

1.3 目的

序論にて述べてきたように、湖底マット中の生物群集は大陸性南極地域において主要なバイオマスであり、湖沼間や湖沼内における空間的な不均質性が大きいことが明らかになっている [1][9]。その一方で、湖底マット中の生物群集の定量的評価や、生物群集構造と湖沼の性質との関連性に関する研究は少ない。また、湖沼の成立や変遷過程を解明する研究のためにこれまでに用いられたコアサンプルは、湖沼成立初期の情報を含む基盤まで到達していないことが問題となっていた。そこで、湖沼の成立年代や、地史、生物群集構造を分析するための湖底堆積物掘削プロジェクトが菅沼ら (2018) によって実施された [29]。得られたコアサンプルの年代測定の結果、湖沼群の成立年代は氷河後退による露岩域の成立とほぼ同時期である 1 万～5 千年前であることが推定されている (川又ら, 未発表データ)。

以上の背景を踏まえて本研究の目的を以下の 2 点とした。

- 湖底マットにおける生物群集構造を解明し、湖沼間での多様性に違いがあるかを明らかにする
- 露岩域や湖沼の変遷と湖底マットの生物群集構造との関係を解明し、現在の湖底マットの多様性がどのように成り立っているのか明らかにする

本研究では、南極大陸陸上生態系の中でも特に生物量が豊富である湖底マットのなかで、栄養塩循環に関わる細菌群集と、一次生産を担う光合成微生物に着目して研究に取り組んだ。ひとつめの目的を達成するために、宗谷海岸露岩域の湖沼底の湖底マット表層における光合成微生物の生物量や、細菌群集構造、窒素固定能について調査した。ふたつめの目的を達成するために、湖底堆積物掘削プロジェクト [29] によって得られたコアサンプルの複数の深度、つまり複数の堆積年代における細菌群集構造を調査した。本研究では、東南極、宗谷海岸露岩域に点在する 5 湖沼を研究調査対象とした。表層サンプルでは、顕微鏡観察による光合成微生物の種同定や細胞容積の分析、次世代シーケンサーによる細菌群集解析を実施した。サンプル中の微生物の生態学的機能について調査するために窒素固定能を分析した。

南極大陸をはじめとした極域では、地球温暖化といった気候変動の影響が他地域よりも顕著に現れることが報告されており、極域温暖化増幅と表現される [33]。南極半島や西南極と比較すると、東南極では温暖化の程度は現状小さいが [34]、温暖化による影響を受け始めていると考えられる。露岩域の湖沼環境は、温暖化や、温暖化による地域的な気候の変化により、水収支や溶存酸素濃度といった物理化学的環境が変化し、微生物による生産速度や群集構造への影響が及ぶ可能性がある [35]。本研究における湖底マット表層の詳細な生物群集の分析や、堆積物コア中の過去から現在に至る長期間の生物群集の分析によって、気候変動に対する生物群集の応答への理解に繋げたい。

また、南極域では、現在他地域からの生物の自然な分散、移入を上回る速度で、人為的な外来種の増加が問題となっている [1]。南極大陸の陸上生態系には地球規模で確認されている普遍種が生息する一方で、南極固有種、さらには地域固有種が、予測されていたよりも豊富であることが明らかになってきた [1][36]。適切な保全活動や保護区域の設定の為に、微生物群集の分布状況に対する詳細な把握が重要である。本研

究における湖底マット中の微生物群集や湖沼ごとの独自性の評価によって、南極陸上生態系の保全活動への貢献が期待される。

2 方法

本研究は、序章にて示したように、2つの目的を有する。目的1; 湖底マットにおける生物群集構造を解明し、湖沼間での多様性に違いがあるかを明らかにする、目的2; 露岩域や湖沼の変遷と湖底マットの生物群集構造との関係を解明し、現在の湖底マットの多様性がどのように成り立っているのか明らかにする、ことに取り組むためにそれぞれ表1の項目で分析を行なった。目的1と目的2では主に対象とするサンプルが異なる。目的1では、湖底堆積物の表層; 湖底マットをサンプルとして分析に供した。目的2では、過去から現在に至る湖沼生態系の変遷を解明するために、湖底マットとともに湖底堆積物コアサンプルをサンプルとして分析に供した。目的2では、地球化学的分析については、表1に灰色の網掛けで示したように共同研究者が実施したため、分析方法について本論文では詳述しない。

2.1 調査地

本研究は、東南極、宗谷海岸に位置する異なる氷河後退露岩域であり、昭和基地の南方約50 kmに位置するスカルプスネス露岩域(69°28'S, 39°36'E)と昭和基地の南方約70 kmに位置するスカーレン露岩域(69°40'S, 39°25'E)における5つの湖沼を選定し、サンプリングを実施した(図1)。研究対象としたのは、スカルプスネス露岩域に位置する氷河後退湖である如来池、仏池、菩薩池、長池と、スカーレン露岩域に位置する海址湖である[19][20]スカーレン大池である(図1)。これらの5湖沼はいずれも現在の水質は塩分5 ppt未満の淡水湖である。また、これらの5湖沼はいずれも冬季は最大2 m厚程度の氷や雪に覆われるが、夏季は融水し、一部または全面湖面が露出する。結氷した湖面の融解の規模や期間は年によって異なる。全ての湖沼底には厚いマット状の微生物群集が存在し、水棲コケの分布が認められている。菩薩池、如来池、仏池、長池には顕著なコケボウズ構造の発達も認められている。各湖沼の標高、最大水深、面積、地学的分類を表2にまとめた。

調査地であるスカルブスネス露岩域、スカーレン露岩域では無人気象計が設置されており、気温、全天日射量、風向風速、湿度がモニタリング観測されている。モニタリングデータを利用し、スカルブスネス露岩域のきざはし浜とスカーレン露岩域での 2017 年から 2018 年における気温の変化と全天日射量の変化を図 2 にまとめた (Kudoh *et al.* 2020 PDJ)。また、同期間における各地点の月別の風配図を図 3 にまとめた。2017 年から 2018 年におけるスカルブスネス露岩域における年平均気温は -9.5°C 、スカーレン露岩域における年平均気温は -9.2°C であった。図 2 より、気温、全天日射量ともに白夜季・極夜季問わずスカルブスネス露岩域、スカーレン露岩域で同様の変化を経ていることが分かる。夏季である 11 月頃から 2 月頃の気温が 0°C を上回る傾向にあった。図 3 より、スカルブスネス露岩域では主に東北東の風が、続いて西南西の風が卓越していた。スカーレン露岩域では、東南東の風が卓越していた。両露岩域ともに、内陸からの風が卓越する傾向にあったが、スカルブスネス露岩域の方が風速が速い傾向にあることが示唆された。

2.2 サンプリング

2.2.1 湖底マット表層サンプルの採取

サンプリングは 2018 年 12 月から 2019 年 1 月にかけて日本南極地域観測第 60 次隊によって実施された。微生物マットは、湖水による攪乱の影響を受けないと考えられる水深 2-4 m においてゴムボート上からエクマンバージ採泥器によって採取された (図 4)。サンプルは湖底微生物マットの表層 1 - 3 cm から得た。サンプル採取は各湖沼につき、氷に覆われていないかつ湖底マットが観察できたポイント 5 か所において行なった ($n = 5 \text{ lakes} \times 5 \text{ sites}$)。採取した微生物マットは直ちに細胞容積分析用、窒素固定能分析用、遺伝子解析用のサブサンプルに分別し、分析まで -20°C にて冷凍保存した。また、サンプル採取時に多項目水質計によって各湖沼の各水深における水温、塩分、溶存酸素 (DO)、濁度を測定した。ただし、センサーの不調により、水深データが得られなかった。なお、本セクションにおけるサンプリング、コアサン

ルの処理は共同研究者によって実施された。

2.2.2 湖底堆積物コアサンプルの採取，地球物理化学的性質の測定

湖底堆積物の柱状サンプリングは 2017 年 12 月に日本南極地域観測第 59 次隊による湖底堆積物掘削プロジェクトとして実施された [29]。サンプリングは，湖沼水面が凍結している初夏に実施され，各湖沼の湖盆の直上の氷上からパーカッションコアラを用いてコアが採取された (図 5)。本掘削プロジェクトでは，湖沼堆積物の最底部である氷河性堆積物層の下の基盤へ到達するサンプル採取を目的としてサンプリングが行われた。得られた堆積物コアのうち，如来池，仏池，長池，スカーレン大池のサンプルを本研究に用いた。なお，菩薩池については，粗粒堆積物に阻まれ，基盤までのコア採取が不可能であったことから [29]，本研究の分析に供していない。採取したコアサンプルについては，直ちに全長を測定し，輸送のために数センチメートルに分割したのち，分析まで -20°C にて冷凍保存した。測定した全長を記載長とした [29]。冷凍コアサンプルは，高知大学，海洋コア総合研究センターにて垂直方向に切断したのち，各コアサンプル断面の軟 X 線写真撮影，コア記載を実施したのち，1 cm 厚毎に切断し半円形のスライスを作成した。各スライスについて，図 6 に従ってさらに分割し，物理化学的性質，生物学的性質の分析に供した。物理化学的性質の評価のために，深度の異なるいくつかのスライスを選定し，粒度分析 (砂，シルト，粘土に分画)，磁化率， γ 線透過率による密度，含水率，生物起源ケイ酸塩の分析，加速器質量分析による ^{14}C 放射年代測定を行った。磁化率は氷河性堆積物の指標として， γ 線透過率による密度は堆積物の密度の指標として，生物起源ケイ酸塩の分析は海成堆積物の指標として利用することを目的として実施した。生物学的性質の評価のために，放射年代測定を実施した深度と同等の深度のスライスを 6 - 8 深度からピックアップし，メタバーコーディング解析による細菌群集構造の分析に供した。コアの最上部，つまり表層についてはコアラによるサンプリングの性質上，層状構造の攪乱が生じた可能性が考えられたため，5 cm 以深のサンプルを分析に供した。また，コアを運搬，冷凍した際にコアの収縮が生じたため，採取時のコア全長よりも分析時の

コア長は短くなっていた。そのため、分析に供したスライスの id と収縮率、記載長を用いて、サンプリング時の位置 (真の深度) に校正した。各湖沼堆積物コアサンプルにおけるスライス id, 校正した深度, 年代測定結果を表 3 に示した。なお, 本セクションにおけるサンプリング, コアサンプルの処理, 物理化学的性質の分析は共同研究者によって実施された。

2.3 湖底マット, 堆積物コアサンプルの分析

2.3.1 強熱減量の測定

本分析は湖底マット表層サンプルのみを対象に実施した。強熱減量は乾燥サンプルに含まれる有機物など強熱による揮発性物質の割合を示す。分析前に微生物マットサンプルを 4°C の冷蔵庫にて 24 時間解凍した。実験に用いる磁性るつぼを全て精密天秤にて秤量し記録した。微生物マット生サンプル約 5 g を精密天秤にてるつぼごと秤量したのち磁性るつぼに移し, 105°C に設定したオーブンにて質量の変化がなくなるまで 4 時間以上加熱し, 完全に乾燥させた。オーブンから取り出して放冷し, るつぼごと秤量した。るつぼの重量を差し引いたサンプルの重量を用いて以下の式 (1) にて乾土係数を算出した。

$$\text{乾土係数} = \text{生サンプル重量 (g)} / \text{乾燥サンプル重量 (g)} \quad (1)$$

乾燥サンプルをさらに 550°C に設定したオーブンにて 4 時間燃焼させた。オーブンから取り出して放冷し, るつぼごと秤量した。るつぼの重量を差し引いたサンプルの重量を用いて以下の式 (2) にて強熱減量を算出した。

$$\text{強熱減量 (\%)} = (\text{乾燥サンプル重量 (g)} - \text{強熱後のサンプル重量 (g)}) / \text{乾燥サンプル重量 (g)} \times 100 \quad (2)$$

測定した強熱減量を基に, サンプリング地点または湖沼ごとの平均値, 標準偏差, 標準誤差, 変動係数を算出した。変動係数は以下の式 (3) によって求められ, 平均値に対するデータのばらつきの比率を示す。また

各湖沼によって強熱減量が異なるかどうか、Tukey Kramer 検定による多重比較を実施した (95% 信頼区間). 統計処理は R Ver.4.0.2[37] 上で行い, データ可視化には R, “ggplot2” パッケージ [38] を用いた.

$$\text{変動係数} = \text{標準偏差} / \text{平均値} \quad (3)$$

2.3.2 細胞容積の分析

本分析は微生物マット中のシアノバクテリアや微細藻類の細胞容積を計測するために実施した. また, 湖底マット表層サンプルのみを分析に供した. 1 g の乾燥サンプル中に占める細胞容積を算出するために顕微鏡観察下で光合成生物を各分類群に識別し, 細胞容積を計算した. Pushkareva ら (2017)[40] の方法を改変し, 以下のように分析を実施した.

まず分析前に微生物マットサンプルを 4°C の冷蔵庫にて 24 時間解凍した. 解凍したサンプル 1 g をビーカーに量り取り, 4 mL の蒸留水を加えたのち, サンプルが十分にほぐれるよう混合しサンプル希釈液を作成した. ピペットマンを用いて希釈液 20 μL をスライドグラスに分注し, カバーグラス (22 mm \times 22 mm) を被せてプレパラートを作成した. 光学顕微鏡・蛍光顕微鏡 (OLYMPUS, Japan) の倍率を 400 倍に設定し (接眼レンズ, 10 倍; 対物レンズ, 40 倍), カバーグラスの x 軸方向の直線 (1 ラインあたりの面積; 22 mm \times 0.58 mm = 12.65 mm²) に沿って観察し, 視野に出現する全光合成微生物の種類の記事と細胞数のカウント, 細胞サイズの測定を実施した. なお, シアノバクテリアについては緑色励起光によってフィコビリタンパク質由来の自家蛍光が知られているため, 蛍光顕微鏡のもとで観察した. 出現細胞の総数が 200 を超えるまでラインに沿った観察を続け, 観察に要したライン数, 分類群ごとの細胞数と細胞のサイズを記録した.

次に分類の方法，細胞サイズの測定方法について述べる．シアノバクテリアの分類については，細胞の形態学的特徴によって以下の3つのグループに分類し，さらに門～属レベルでの同定を行なった．

- 単細胞性シアノバクテリア
- 糸状性シアノバクテリア
- 異質細胞形成シアノバクテリア

真核生物である珪藻類や球状の緑藻類，糸状緑藻類，黄緑藻類といった微細藻類の分類については，形態学的特徴によって以下の4つのグループに分類し，さらに門～属レベルでの同定を行なった．

- 珪藻類
- 緑藻類
- 接合藻類
- 黄緑藻類

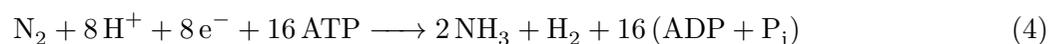
細胞サイズの測定は，顕微鏡に接続された PC 上で cellSens ソフトウェア (OLYMPUS, Japan) を用いて実施した．細胞サイズの測定については，各細胞の長径と短径をそれぞれ記録し，細胞ごとに形状を楕円，球，半球を付した円柱といった立体に近似し，各細胞の体積の計算を行なった．体積計算のための立体への近似には Hillebrand ら (1999)[39] を参考にした．

記録したライン数，細胞数，細胞の体積と，1 ラインの面積 (ラインの長さ × 顕微鏡視野の幅 = 12.65 mm²)，希釈率 (5 倍)，前セクションで求めた各サンプルの乾土係数を用いて乾燥サンプル 1 g における各分類群の占める細胞容積を算出した．この作業を各サンプルで 3 回繰り返して平均，標準誤差を計算し

た。また各湖沼によって細胞容積の合計が異なるかどうか、Tukey Kramer 検定による多重比較を実施した (95% 信頼区間)。統計処理は R Ver.4.0.2[37] 上で行い、グラフ化には R, “ggplot2” パッケージ [38] を用いた。

2.3.3 窒素固定能の分析

本分析は湖底マット表層サンプルのみを対象に実施した。湖底において窒素固定は、一部のシアノバクテリアなど細菌類の産生する細胞外酵素であるニトロゲナーゼによって水中の分子状窒素が還元されアンモニアになることによって生じる。還元過程は以下の化学式 (4) によって表される。



窒素固定能は Stewart ら (1967)[41] によるアセチレン-エチレン還元法によるニトロゲナーゼ活性の分析を改変し実施した。アセチレン還元法における還元過程は以下の化学式 (5) によって表される。



化学式 (4), (5) より、理論的には窒素 1 分子を還元する電子と ATP でアセチレン 3 分子が還元されることがわかる。

分析前に微生物マットサンプルを 4°C の冷蔵庫にて 24 時間解凍した。サンプル 50 g を秤量しガラス瓶に移したのち、ラバーストッパーにより密閉した。シリンジによって 5 mL のアセチレンガスをガラス瓶に注入し、ただちに 7°C・明条件に設定したインキュベータに移動した。アセチレンガス注入後 0 min と 1 日ごとにシリンジにてガラス瓶腔の 5 mL のガスをヒューレットパッカー 5890 ガスクロマトグラフィー (Hewlett Packard, USA) に移し、ガス中に含まれるエチレンガスを定量した。分析値と乾土係数を用いて

各サンプルのニトロゲナーゼ活性を乾燥サンプル 1 g において 1 日に産生するエチレン量 (nmol) として表した。その後化学式 (4), (5) より, 乾燥サンプル 1 g において 1 日に固定する窒素量 (nmol) として再計算した。この作業を各サンプルで 3 回繰り返して平均, 標準誤差を計算した。また, 湖底マットの密度を 1 g cm^{-3} と近似し, 各湖沼における 1 日・単位面積あたりの窒素固定量を算出した。また各湖沼によってニトロゲナーゼ活性が異なるかどうか, Tukey Kramer 検定による多重比較を実施した (95% 信頼区間)。統計処理は R Ver.4.0.2[37] 上で行い, グラフ化には R, “ggplot2” パッケージ [38] を用いた。

2.3.4 細菌群集構造の解析

サンプル中の細菌群集構造を解析するために, 細菌に系統的に普遍的な配列である 16S rRNA 遺伝子をターゲットにしたメタバーコーディング解析を実施した。16S rRNA アンプリコンシーケンシングとも呼ばれる。なお本分析は, 湖底マット表層サンプル, コアサンプルともに実施した。まず, 分析前に微生物マットサンプルを 4°C の冷蔵庫にて 24 時間解凍した。FastDNA SPIN Kit for Soil(MP-Biomedicals, USA) を用いて各サンプルから DNA を抽出した。この抽出作業を, 湖底マット表層サンプルについては各サンプルで 1 回 ($n = 25$), 湖底堆積物コアサンプルについては各サンプルで 3 回 ($n = 78$) 繰り返した。

16S rRNA アンプリコンシーケンシングにおいて細菌由来の 16S rRNA 遺伝子の V3 - V4 領域を増幅するためにプライマーセットとして 341F, 805R を選定した [42]。このプライマーセットは, 昭和基地周辺露岩域における先行研究において適用された例がある [3]。DNA 抽出液にプライマーセット, 酵素 (DNA ポリメラーゼ) を添加し, ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR; Polymerase Chain Reaction) によってプライマーが挟む領域の DNA を増幅した。各 DNA 抽出液に対して PCR を 3 回反復で実施した。DNA ポリメラーゼとして KAPA Hifi HS ReadyMix (Illumina, USA) を使用した。ターゲットにした領域が増幅しているかを確認するために, PCR 産物を染色し, 電気泳動によって 1 kbp 程度の位置にバンドが生じているかど

うか分析した。電気泳動の結果、全てのサンプルについて、対象領域の DNA 増幅が確認されたため、3 回反復の PCR 産物を混合し、次の操作に供した。PCR 産物に含まれる DNA 以外の不純物を AMPure XP (Beckman coulter, USA) を用いて取り除き、精製した。精製物に対し、各サンプルに固有の Index 配列を精製物中の DNA に付加するために、Nextera XT Index Kit v2 (Illumina, USA) を用いて Index PCR を実施した。Index PCR 産物を再度 AMPure XP によって精製し、精製液中の DNA 濃度を Qubit dsDNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, USA) を用いて分光定量した。測定した DNA 濃度をもとに、各サンプルの DNA 濃度を純水による希釈によって統一したのち、全サンプルを混合し、次世代シーケンサー解析用ライブラリーとした。ライブラリーを MiSeq Reagent Kit v3 (Illumina, USA) の操作手順に沿って調整し、Miseq (Illumina, USA) を用いてシーケンスを行ない、各サンプルに含まれる塩基配列情報 (シーケンスリード、クオリティスコア) を得た。Miseq では、以下のようにシーケンスが行なわれる [43]。まず設置されたフローセル上においてライブラリー中に含まれる DNA 断片が増幅、クラスターを形成する。蛍光識別による 5' 末端側と 3' 末端側からの 2 方向のペアエンドシーケンスによって、クオリティスコアとともに DNA 断片の塩基配列がひとつのシーケンスリードとして得られる。その後、次々とクラスターが形成され、それぞれシーケンスリードとクオリティスコアが得られる。コンピューター上で、Index 配列に基づき、シーケンスリード、クオリティスコアを各サンプル中に含まれる塩基配列情報として識別、選別される。

シーケンスリードのトリミングツールである trimmomatic Ver. 0.36[44] を利用して、全塩基配列情報のうち、リードのクオリティスコアが 20 未満の塩基と、塩基数が 30 塩基に満たないショートリードを除去し、続くデータ処理に供した。トリミングした後のシーケンスリードの処理は、遺伝子解析用ソフトウェアである Mothur Ver. 1.144.3[45] にて、湖底マット表層サンプルと湖底堆積物コアサンプルについて同

時に実施した。Mothur 内にて、フォワードリードとリバースリードを結合した結果 (湖底マット, n = 25; 堆積物コア, n = 78), 合計 8,303,355 reads が得られた。続いて, 曖昧な塩基 (N) を含むシーケンスリードを除去した (7,107,484 reads)。フォワード側, リバース側における各プライマーの配列と一致しない配列を持つリードを除去したのち (2,146,806 reads), 同一配列をマージした (1,088,397 reads)。連続塩基数を 6 まで許容し, 塩基数 300 - 500 bp のシーケンスリードを抽出した (970,563 reads)。16S rRNA 遺伝子データベースである SILVA Ver.138[46] を基にマッピングを行ない, 16S rRNA 遺伝子をコードしているリードを取り出した (823,067 reads)。1 塩基までの違いを許容し, シーケンスリードのクラスタリングを実施した (464,940 reads)。全サンプル中で 1 回しか出現しなかったリードをノイズとして除去した (57,439 reads)。PCR 増幅反応で生じたと考えられるエラー配列であるキメラリードの除去を行なった (47,930 reads)。このプロセスには UCHIME アルゴリズムを用いた [47]。その後, 各リードについて, データベース SILVA Ver.138[46] を用いて, 系統分類学的な割り当てを行なった。最後に, シーケンスリードを 97% 相同性でクラスタリングし, OTU (Operational Taxonomic Unit) を作成した (9,171 OTUs)。なお, 細菌の DNA をターゲットにしたプライマーセットを実験に用いたため, アーキア, 色素体, ミトコンドリアと分類された OTU を群集データから除去し, 細菌由来の OTU のみの群集データを得た (8,899 OTUs)。

2.3.5 統計解析

データの整形, 統計解析, 可視化は, プログラミング言語 R Ver.4.0.2[37] 上で行なった。データの可視化には, R, “ggplot2” パッケージ [38] を用いた。各サンプルで得られたシーケンスリード数の違いが各サンプルにおける OTU 数 (種の豊富さ) の違いに及ぼす影響を比較するために, R, “ranacapa” パッケージ [48] を用いて, 希薄化曲線を描いた (図 7)。図 7 では, 各サンプルの群集データにおいて, シーケンスリード数を変化させてデータの抽出を行なうことにより, どのように OTU 数が増加していくかを表して

いる。図 7 より、サンプルによってシーケンスリード数が異なり、希薄化曲線の傾きの最小値にも差が見られた。つまり、シーケンスによるサンプリング努力の違いが、各サンプルにおける OTU のカバー率 (サンプルに含まれる全 OTU 数のうち、どの程度の OTU がシーケンスされたか) に影響を及ぼしていることが明らかになった。そのため、得られた群集データをそのままサンプル間の比較に用いることは、収集率の異なるデータを用いることとなり、バイアスがかかると考えた。そこで、シーケンスによるサンプル間のバイアスを除去するために Rarefaction 処理を行ない、再度希薄化曲線を描いた (図 8)。Rarefaction 処理は Chao & Jost (2012) による、希薄化曲線を描いたときの種のカバー率 (傾きの最小値) を全サンプルで統一し、群集データを希釈する方法を採用した [52] Rarefaction の手法として、古くから用いられているリード数が最小のサンプルに合わせた方法が知られているが、希薄化曲線を描いたときの種のカバー率をもとに Rarefaction する方法の方がより正確にサンプル間の多様性を比較できると報告されている [52]。図 7、図 8 を比較すると、Rarefaction 処理によって、各サンプルにおけるシーケンスリード数の増加に伴う希薄化曲線の傾きの変化の程度 (傾きの最小値) がサンプル間で同様になったことが分かる。希薄化したデータを基に、続く解析を行なった。

主要な OTU の相対存在比を表すために R, “phyloseq” パッケージ [49] により、各サンプルにおいてシーケンスリード数の 2 % 以上を占める、門レベルの分類群の群集データを抽出し、積み上げ棒グラフを作成した。また、シアノバクテリア OTU を抽出し、主要な相対存在比を表すために同様の積み上げ棒グラフを作成した。各サンプルにおける α 多様性 (種の豊富さ, 種の均等度), サンプル間の多様性の指標である β 多様性を, R, “vegan” パッケージ [50] を用いて算出した。 α 多様性 (種の豊富さ) では, Observed OTUs (観測された OTU 数), chao1 指数, ACE 指数を算出した。 α 多様性 (種の均等度) では, Shannon 指数, Simpson 指数, Inversive Simpson 指数を算出した。 β 多様性では, サンプル間の群集構造の違いを

距離で表すために、Bray-Curtis 非類似度に基づく距離行列を算出した。サンプル間の類似度を求める前処理として、生態学においてわずかな数値や 0 値の多い群集データに対してしばしば用いられる Hellinger 変換を行なった。サンプル間の距離行列に基づいて非計量多次元尺度法 (NMDS) による 2 次元プロットを作成した。湖底マット表層サンプルにおいて、湖沼内の群集構造の変動と湖沼間の群集構造の変動のどちらが相対的に大きいのか、すなわち湖沼毎に群集構造が異なるのか R, “vegan” パッケージ [50] を用いた PERMANOVA (Permutational analysis of variance) によって検定した。統計学的手法の検討に際し、土居 (2011)[51] を参考にした。続いて、湖沼ごとにサンプルのクラスタリングを行なうために、Bray-Curtis 非類似度の距離行列に基づいて UPGMA 法 (平均距離法) によって樹状図を描いた。樹状図などの作成には、R, “pheatmap” パッケージ [53] を用いた。さらに、各湖沼、各コア深度において存在する各 OTU が、どの程度他のサンプルと共有されているのか、またどの程度独立しているのか、を分析するために、R, “Complexupset” パッケージ [54] を用いて、Upset プロットを作成した。

3 結果

3.1 湖底マット表層の微細藻類の生物量と細菌群集構造

宗谷海岸露岩域における湖沼群に普遍的に見られる湖底マットの空間的な光合成生物群集の多様性の違いについて解明するために、湖沼内の異なる 5 地点から得られた湖底マット表層サンプルを用いた分析を行った。

3.1.1 湖底マット表層の強熱減量

各湖沼の湖底マットサンプルの強熱減量の平均値、標準偏差、標準誤差、変動係数を表 4 に示した。各湖沼の湖底マットサンプルの強熱減量 (平均値 \pm 標準偏差) は菩薩池が 19.30 ± 3.85 %、如来池が 15.86 ± 6.02 %、仏池が 15.57 ± 2.48 %、長池が 2.45 ± 0.96 %、スカーレン大池が 38.31 ± 13.75 % であった。表 4 を基に各湖沼の強熱減量を図 9 に示した。図 9 より、長池の強熱減量が最も小さく、スカーレン大池の強熱減量が最も大きいことが明らかになった。Tukey Kramer 検定によって菩薩池、仏池、如来池間には 95% 有意水準における統計学的な有意差が見られなかった一方、これらの湖沼と長池、スカーレン大池間、そして長池とスカーレン大池間ではいずれも有意差が確認された (図 9, $p < 0.01$)。また、表 4 より、強熱減量の変動係数は 0.16 から 0.39 に及び、仏池のデータのばらつきが最も小さく、次いで菩薩池、如来池、長池とばらつきが大きくなり、スカーレン大池のばらつきが最も大きかった。ばらつきが大きかった如来池、長池、スカーレン大池は 2 湖沼 (菩薩池、仏池) と比較して、湖底マット中の有機物の湖沼内での空間的不均一性が高いことが示唆される。

3.1.2 湖底マット表層の光合成微生物の細胞容積

顕微鏡観察によって確認された光合成微生物を形態学的特徴を基に大きく 7 つのグループに分類し、それぞれの代表種を図 10 に示した。シアノバクテリアに着目すると、糸状性シアノバクテリアである

Leptolyngbya 属や *Pseudanabaena* 属, *Oscillatoria* 属, 異質細胞形成シアノバクテリアである *Nostoc* 属, 単細胞性シアノバクテリアである *Cyanothece* 属といったいくつかの属が観察された (図 10). しばしば, 糸状性シアノバクテリアの巨大なコロニーが観察された. 真核微細藻類に着目すると, 珪藻類では *Navicula* 属や *Amphora* 属, 緑藻類では糸状性の *Oedogonium* 属や分類不明な球状の藻類, 接合藻類では *Cosmarium* 属などが観察された (図 10).

シアノバクテリアと真核微細藻類の細胞容積の存在比の比較により, 調査した 5 湖沼間でシアノバクテリアと真核微細藻類の比率が異なることが明らかになった (図 11). 仏池や菩薩池の湖底マットではシアノバクテリアのバイオマスが過半数を占めていた一方で, 長池では真核藻類が光合成生物量の大半を占めていた. 如来池とスカーレン大池ではシアノバクテリアと真核微細藻類の存在比は同程度であることが明らかになった. 詳しい組成について調査するために各湖沼における湖底マット乾燥サンプル 1 g あたりの 7 つのグループの光合成微生物の細胞容積の平均値 ($\text{mm}^3 \text{g}^{-1}$ 乾燥サンプル) を表 5 に示した. さらに, 各サンプリング地点における湖底マット乾燥サンプル 1 g あたりの 7 つのグループの光合成微生物の細胞容積の平均値 ($\text{mm}^3 \text{g}^{-1}$ 乾燥サンプル) を図 12 に示した. 表 5, 図 12 より, 乾燥サンプル 1 g あたりの全光合成微生物細胞容積は, 湖沼内でのばらつきが大きくスカーレン大池で最も大きかった. また, 湖沼によって優占する分類群に違いがあることが明らかになった (図 12). 真核微細藻類が優占する長池の湖底マットサンプルでは珪藻類が著しく優占していた (図 11, 図 12). シアノバクテリアが優占する仏池の湖底マットサンプルでは糸状性シアノバクテリアである *Leptolyngbya* sp. や *Pseudanabaena* sp. などが優占していた. 菩薩池の湖底マットサンプルでは仏池同様, 糸状性シアノバクテリアが優占していた. 如来池の湖底マットサンプルではシアノバクテリアの生物量も多かったが, 接合藻類である *Cosmarium* sp. が優占していた. スカーレン大池の湖底マットサンプルでは糸状性シアノバクテリアと, 糸状性緑藻類である *Oedogonium*

sp. が優占していた。

湖底マットの空間的な光合成生物群集の多様性の違いについて考えるために、細胞容積の分析から得られた光合成微生物群集データを Hellinger 変換し、サンプル間の Bray-curtis 非類似度に基づく NMDS プロットを作成した (図 13)。図 13 より、湖沼によってプロットされた位置やプロットの分散具合が異なる傾向にあった。長池のプロットの分散の程度が最も低く、スカーレン大池のプロットの分散の程度が最も高い結果となった。また、同じ湖沼のプロットどうしの距離が近い傾向にあった。菩薩池、如来池、スカーレン大池のプロットが図の中央付近に位置し、仏池、長池がその外側に位置する結果となった。光合成微生物群集の湖沼内の変動と湖沼間の変動を PERMANOVA によって検定したところ、各湖沼の湖底マットは統計学的に有意に異なる光合成微生物群集を有することが明らかになった ($p < 0.05$)。次に光合成微生物群集構造をもとに、各湖沼の湖底マットのクラスタリングを、サンプル間の Bray-curtis 非類似度に基づいた UPGMA 法にて行なった。クラスタリング結果と、各光合成微生物分類群の生物量をヒートマップと樹状図で示した (図 14)。その結果、まず菩薩池と如来池とでクラスターが形成され、続いてスカーレンとクラスターを形成し、仏池クラスターを合流した後に長池とクラスタリングされた (図 14)。

3.1.3 湖底マット表層の窒素固定能

分析によって測定した各湖沼の湖底マット乾燥サンプル 1 g・1 日当たりの窒素固定能をニトロゲナーゼ活性とし、表 6 に示した。各湖沼の湖底マットサンプルのニトロゲナーゼ活性 ($\text{nmol N}_2 \text{ g}^{-1}$ 乾燥サンプル) を平均値 \pm 標準偏差で表すと、菩薩池が 0.05 ± 0.01 、如来池が 0.20 ± 0.09 、仏池が 0.22 ± 0.14 、長池が 0.01 ± 0.01 、スカーレン大池が 0.07 ± 0.03 であった。表 6 を基に各湖沼のニトロゲナーゼ活性 ($\text{nmol N}_2 \text{ day}^{-1} \text{ g}^{-1}$ 乾燥サンプル) を図 15 に示した。また、湖底マット表層 1 m^2 あたりに 1 日あたりに固定される窒素量 (μg) を、窒素分子の分子量 28.02 を用いて再計算し、図 16 に示した。表 6、図 15 よ

り、長池のニトロゲナーゼ活性が最も小さく 0 に近い結果を示した。また、表 6, 図 15 より、ニトロゲナーゼ活性の変動係数は 0.24 から 0.94 に及び、データのばらつきが大きいことが明らかになった。Tukey Kramer 検定によって如来池-仏池間、菩薩池-長池間、菩薩池-スカーレン大池間、長池-スカーレン大池間には 95% 有意水準における有意差は見られなかった。一方、菩薩池-如来池、菩薩池-仏池間、長池-如来池間、長池-仏池間、スカーレン大池-如来池間、スカーレン大池-仏池間ではいずれも有意差が見られた (図 16, いずれも $p < 0.01$)。

3.1.4 湖底マット表層の細菌群集構造

16S rRNA アンプリコンシーケンシングによって湖底マット表層サンプル中の細菌群集構造を明らかにした。各サンプリング地点の湖底マット表層サンプルにおける、16S rRNA によって門レベルに分類された OTU の相対存在比を図 17 に示した。各サンプリング地点では Proteobacteria, Planctomycetes, Cyanobacteria, Chloroflexi, Bacteroidetes が優占していた。菩薩池₂のみシーケンスリード数 (図示せず) や細菌群集構造が他のサンプルを大きく異なっていた (図 17)。次に各湖沼の細菌群集について α 多様性を 6 つの指標 (Observed, Chao1, ACE, Shannon, Simpson, InvSimpson) について計算し図 18 に示した。Shannon Index に着目すると、いずれの湖沼においても中央値が 5.2 を超えており、特にスカーレン大池、如来池における種の均等度が高いことが明らかになった (図 18)。また、 β 多様性について考えるために、細菌群集データを Hellinger 変換し、サンプル間の Bray-curtis 非類似度に基づく NMDS プロットを作成した (図 19)。図 19 より、湖沼によってプロットされた位置やプロットの分散具合が異なる傾向にあった。如来池、長池のプロットの分散の程度が比較的低く、菩薩池、仏池、スカーレン大池のプロットの分散の程度が比較的高い結果となった。また、同じ湖沼のプロットどうしの距離が近い傾向にあり、各湖沼のプロットが重なることなく独立していた。菩薩池、如来池、仏池のプロットが図の中央付近に位置し、スカーレン大池、長池がその外側に位置する結果となった。細菌群集構造の湖沼内の変動と湖沼間の変動を

PERMANOVA によって検定したところ、各湖沼の湖底マットは統計学的に有意に異なる細菌群集構造を有することが明らかになった ($p < 0.05$).

次に細菌群集構造をもとに、各湖沼の湖底マットのクラスタリングをサンプル間の Bray-curtis 非類似度に基づいた UPGMA 法にて行なった。クラスタリング結果と、細菌群集の門レベルでの出現リード数をヒートマップと樹状図で示した (図 20)。その結果、まず如来池と、仏池の 1 つ、菩薩池の 1 つでクラスターが形成され、続いて菩薩池・仏池クラスターとスカーレン大池クラスターと合流した。その後、長池クラスターと合流した。菩薩池_2 は最も外側に配置された (図 20)。

3.2 湖底堆積物の物理化学的性質と生物学的性質

宗谷海岸露岩域における湖沼に見られる湖底堆積物中の垂直方向の空間的な細菌群集構造の違いについて、表層から基盤までの幅広い堆積年代を含む堆積物コアサンプルの分析を行なった。

3.2.1 湖底堆積物コアの物理化学的性質

共同研究者らによる分析によって、各湖沼堆積物コアの年代、組成、生物起源ケイ酸塩、密度などが明らかになった。スカーレン大池の結果を図 21 に、長池の結果を図 22 に示した。なお、仏池の結果については、共同研究者である川又氏私信において年代測定結果 (表 3) に疑問があるとのことにより、記載を省略した。如来池については、未分析の項目が多数であるため、記載を省略した。

物理化学的性質の分析の結果、スカーレン大池堆積物コアは、最深部の磁化率の高い氷成堆積物 (SK1)、430 cm 深ほどまでのケイ酸塩率・含水率が高い層状堆積物 (SK2)、360 cm 深ほどまでのケイ酸塩・含水率が低くシルトの多い層 (SK3)、180 cm 深ほどまでのケイ酸塩率・含水率が高い層状堆積物 (SK4)、表面までのケイ酸塩率・鉍物が少ない有機物質層 (SK5) のユニットに分類された (図 21)。SK4 と SK5 ユニットの境目は、海成堆積物と淡水性堆積物の境目であると考えられ、Takano ら (2012)[19] のコア分析結果とも一致した。一方、長池堆積物コアは、最深部～120 cm 深ほどまでの磁化率の高い氷成堆積物 (NG1)、120 cm 深～表層までの鉍物混じりの層状有機物 (NG2) のユニットに分類された (図 22)。

3.2.2 湖底堆積物中の細菌群集構造

16S rRNA アンプリコンシーケンシングによって湖底堆積物コアサンプル中の細菌群集構造を明らかにした。本セクションでは、湖沼堆積物の最底部である基盤付近から表層までの細菌群集構造の違いを議論する

ために、前項にて示した湖底マット表層サンプルの結果と、湖底堆積物コアサンプルの結果を併せて図示した。まず、各サンプリング地点の湖底マット表層、堆積物コアにおける、16S rRNA によって門レベルに分類された OTU の相対存在比 (2% 以上) を図 23 に示した。各サンプルに注目すると、ほぼ全てのサンプルから相対比 2% 以上で Proteobacteria と Actinobacteria が、スカーレン大池の 305 cm 以深を除くほぼ全てのサンプルから Bacteroidota が、如来池の 85 cm 以深を除くほぼ全てのサンプルから Planctomycetota が検出された。一方で、各湖沼ともに表層 0 - 数 cm でのみ 2% 以上検出された Patescibacteria や、多くの湖沼で表層付近を除く深さで 2% 以上を占めていた Caldatribacteria, Firmicutes など細菌群集構造は、コアスライス (深度) ごとに類似した構造をとり、各湖沼において深度とともに変遷する傾向が見られた。つまり、優占する細菌分類群は湖沼、深度ごとに变化する傾向が見られた。また、興味深いことに、表層以外のコアの一部からシアノバクテリアの DNA が出現していることが明らかになった。そこで、各サンプリング地点の湖底マット表層、堆積物コアにおける、シアノバクテリア分類群の属レベルの構成 (属レベルに分類された OTU の相対存在比 (2% 以上)) を図 24 に示した。5 湖沼ともに、糸状性シアノバクテリアである *Leptolyngbya* 属や *Phormidium* 属、異質細胞形成シアノバクテリアである *Nostoc* 属の DNA などが検出された。スカーレン大池では単細胞性シアノバクテリアである *Cyanobium* 属が比較的大きな比率を占めていた。

次に各湖沼の細菌群集について α 多様性を 6 つの指標 (Observed, Chao1, ACE, Shannon, Simpson, InvSimpson) について計算し図 25 に示した。Shannon Index は、表層付近ではいずれの湖沼においても中央値が 5.0 前後であるが、表層より深層では、Shannon Index は減少する傾向にあり、特にスカーレン大池では種の均等度の単調減少が顕著であることが明らかになった (図 25)。ACE Index など、種の豊富さの指標についても度の湖沼でも概ね深度とともに減少する傾向が見られた。また、 β 多様性について考え

るためにサンプル間の Bray-curtis 非類似度に基づく NMDS プロットを作成した (図 26). 湖沼内の変動に着目すると, 同じコアスライスのプロットどうしの距離が近かった. 湖沼間の変動に着目すると, スカーレン大池のポリゴンは比較的独立していたが, 他 4 湖沼のポリゴンは重なり合っていた. 異なる湖沼間において, コアの深度が類似しているプロットどうしの距離が近い傾向にあった. また, 氷河後退湖である 3 湖沼 (仏池, 如来池, 長池) と, 海址湖であるスカーレン大池の深さ方向へのプロットの位置, 矢印の進む向きが異なることが明らかになった (図 26).

次に細菌群集構造をもとに, 各湖沼の湖底堆積物コアのクラスタリングをサンプル間の Bray-curtis 非類似度に基づいた UPGMA 法にて行なった. なお, 本解析は, 同一コアスライス 3 サンプル分の結果をマージしたのち実施した. クラスタリング結果と, 細菌群集の門レベルでの出現リード数をヒートマップと樹状図で示した (図 27). その結果, クラスタは湖沼内ではなく, コアの深度ごとに形成される傾向にあった. スカーレン大池の一定以上の深度から得た細菌群集は最も外側にクラスタとして配置された (図 27).

4 考察

南極大陸には数多くの湖沼が点在しており、その水中環境は、陸上のような低温や、凍結や少雨による乾燥の影響が緩和されるため、比較的安定した環境である [7]. 年間を通じて凍結を免れる湖沼の底には、シアノバクテリアなどの細菌や藻類、コケを中心とした湖底マットが確認されている。湖底マットや陸上環境で優占する微生物群集は、光合成による一次生産や栄養塩循環機能、有機物分解による物質循環速度の調節機能といった生態学的に重要な役割を担っている。本研究は、湖底マットにおける生物群集構造を解明し、湖沼間での多様性に違いがあるかを明らかにすること、露岩域や湖沼の変遷と湖底マットの生物群集構造との関係を解明し、現在の湖底マットの多様性がどのように成り立っているのか明らかにすることを目的とした。目的の達成するために、東南極、宗谷海岸露岩域に点在する 5 つの湖沼における湖底マット表層と湖底堆積物コアを研究対象とし、マット表層において優占する光合成生物の生物量の定量的な分析と、マット表層から湖沼の基盤にまで及ぶ堆積物コア中の細菌群集構造の網羅的な解析を実施した。

4.1 各湖沼における湖底マット表層の光合成微生物群集構造と細菌群集構造

図 13, 図 19, 図 20 より、湖底マットの微細生物群集構造について、細胞容積の光合成微生物全体に着目した場合でも細菌群集構造に着目した場合でも湖沼間で生物群集構造が統計学的に有意に異なった。すなわち、各湖沼の湖底マットは他湖沼とは異なる、独自の微細生物群集を有することが明らかになった。細菌群集に着目した NMDS プロット (図 19) より、菩薩池と如来池、仏池は図中の点どうしが比較的近接していることから、細菌群集構造の類似度が高いことが推察された。一方、スカーレン大池と長池は図中で距離が大きく対角に位置していたことから、細菌群集構造の類似度は低いことが推察された (図 19)。顕微鏡観察された真核微細藻類やシアノバクテリアといった光合成微生物群集の湖沼間での違いのみならず、光合成を行わない細菌群集も湖沼毎に群集構造が異なり、湖沼毎に独自の群集構造を有していたことが明

らかになった。湖底マット中の光合成微生物は強い UV から細胞を守るために色素を蓄積することが知られている [9]。蓄積した色素は光合成生物以外の生物にとっても避難場所として重要である。また、バクテリアの産生する粘性物質によるバイオフィームといった物理的構造や、藻類が作り出す発達した層状構造が、湖底マット中に多様な生息環境を生み、環境内・間での複雑な微生物ネットワークを構築することが知られている [23][55]。これらの光合成微生物群集構造の違いが、細菌群集構造にも影響を及ぼしていることが考えられる。さらにはコケボウズ構造において、表面の酸化層と内側の還元層との間で物質循環が推察されることから [23]、酸化層と還元層中での細菌群集構造の違いも表層中の光合成微生物群集構造に影響を及ぼすと考えられる。

4.2 湖底マット表層における窒素固定能

窒素固定能の分析から、長池を除く 4 湖沼において、湖底マットは窒素固定能を示した (図 15)。実験を行なった 7°C という温度条件は夏季の宗谷海岸の湖沼が経験しうる温度である [9]。 *Nostoc* 属などの異質細胞形成シアノバクテリアは窒素固定能を有することが知られていることから、長池ではシアノバクテリア現存量が 5 湖沼のうち最も少なかったことが、窒素固定能が低かったことに関係していると考えられる。しかし、顕微鏡観察によりシアノバクテリアが比較的多く観察された菩薩池やスカーレン大池においても (図 12)、統計学的に長池と同程度の窒素固定能であった (図 15)。シアノバクテリア以外にも窒素固定能を有する細菌類の存在も知られており、それらによる窒素固定があることも考慮する必要がある。どの分類群の生物が窒素固定に関わっているかなど詳細な分析のためには、関わる遺伝子の活性に関する分析が必要である。

メタバーコーディング解析では、ほぼ全ての湖底マット表層サンプルから *Nostoc* 属の DNA が検出され

た(図 24)。シアノバクテリアの窒素固定活性は湖底マット中の窒素制限や栄養塩濃度といった化学環境要因にも影響されると考えられる。昭和基地周辺露岩域の淡水湖の水柱環境は極貧栄養ではあるが、湖底マット中には大量の栄養塩が蓄えられていることが知られている [56]。特にスカーレン大池湖底マット表層中のアンモニウムイオン濃度は $208.0 \mu\text{mol L}^{-1}$ であると報告されており [56]、窒素が制限要因になっていないことが窒素固定活性を低くしていたとも考えられる。このことから、湖沼の湖底マットに優占していた生物群集はそれぞれの湖沼によって異なり、窒素固定能といった生態学的機能を有する群集の存在量に加え、環境要因にも影響され湖沼間で大きな違いとなっていたと推察される。

4.3 湖沼の性質と湖底マット表層の群集構造との関係

流域から湖底に鉍物が流入した場合、湖底マット中の生物群集に影響を及ぼす可能性が考えられる。強熱減量は乾燥サンプルに含まれる有機物などの揮発性物質の割合を示す。長池の湖底マット中の強熱減量が 5 湖沼で最も低かったことから、他の 4 湖沼と比較して鉍物といった無機物の含有量が大きいことが示唆された(表 4, 図 9)。長池の湖底マット中に珪藻が比較的多くみられることと、鉍物中から溶出するケイ酸塩が関係している可能性が示唆された。日本南極地域観測隊による湖沼モニタリング観測において、2008 年頃に、長池への土砂流入による濁度の上昇が報告されている。土砂流入によって、ケイ酸塩が供給され、生物群集構造が影響を受けることが示唆されたが、このイベントが突発的なものなのかどうかなど、詳細な考察のためには土砂流入前後の群集構造について調査する必要がある。一方で、長池の堆積物コアサンプルでは層状堆積物中に細砂などの鉍物が混入していたことから(図 22)、数千年単位という長い時間スケールで長池の湖底マットは土砂流入の影響を受けている可能性も考えられる。土砂流入と湖底マット中の生物群集構造の関係については、さらなる研究調査が必要である。また、他の 4 湖沼は長池と比較し、統計学的に有意に強熱減量が高かったこと(図 9)から、湖底マット中の無機物含有量が少なく、有機物含有量が多

いことが明らかになった。最も強熱減量が大きかったスカーレン大池のコアの柱状図から発達した層状構造が観察されたことから (図 21), 流域からの土砂供給が比較的小さい環境であることが推察された。

湖底マット表層サンプル中の生物群集構造は、顕微鏡観察による光合成生物群集分析と分子生物学的手法による細菌群集解析両者ともにクラスター解析によって、菩薩池、如来池、仏池、スカーレン大池についてまずクラスターを形成したため類似度が比較的高く、長池の生物群集の類似度は 4 湖沼と比較的低いことが明らかになった (図 14, 図 20)。また、全ての湖沼に普遍的に存在する分類群が観察された一方で、特定の湖沼にのみ局在する分類群の存在も明らかになった (図 12, 図 17, 図 24)。例えば、図 17 より、Proteobacteria, Planctomycetes, Cyanobacteria, Chloroflexi, Bacteroidetes はいずれの湖沼においても検出されたが、Gemmatinamodota はスカーレン大池のみで検出された。故に門レベルでの視点においても局在する分類群が存在することが明らかになった。各湖沼の湖底マットにおいて、細菌群集の種レベル (OTU レベル) の独自性を分析するために、UpSet プロットを作成し、1 湖沼以上で出現する OTU 数とその分類を図示した (図 28)。その結果、700 程度の細菌 OTU はいずれの湖沼の湖底マットにおいても出現したことが明らかになった (図 28)。各湖底マットの OTU 数が 1,700~2,500 程度であることを踏まえると、3~4 割の OTU は 5 湖沼で共有されていることが明らかになった (図 28)。すなわち、湖底マットが有する細菌群集のうち、3~4 割は普遍的に分布する種であり、残りの 6~7 割は局在する種であった。さらに、各湖沼のみに存在する OTU 数は各湖沼細菌群集のうち 1~2 割であり、その割合は菩薩池において最も大きかった (図 28)。

生物群集構造の違いは、地理的種分散のしやすさと関係している [58]。露岩域に生息する生物は、最終氷期以前から南極大陸に生息している種、最終氷期以降に風などによって他の大陸から侵入した種、隆起に

よって海洋から取り残された種が知られる [1][32]. 湖沼間を渡る食植者がおらず、湖沼どうしが孤立している昭和基地周辺露岩域においては、風が主要な種分散要因であると考えられる。実際に、調査した湖沼では凝集した湖底マットが光合成によって発生した酸素によって浮力を得て浮上、風によって着岸し、さらに風によって陸上を転がる現象が観察されている [9]. 微生物は風によって分散しやすいため、物理的距離に応じて類似性の高い群集構造を作り出すのであろうか。本研究においても、菩薩池、如来池、仏池といった物理的距離が近い湖沼では、糸状シアノバクテリアの優占する類似した湖底マット構造が観察された。一方で、これら 3 湖沼のマット表層の生物群集構造は、同じスカルプスネス露岩域に位置する長池よりも、スカーレン露岩域に位置するスカーレン大池と類似していた (図 14, 図 20). 図 28 より、OTU レベルの視点でも、菩薩池・如来池・仏池の 3 湖沼間で共有される OTU 数よりも、菩薩池・如来池・仏池・スカーレン大池の 4 湖沼間で共有される OTU 数の方が多かった。すなわち、湖底マット表層の微細生物群集は、物理的距離だけでなく、湖底マット中の粒度組成や、栄養塩濃度、土砂流入といった湖沼環境に影響を受けることが推察された。つまり、湖底マット中の生物は、湖岸に打ち寄せられた湖底マットからの風等による拡散作用を受けるなどにて他湖沼へ分散、侵入するが、湖沼毎に異なる環境に応答・適応し定着した結果として、湖沼間の物理的距離のみでは説明できない独自の群集構造を有することに繋がったと考えられる。また、露岩域である流域から湖沼の流出入が少なく、各湖沼が互いに隔離されていること [6], 陸上と比較して柔和な環境であり、年間を通じて微生物活動が可能であることから、各湖沼はマイクロコスムのような機能を持つことが示唆される。このことも湖沼ごとに独自の群集構造をもたらした要因のひとつであると推察される。

4.4 湖底堆積物コアサンプルの細菌群集構造と湖沼の地史との関係

湖沼成立から現在までにたどってきた地史は湖底マット中の生物群集構造に影響を及ぼすであろうか。海址湖であるスカーレン大池はかつて海底にあったため、湖沼として成立時、堆積物中に海成栄養塩を蓄積していた [20][19]。一方で、氷河後退湖は氷床によって削られた基盤に融水が溜まって成立したため、湖沼成立初期、堆積物中に栄養塩をほとんど持たなかったと考えられる。また、今回研究調査した湖沼への流入は非常に少ないことが知られており [6][16]、湖水が極貧栄養であることに関係している。ゆえに、スカーレン大池に定着した生物群集は他の 4 湖沼よりも比較的良好な栄養条件で変遷してきたと推測される。スカーレン大池の湖底マット表層間隙水の栄養塩濃度が非常に高いことから [56]、このことが支持されると推察される。細胞容積の分析によって、スカーレン大池は調査した 5 湖沼のうち最も細胞容積が大きい、つまり生物量が多く、かつ細菌群集の α 多様性 (種の豊富さ) が高いことが明らかになった (図 12, 18)。これらのことから、湖沼成立から現在までにたどってきた地理的履歴は湖底マット中の生物群集構造に影響を及ぼすことが示唆された。

本研究により、湖底マット表面から基盤にまで及ぶ堆積物コアサンプル中の細菌群集構造が調査された。メタバーコーディング解析によって検出された DNA には、生細胞由来の DNA と、死細胞由来の DNA が混在している。堆積物中の死細胞由来 DNA は常にバクテリアによる分解作用や、鉱物との吸着作用を受け、PCR 増幅されにくくなり、次世代シーケンサーによって検出されないことにつながる。深い地点のコアであるほど、 α 多様性、種の豊富さ・均等度ともに減少傾向にあったのは、堆積物中での DNA の分解、消失を反映している可能性もある。表 3 より、堆積速度が $0.2 \text{ mm} \sim 0.6 \text{ mm y}^{-1}$ であるため、今回実験で 1 cm 単位でのスライスは数十年～数百年分の情報を持つことが考えられる。この期間に、堆積物中に新た

な生物が侵入，定着する可能性も考えられる．ただし，堆積物コアは数 cm より深い場合，無酸素環境となっており，堆積物下方ほど周年安定した低温環境となっている．これに対し堆積物表層は酸化的環境であり，湖沼の水温変動と同調して 0~10°C ほどの季節変動がある．無酸素環境での有機物分解は発酵によるとすれば，一般に発酵過程は低温環境では著しく制限されると考えられるので，無酸素・低温の堆積物中では有機物・DNA は保存されやすい可能性が考えられる．これらを踏まえ，堆積物中の生物群集は常に変動しており，本研究のデータを解釈する際には，堆積した当時生息していた生物の群集データだけではないことに注意し，慎重に議論する必要がある．

図 23，図 27 より，細菌群集構造は，コアスライスごとに類似した構造をとり，湖沼毎に深度とともに変遷し．異なる湖沼間において，コアの深度が類似しているプロットどうしの距離が近い傾向にあった．湖底マット表層サンプルに注目した場合は，湖沼間での群集構造の差異が明らかになったが，数千年スケールで群集構造の類似性を分析すると，湖沼の違いよりも，コアの深さが群集構造の類似性に影響することが示唆された．マット表層のみに注目している時と，時間スケールが異なることが，深さごとの類似性に関係する要因の 1 つであると考えられる．一方で，図 26 において，氷河後退湖である 3 湖沼 (如来池，仏池，長池) と，海址湖であるスカーレン大池のプロットの広がる方向が，ある深度以降から異なったことは，海成堆積物と淡水性堆積物の切り替わりとともに，明確に微生物群集が変化したことが示唆される (表 3; 図 26)．スカーレン大池の堆積物コア 150 cm 深前後 (約 5,000 年前) の時点で海洋から分離し，淡水化が始まったことが先行研究によって明らかになっている [19]．本研究では，スカーレン大池 94 cm 深程度より浅いコアの細菌群集が他の湖沼と同様の変遷をたどっていたことから，約 2,000 年前に完全に淡水化した事が推察される (図 21, 26)．

また、群集を構成する分類群に着目すると、表層以外のコアの一部からシアノバクテリアの DNA が出現していることが明らかになった (図 24)。地下深くで光合成を行わずに生活するシアノバクテリアが近年発見されているものの [57], 太陽光を不要とする種や実験操作によるコンタミネーションではない場合, シアノバクテリアの古 DNA が数千年単位で堆積物中に保存されていることが示唆される。Takano ら (2012) においても, スカーレン大池の堆積物コアサンプル中から, シアノバクテリア由来の DNA が抽出されたことが報告されている [19]。本研究においては, まず如来池では, シアノバクテリア由来 DNA の出現は少なかったものの, 105 cm 深から *Leptolyngbya* 属が, 85 cm 深から *Phormidium* 属が検出されたことから, 湖沼成立初期から現在と同様の生物群集が優占していたことが推測された (図 24)。仏池では, 基盤付近の 124 cm 深から *Phormidium* 属や *Nostoc* 属が, 104 cm 以浅から *Leptolyngbya* 属が検出されたことから, 湖沼成立初期において窒素固定能を持つシアノバクテリアが生物群集の定着に寄与していたことが示唆された (図 24)。長池では, 119 cm 以浅から *Leptolyngbya* 属が検出され, 86 cm 以浅から *Phormidium* 属, *Nostoc* 属が検出された (図 24)。スカーレン大池では, 海洋底にあったと考えられる 305 cm 以深では, シアノバクテリアはあまり検出されなかったが, 152 cm 以浅では *Cyanobium* 属が検出された (図 24)。このことから, スカーレン大池では優占するシアノバクテリア分類群が湖沼の変遷とともに変化してきたことが推測された。ただし, 今回の分析手法では, 生細胞と死細胞を区分することはできないため, 得られた塩基配列について, より詳細に調査する必要がある。

各湖沼の堆積物コアサンプルにおいて, 深さごとのスライス中の細菌群集の種レベル (OTU レベル) の独自性を分析するために, UpSet プロットを作成し, 1 深度以上で出現する OTU 数と分類群を図示した (図 29~32)。その結果, どの湖沼においても, 最も浅い層, つまり堆積年代の新しい層のみに出現する OTU 数が最も多いことが明らかになった。このことから, 堆積過程で DNA の多くが消失し古い堆積層からは

生物の痕跡が検出しにくくなっていること、または、表層にはより多くの種が侵入しようとしていることが推測される。また、要素数が多いのは、ひとつのみまたは、表層 2~3 層の積集合である場合が多く、最大 OTU の半数程度がユニークな OTU であった (図 29~32)。このことから、各深度ごとの群集構造の独自性が支持される。一方で、いずれの湖沼においても、全ての深度で出現する OTU が確認された。その比率は、湖沼によって異なり、如来池で最も高く、スカーレン大池で最も低かった。スカーレン大池は、海址湖であり湖内環境が大きく変化したことが、共通の OTU が少ない原因であると考えられる。如来池は、年代測定が行なわれていないが、細菌群集構造が他湖沼と比較して変化していないことが原因のひとつとして推測される。

図 26, 図 27, 図 32 より、スカーレン大池の海成堆積物中の細菌群集構造は他湖沼コアサンプル中の細菌群集構造と大きく異なることが明らかとなった。淡水性堆積物中の細菌群集構造は、湖沼ごとの独自性よりも深度ごとの独自性が大きいことが明らかになった。堆積物コア中の生物、DNA は隔離され、湖沼間の分散が生じる可能性は非常に低いと考えられるため、堆積した当時の群集構造が湖沼間で類似していたことが示唆される。図 21, 図 22 の記載図より、堆積物中の層構造が確認されたことから、大きな攪乱が生じていないと推測されることも、堆積物中に生物、DNA が隔離されていることを支持する。ゆえに、各スライス間の数十年~数百年というスケールでの湖底マットの群集構造の変遷は湖沼間で同様の傾向であることが示唆される。

5 結論

本研究では、南極大陸沿岸部である昭和基地周辺の露岩域の湖沼環境における湖底マットにおける生物群集構造を解明し、湖沼間での多様性に違いがあるかを明らかにすること、露岩域や湖沼の変遷と湖底マットの生物群集構造との関係を解明し、現在の湖底マットの多様性がどのように成り立っているのか明らかにすることを目的とし、4つの氷河後退湖と1つの海址湖における湖底マット中の微生物について、顕微鏡観察による細胞容積の定量、メタバーコーディング解析、窒素固定能の分析による生態学的機能の定量を組み合わせた多面的なアプローチで分析した。その結果、マット表層サンプルの分析から、糸状性シアノバクテリアがコロニーを形成し優占する湖沼、珪藻類が優占する湖沼、糸状性シアノバクテリアと糸状性緑藻類が優占する湖沼が確認され、湖底マット表層の光合成微生物群集は湖沼間で統計学的に有意に異なることが明らかになった (PERMANOVA, $p < 0.05$)。メタバーコーディング解析によって得られた細菌群集データからも、各湖沼は独自の群集構造を持つことが明らかになった (PERMANOVA, $p < 0.05$)。また窒素固定能の分析からは、南極夏季に湖底マット中の微生物が窒素固定を行なっている可能性が4湖沼で示された。堆積物コアサンプルの分析からは、深度ごとに出現する OTU が異なる傾向にあったことから、細菌群集構造の類似性は湖沼間よりも深度間で小さいことが示唆された。以上のことから、氷河後退湖の微細生物群集構造の変遷は、氷河作用によるゼロリセットからの生物蓄積であり、窒素固定能を持つシアノバクテリアが初期に貢献した可能性が推察された [31]。海址湖の微細生物群集構造の変遷は、淡水化後、他の氷河後退湖と同様の変遷をたどったが、海成堆積物由来の栄養塩を利用できたことで生物活性が高くなった可能性が示唆された。長期的スケールでの細菌群集構造の変遷は湖沼の地史に影響を受け、短期的なスケールでの群集構造は湖底マット中の微環境や湖沼への栄養塩などの流出入といった物理化学的性質といった要因に影響を受けることが推測された。

6 謝辞

本研究を遂行するにあたり，ご指導をくださった国立極地研究所の工藤栄教授，内田雅己准教授に深く感謝申し上げます．研究方針の相談やサンプルの調達，データ解析方法など多くのご支援を頂きました．国立極地研究所の菅沼悠介教授，川又基人さん（元総合研究大学院大学，現土木研究所）には本研究を進めるのに欠かせないサンプルや分析データの提供や，研究に対する助言などご支援を頂きました．日本南極地域観測隊（59 次，60 次）の皆様にはサンプルの採取，提供など多くのご支援を頂きました．国立極地研究所の佐野雅美研究員と同研究所技術職員の渡辺憲一さんには遺伝子解析に関する実験分析方法やデータ解析方法に関して多くのご支援を頂きました．和田智竹さんをはじめ，総合研究大学院大学複合科学研究科極域科学専攻の学生皆様には実験の協力や，生物圏研究グループセミナーでの研究に対する助言など多くの激励やご支援を頂きました．チェコ共和国，南ボヘミア大学における研究では Josef Elster 教授をはじめ，多くの研究者や技術職員，学生の方に現地での生活を支えていただきながら，研究に関する助言やご指導を頂きました．ベルギー王国，リエージュ大学の Annick Wilmotte 教授やヘント大学の Elie Verleyen 教授には研究方針に関して助言を頂きました．また総合研究大学院大学の教育経費によって実験に必要な物品調達のご支援，総研大海外派遣プログラムによって海外における研究活動のご支援，南極地域観測事業によってサンプル採取のご支援をそれぞれ頂きました．紙面上ではございますが，深く御礼申し上げます．

7 参考文献

- [1] Chown, S. L., Clarke, A., Fraser, C. I., Cary, S. C., Moon, K. L., & McGeoch, M. A. (2015). The changing form of Antarctic biodiversity. *Nature*, 522(7557), 431–438.
- [2] Burton-Johnson, A., Black, M., Peter, T. F., & Kaluza-Gilbert, J. (2016). An automated methodology for differentiating rock from snow, clouds and sea in Antarctica from Landsat 8 imagery: A new rock outcrop map and area estimation for the entire Antarctic continent. *Cryosphere*, 10(4), 1665–1677.
- [3] Hirose, Y., Shiozaki, T., Otani, M., Kudoh, S., Imura, S., Eki, T., & Harada, N. (2020). Investigating algal communities in lacustrine and hydro-terrestrial environments of East Antarctica using deep amplicon sequencing. *Microorganisms*, 8(4).
- [4] Chaya, A., Kurosawa, N., Kawamata, A., Kosugi, M., & Imura, S. (2019). Community structures of bacteria, archaea, and eukaryotic microbes in the freshwater glacier lake Yukidori-Ike in Langhovde, East Antarctica. *Diversity*, 11(7)
- [5] Wand, U., Schwarz, G., Brüggemann, E., & Bräuer, K. (1997). Evidence for physical and chemical stratification in lake untersee (central Dronning Maud Land, East Antarctica). *Antarctic Science*, 9(1), 43–45.
- [6] Kimura, S., Ban, S., Imura, S., Kudoh, S., & Matsuzaki, M. (2010). Limnological characteristics of vertical structure in the lakes of Syowa Oasis, East Antarctica. *Polar Science*, 3(4), 262–271.
- [7] Vincent, W.F., Mueller, D. R., & Bonilla, S. (2004). Ecosystems on ice: the microbial ecology of Markham Ice Shelf in the high Arctic. *Cryobiology*, 48, 103–122.
- [8] Vincent, W. F. (2000). Cyanobacterial dominance in the Polar Regions. In: Whitton, B.A. & Potts, M. (eds). *The Ecology of Cyanobacteria*. Kluwer Academic Publisher: the Netherlands, pp 321–340.
- [9] Kudoh, S. & Tanabe, Y. (2014). Limnology and ecology of lakes along the Sôya Coast, East Antarctica. *Adv Polar Sci*, 2014, 25(2), 75-91.
- [10] Vincent, W. F., & Quesada, A. (2012). "Cyanobacteria in high latitude lakes, rivers and seas", in *Ecology of Cyanobacteria II: Their Diversity in Space and Time*, ed. B. A. Whitton (New York, NY: Springer), 371-385.
- [11] Verleyen, E., Hodgson, D. A., Gibson, J., Imura, S., Kaup, E., Kudoh, S., Wever, A. D., Hoshino, T., McMinn, A., Obbels, D., Roberts, D., Roberts, S., Sabbe, K., Souffreau, C., Tavernier, I., Nieuwenhuyze, W. V., Ranst, W. V., Vindevogel, N., & Vyverman, W. (2012). Chemical limnology in coastal East Antarctic lakes: monitoring future climate change in centres of endemism and biodiversity. *Antarct Science* 24(1),23–33.
- [12] 秋山 優. (1974). 南極リュツォホルム湾沿岸露岩帯の藻類植生. 島根大学教育学部紀要 (自然科学), 第 8 卷, 37-50.
- [13] Imura, S., Bando, T., Seto, K., Ohtani, S., Kudoh, S., & Kanda, H. (2003). Distribution of aquatic mosses in Sôya Coast region, East Antarctica. *Polar Biosci.*, 16, 1-10.
- [14] 工藤 栄・田邊 優貴子・飯田高大・辻本 恵・小川麻里・伊村 智. (2008). 第 49 次南極地域観測隊夏隊

- における湖沼観測. 南極資料, Vol.52, No.3, 421-436.
- [15] Fujii, M., Takano, Y., Kojima, H., Hoshino, T., Tanaka, R., & Fukui, M. (2010). Microbial community structure, pigment composition, and nitrogen source of red snow in Antarctica. *Microbial ecology*, 59(3), 466–475.
- [16] 田邊 優貴子 & 工藤 栄. (2009). 簡便な調査法を用いた南極湖沼の湖盆形態とその水質・水生生物との関わり. 陸水学会雑誌, 70, 191-199.
- [17] Bevington, J., McKay, C. P., Davila, A., Hawes, I., Tanabe, Y., & Andersen, D. T. (2018). The thermal structure of the anoxic trough in Lake Untersee, Antarctica. *Antarctic Science*, 30(6), 333–344.
- [18] Kawamata, M., Suganuma, Y., Doi, K., Misawa, K., Hirabayashi, M., Hattori, A., & Sawagaki, T. (2020). Abrupt Holocene ice-sheet thinning along the southern Sôya Coast, Lützow-Holm Bay, East Antarctica, revealed by glacial geomorphology and surface exposure dating. *Quaternary Science Reviews*, 247.
- [19] Takano, Y., Tyler, J. J., Kojima, H., Yokoyama, Y., Tanabe, Y., Sato, T., Ogawa, N., Ohkouchi, N., & Fukui, M. (2012). Holocene lake development and glacial-isostatic uplift at Lake Skallen and Lake Oyako, Lützow-Holm Bay, East Antarctica: Based on biogeochemical facies and molecular signatures. *Applied Geochemistry*, 27(12), 2546–2559.
- [20] Matsumoto, G. I., Tani, Y., Seto, K., Tazawa, T., Yamamuro, M., Watanabe, T., Nakamura, T., Takemura, T., & Kanda, H. (2010). Holocene paleolimnological changes in Lake Skallen Oike in the Syowa Station area of Antarctica inferred from organic components in a sediment core (Sk4C-02). *Journal of Paleolimnology*, 44(2), 677–693.
- [21] Tanabe, Y., Ohtani, S., Kasamatsu, N., Fukuchi, M., & Kudoh, S. (2010). Photophysiological responses of phytobenthic communities to the strong light and UV in Antarctic shallow lakes. *Polar Biology*, 33(1), 85–100.
- [22] Imura, S., Bando, T., Saito, S., Seto, K., & Kanda, H. (1999). Benthic moss pillars in Antarctic lakes. *Polar Biology*, 22(2), 137–140.
- [23] Nakai, R., Abe, T., Baba, T., Imura, S., Kagoshima, H., Kanda, H., Kanekiyo, A., Kohara, Y., Koi, A., Nakamura, K., Narita, T., Niki, H., Yanagihara, K., & Naganuma, T. (2011). Microflorae of aquatic moss pillars in a freshwater lake, East Antarctica, based on fatty acid and 16S rRNA gene analyses. *Polar Biology*, 35, 425-433.
- [24] Verleyen, E., Tavernier, I., Hodgson, D. A., Whitehouse P. L., Kudoh S., Imura, S., Heirman, K., Bentley, M. J., Roberts, S. J., Batist, M. D., Sabbe, K., & Vyverman, W. (2017). Ice sheet retreat and glacio-isostatic adjustment in Lützow-Holm Bay, East Antarctica. *Quaternary Science Reviews*, 169, 85-98.
- [25] Seddon, A.W.R., Mackay, A.W., Baker, A.G., Birks, H.J.B., Breman, E., Buck, C.E., Ellis, E.C., Froyd, C.A., Gill, J.L., Gillson, L., Johnson, E.A., Jones, V.J., Juggins, S., Macias-Fauria, M., Mills, K., Morris, J.L., Nogués-Bravo, D., Punyasena, S.W., Roland, T.P., Tanentzap, A.J., Willis, K.J., Aberhan, M., van Asperen, E.N., Austin, W.E.N., Battarbee, R.W., Bhagwat, S., Belanger, C.L., Bennett, K.D., Birks, H.H., Bronk Ramsey, C., Brooks, S.J., de Bruyn, M., Butler, P.G., Chambers, F.M., Clarke, S.J., Davies, A.L., Dearing, J.A., Ezard, T.H.G., Feurdean, A., Flower, R.J., Gell, P., Hausmann, S., Hogan, E.J., Hopkins, M.J., Jeffers, E.S., Korhola, A.A., Marchant, R., Kiefer, T., Lamentowicz, M., Larocque-Tobler, I., López-Merino, L., Liow, L.H.,

- McGowan, S., Miller, J.H., Montoya, E., Morton, O., Nogué, S., Onoufriou, C., Boush, L.P., Rodriguez-Sanchez, F., Rose, N.L., Sayer, C.D., Shaw, H.E., Payne, R., Simpson, G., Sohar, K., Whitehouse, N.J., Williams, J.W., & Witkowski, A. (2014). Looking forward through the past: identification of 50 priority research questions in palaeoecology. *Journal of Ecology*, *102*, 256-267.
- [26] Pearman, J.K., Thomson-Laing, G., Howarth, J. D., Vandergoes, M. J., Thompson, L., Rees, A., & Wood, S. A. (2021). Investigating variability in microbial community composition in replicate environmental DNA samples down lake sediment cores. *PLoS ONE* *16*(5), e0250783.
- [27] Keck, F., Millet, L., Debroas, D., Etienne, D., Galop, D., Rius, D., & Domaizon, I. (2020). Assessing the response of micro-eukaryotic diversity to the Great Acceleration using lake sedimentary DNA. *Nature Communications* *11*, 3831.
- [28] Møller, T. E., van der Bilt, W. G. M., Roerdink, D. L., Jørgensen, S. L. (2020). Microbial Community Structure in Arctic Lake Sediments Reflect Variations in Holocene Climate Conditions. *Frontiers in Microbiology*, *11*, 1520.
- [29] 菅沼 悠介・田邊 優貴子・香月 興太・柴田 大輔・川又 基人. (2018). 氷上からの湖底・海底堆積物掘削プロジェクトの報告 (JARE-58/59). 南極資料, Vol.62, 15-42.
- [30] Kvéderová, J., Elster, J., & Šimek, M. (2011). In situ response of *Nostoc commune* s.l. colonies to desiccation in Central Svalbard, Norwegian High Arctic. *Fottea*, *11*(1), 87–97.
- [31] Pessi, I. S., Pushkareva, E., Lara, Y., Borderie, F., Wilmotte, A., & Elster, J. (2019). Marked Succession of Cyanobacterial Communities Following Glacier Retreat in the High Arctic. *Microbial Ecology* *77*, 136–147.
- [32] Fraser, C. I., Terauds, A., Smellie, J., Convey, P., & Chown, S. L. (2014). Geothermal activity helps life survive glacial cycles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *111*(15), 5634–5639.
- [33] 山内 恭. (2016). 極域温暖化問題の概観. 南極資料, Vol.60, 1-18.
- [34] Turner, J., Arthern, R., Bromwich, D., Marshall, G., Worby, T., Bockheim, J., Diprisco, G., Verde, C., Convey, P., Roscoe, H., Jones, A., Vaughan, D., Woodworth, P., Scambos, T., Cook, A., Lenton, A., Comiso, J., Gugliemin, M., Summerhayes, C., Meredith, M., Naveira-Garavato, A., Chown, S., Stevens, M., Adams, B., Worland, R., Hennion, F., huiskes, A., Bergstrom, D., Hodgson, D. A., Bindschadler, R., Bargagli, R., Metzl, N., Van Der Veen, K., Monaghan, A., Speer, K., Rintoul, S., Hellmer, H., Jacobs, S., Heywood, K., Holland, D., Yamanouchi, T., Barbante, C., Bertler, N., Boutron, C., Hong, S., Mayewski, P., Fastook, J., Newsham, K., Robinson, S., Forcarda, J., Trathan, P., Smetacek, V., Gutt, J., Pörtner, H. -O., Peck, L., Gili, J. -M., Wiencke, C., Fahrbach, E., Atkinson, A., Webb, D., Isla, E., Orejas, C., Rossi, S., & Shanklin, J. (2009). The instrumental period. In Turner, J., Bindschadler, R., Convey, P., Diprisco, G., Fahrbach, E., Gutt, J., Hodgson, D. A., Mayewski, P. A., & Summerhayes, C. P., eds. *Antarctic climate change and the environment*. Cambridge: Scientific Committee for Antarctic Research, 183–298.
- [35] Quayle, W. C., Peck, L. S., Peat, H., Ellis-Evans, J. C., & Harrigan, P. R. (2002). Extreme Responses to Climate Change in Antarctic Lakes. *Science*, *295*(5555), 645.
- [36] Verleyen, E., Van de Vijver, B., Tytgat, B., Pinseel, E., Hodgson, D. A., Kopalová, K., Chown, S. L., Van Ranst, E., Imura, S., Kudoh, S., Van Nieuwenhuize, W., Sabbe, K., & Vyverman, W. (2021). Diatoms define a novel freshwater biogeography of the Antarctic. *Ecography*, *44*, 548-560.

- [37] R Core Team. (2020). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>.
- [38] Wickham, H. (2016). *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. Springer-Verlag New York. ISBN 978-3-319-24277-4, <https://ggplot2.tidyverse.org>.
- [39] Hillebrand, H., Dürselen, C. D., Kirschtel, D., Pollinger, U., & Zohary, T. (1999). Biovolume calculation for pelagic and benthic microalgae. *Journal of Phycology*, 35(2), 403–424.
- [40] Pushkareva, E., Kviderová, J., Šimek, M., & Elster, J. (2017). Nitrogen fixation and diurnal changes of photosynthetic activity in Arctic soil crusts at different development stage. *European Journal of Soil Biology*, 79, 21–30.
- [41] Stewart, W., Fitzgerald, G., & Burris, R. (1967). In situ studies on N₂ fixation using the acetylene reduction technique. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 58(5), 2071-2078.
- [42] Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Horn, M., & Glöckner, O. F. (2013). Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Research*, 41(1), 1-11.
- [43] Illumina, Inc. 2021.09.08, 参照. 次世代シーケンスの定義と重要な概念. <https://jp.illumina.com/science/technology/next-generation-sequencing/beginners/glossary.html>.
- [44] Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina Sequence Data. *Bioinformatics*, btu170.
- [45] Schloss, P. D., Westcott, S. L., Ryabin, T., Hall, J. R., Hartmann, M., Hollister, E. B., Lesniewski, R., Oakley BParks, D., Robinson, C., Sahl, J., Stres, B., Thallinger, G., Van Horn, D., & Weber, C. F. (2009). Introducing mothur: Open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(23), 7537–7541.
- [46] Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J., & Glöckner, F. O. (2013). The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research*, 41(D1).
- [47] Edgar, R. C., Haas, B. J., Clemente, J. C., Quince, C., & Knight, R. (2011). UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 27(16), 2194–2200.
- [48] Kandlikar, G. S., Gold, Z. J., Cowen, M. C., Meyer, R. S., Freise, A. C., Kraft, N., Moberg-Parker, J., Sprague, J., Kushner, D. J., & Curd, E. E. (2018). ranacapa: An R package and Shiny web app to explore environmental DNA data with exploratory statistics and interactive visualizations. *F1000Research*, 7, 1734.
- [49] McMurdie, P. J., & Holmes, S. (2013). Phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLoS ONE*, 8(4).
- [50] Oksanen, J., Blanchet, F. G., Friendly, M., Kindt, R., Legendre, P., McGlinn, D., Minchin, P. R., O’Hara, R. B., Simpson, G. L., Solymos, P., & Wagner, H. (2018). *vegan: Community Ecology Package*. R package version 2.5.2. 2018.
- [51] 土居 秀幸 & 岡村 寛. (2011). 生物群集解析のための類似度とその応用：R を使った類似度の算出、グラフ化、検定. *日本生態学会誌*, 61, 3-20.
- [52] Chao, A., & Jost, L. (2012). Coverage-based rarefaction and extrapolation: standardizing samples by completeness rather than size. *Ecology*, 93, 2533-2547.

- [53] Kolde, R. (2019). pheatmap: Pretty Heatmap. R package version 1.0.12.
- [54] Lex, A., Gehlenborg, N., Strobel, H., Vuillemot, R., & Pfister, H. (2014). UpSet: Visualization of Intersecting Sets. *IEEE Transactions on Visualization and Computer Graphics*, 20(12), 1983–1992.
- [55] Nakai, R., Wakana, I., & Niki, H. (2021). Internal microbial zonation during the massive growth of marimo, a lake ball of *Aegagropila linnaei* in Lake Akan. *iScience*, 24(7), 102720, ISSN 2589-0042.
- [56] Tanabe, Y., Yasui, S., Osono, T., Uchida, M., Kudoh, S., & Yamamuro, M. (2017). Abundant deposits of nutrients inside lakebeds of Antarctic oligotrophic lakes. *Polar Biology*, 40, 603–613.
- [57] Puente-Sánchez, F., Arce-Rodríguez, A., Oggerin, M., García-Villadangos, M., Moreno-Paz, M., Blanco, Y., Rodríguez, N., Bird, L., Lincoln, S. A., Tornos, F., Prieto-Ballesteros, O., Freeman, K. H., Pieper, D. H., Timmis, K. N., Amils, R., & Parro, V. (2018). Viable cyanobacteria in the deep continental subsurface. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(42), 10702-10707.
- [58] Vyverman, W., Verleyen, E., Wilmotte, A., Hodgson, D. A., Willems, A., Peeters, K., Van de Vijver, B., De Wever, A., Leliaert, F., & Sabbe, K. (2010). Evidence for widespread endemism among Antarctic micro-organisms. *Polar Science*, 4, 103-113.
- [59] 国土地理院. 2021.01.29, 参照. 南極の地理空間情報. <https://www.gsi.go.jp/antarctic/index.html>.

8 図表

表1 本研究の目的1, 2, それぞれにおける分析項目を以下の表にまとめた。灰色部の分析は共同研究者が実施した。

目的1, 南極大陸沿岸部である昭和基地周辺の露岩域の湖沼環境における生物群集構造の多様性を解明する

目的2, 露岩域や湖沼の変遷と湖底マットの生物群集構造との関係を解明する

分析項目	目的1	目的2
細胞容積計測による 生物量分析	●	-
メタバーコーディング 解析による細菌群集構造解析	●	●
窒素固定能分析	●	-
強熱減量	●	-
¹⁴ C年代測定	-	●
磁化率	-	●
γ密度	-	●
粒度分析	-	●
生物起源ケイ酸塩	-	●
コア記載	-	●
軟X線写真	-	●

表2 各湖沼の地学的, 形態学的特徴. Kimura ら (2010)[6], 田邊 & 工藤 (2009)[16], 菅沼ら (2018)[29] を参考にした.

湖沼	緯度	経度	地学的分類	標高 (m)	面積 (km ²)	集水域 (km ²)	最大水深 (m)
菩薩池	69°28.40'S	39°34.23'E	氷河後退湖	130	0.0060	0.0131	4.9
如来池	69°28.66'S	39°34.07'E	氷河後退湖	130	0.0077	0.0277	3.0
仏池	69°28.60'S	39°33.65'E	氷河後退湖	120	0.0096	0.0337	3.0
長池	69°28.24'S	39°35.34.'E	氷河後退湖	70	0.0462	0.1850	10.2
スカーレン大池	69°40.30'S	39°24.65'E	海址湖	10	0.2051	0.8204	9.2

表3 各湖沼堆積物コアサンプルにおいてメタバーコーディング解析による細菌群集解析に供したスライス id, コアの記載長に校正した深度, 付近のスライスで測定された ^{14}C 放射年代を示した. 年代は平均値を示す.

仏池 (記載長 126 cm)			如来池 (記載長 136 cm)			長池 (記載長 130 cm)			スカーレン大池 (記載長 480 cm)		
スライス id	校正した深度 (cm)	測定年代 (cal yr BP)	スライス id	校正した深度 (cm)	測定年代 (cal yr BP)	スライス id	校正した深度 (cm)	測定年代 (cal yr BP)	スライス id	校正した深度 (cm)	測定年代 (cal yr BP)
5	5.8	3,857	3	6.6	NA	3	3.8	507	5	5.3	510
21	26.5	NA	12	30.0	NA	20	29.6	NA	32	37.1	NA
39	51.3	3,095	24	61.6	NA	40	58.5	5,709	81	94.8	2,157
70	94.0	4,357	33	84.6	NA	59	86.0	NA	130	152.5	4,641
77	103.5	NA	41	105.0	NA	81	118.8	6,418	258	304.6	6,281
92	124.0	16,072	50	131.6	NA	87	127.8	6,842	343	410.0	7,227
									375	449.6	NA
									398	478.1	8,262

表 4 各湖沼における湖底マットサンプルの強熱減量 (%) の平均値, 標準偏差, 標準誤差, 変動係数. 各湖沼ごとに 5 サンプルを採取し, それぞれ 3 回測定を行なった結果を示した. Tukey Kramer 検定によって菩薩池, 仏池, 如来池間には有意差が見られなかった一方, これらの湖沼と長池 ($p < 0.01$), スカーレン大池間 ($p < 0.01$), そして長池とスカーレン大池間 ($p < 0.01$) では有意差が見られた.

サンプリング地点	平均値	標準偏差	標準誤差	変動係数
菩薩池	19.30 ^a	3.85	0.99	0.20
如来池	15.86 ^a	6.02	1.55	0.38
仏池	15.57 ^a	2.48	0.64	0.16
長池	2.45 ^b	0.96	0.25	0.39
スカーレン大池	38.31 ^c	13.75	3.55	0.36

表5 各湖沼湖底マットの乾燥サンプル1 gあたりの7分類群の光合成微生物の細胞容積の平均値 ($\text{mm}^3 \text{g}^{-1}$ 乾燥サンプル). 全細胞容積のみ平均値 \pm 標準偏差を示した. 各湖沼につき $n = 15$. >0.01 は $0.01(\text{mm}^3 \text{g}^{-1}$ 乾燥サンプル) 未満であることを意味する. No data は観察されていないことを意味する.

サンプリング地点	全細胞容積	単細胞性	糸状性	異質細胞形成	珪藻類	緑藻類	接合藻類	黄緑藻類
		シアノバクテリア	シアノバクテリア	シアノバクテリア				
菩薩池	0.84 \pm 0.54	0.01	0.35	0.19	0.06	0.11	0.12	No data
如来池	0.87 \pm 0.63	0.01	0.17	0.24	0.07	0.06	0.32	No data
仏池	0.58 \pm 0.61	0.06	0.27	0.23	>0.01	0.02	>0.01	No data
長池	1.14 \pm 0.53	>0.01	0.02	0.02	1.10	>0.01	No data	>0.01
スカーレン大池	3.43 \pm 2.57	0.02	1.14	0.38	0.52	1.05	0.33	No data

表6 各湖沼における湖底マットサンプルのニトロゲナーゼ活性 ($\text{nmol N}_2 \text{ day}^{-1} \text{ g}^{-1}$) の平均値, 標準偏差, 標準誤差, 変動係数. 各湖沼ごとに5サンプルを採取し, それぞれ3回測定を行なった結果を示した. >0.01 は0.01未満であることを意味する. Tukey Kramer 検定によって仏池-如来池間と, 菩薩池-長池-スカーレン大池間には95%有意水準における有意差が見られなかった一方, 仏池や如来池と, 菩薩池や長池やスカーレン大池の間には有意差が見られた ($p < 0.01$).

サンプリング地点	平均値	標準偏差	標準誤差	変動係数
菩薩池	0.05 ^a	0.01	0.01	0.24
如来池	0.20 ^b	0.09	0.05	0.46
仏池	0.22 ^b	0.14	0.08	0.61
長池	0.01 ^a	0.01	>0.01	0.94
スカーレン大池	0.07 ^a	0.03	0.02	0.47

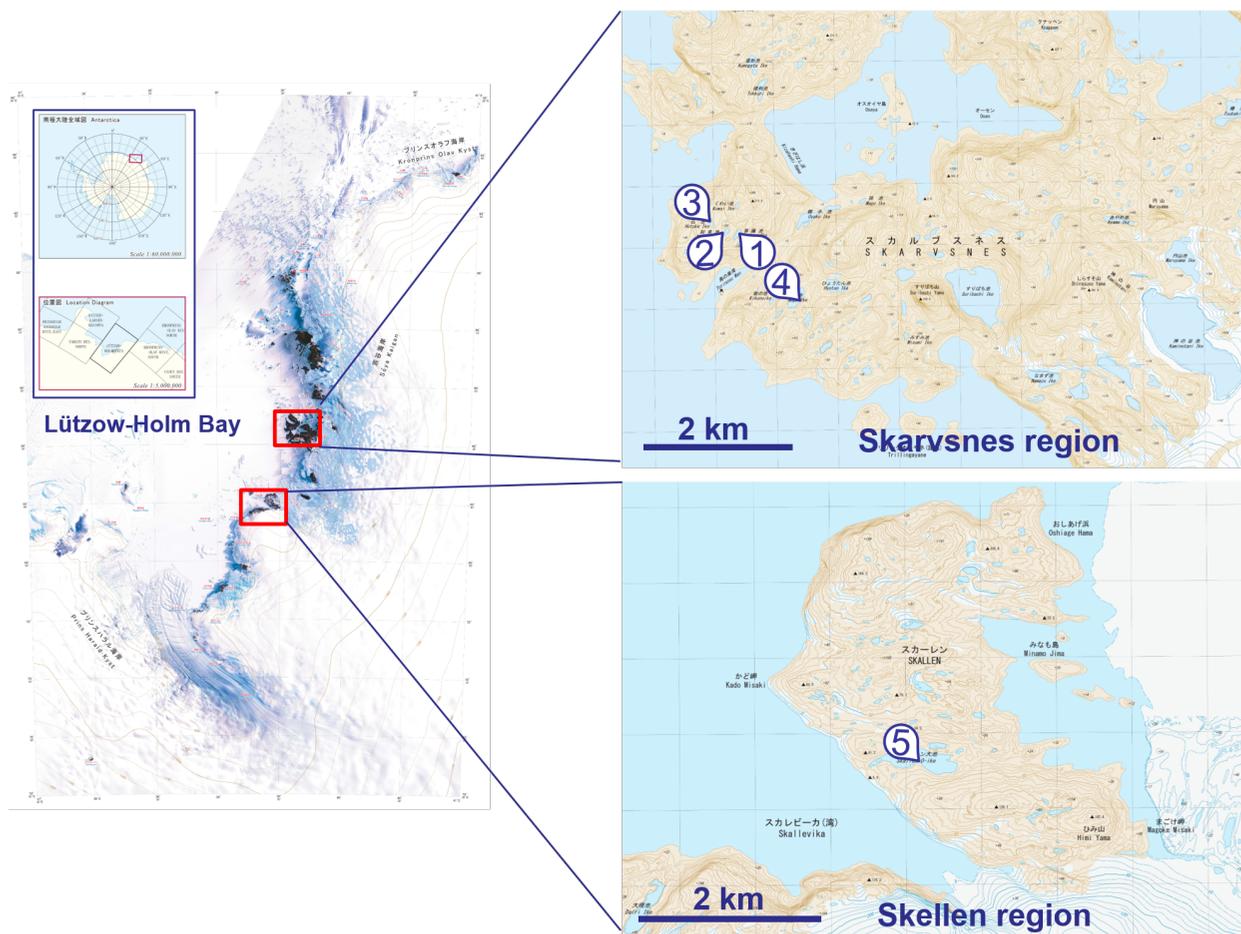


図1 サンプルングを実施した宗谷海岸露岩域における湖沼. スカルブスネス露岩域における4つの氷河後退湖, スカーレン大池における1つの海址湖にて湖底マットを採取した. 図中の1は菩薩池, 2は如来池, 3は仏池, 4は長池, 5はスカーレン大池である. 国土地理院による衛星写真, 地形図を改変した [59].

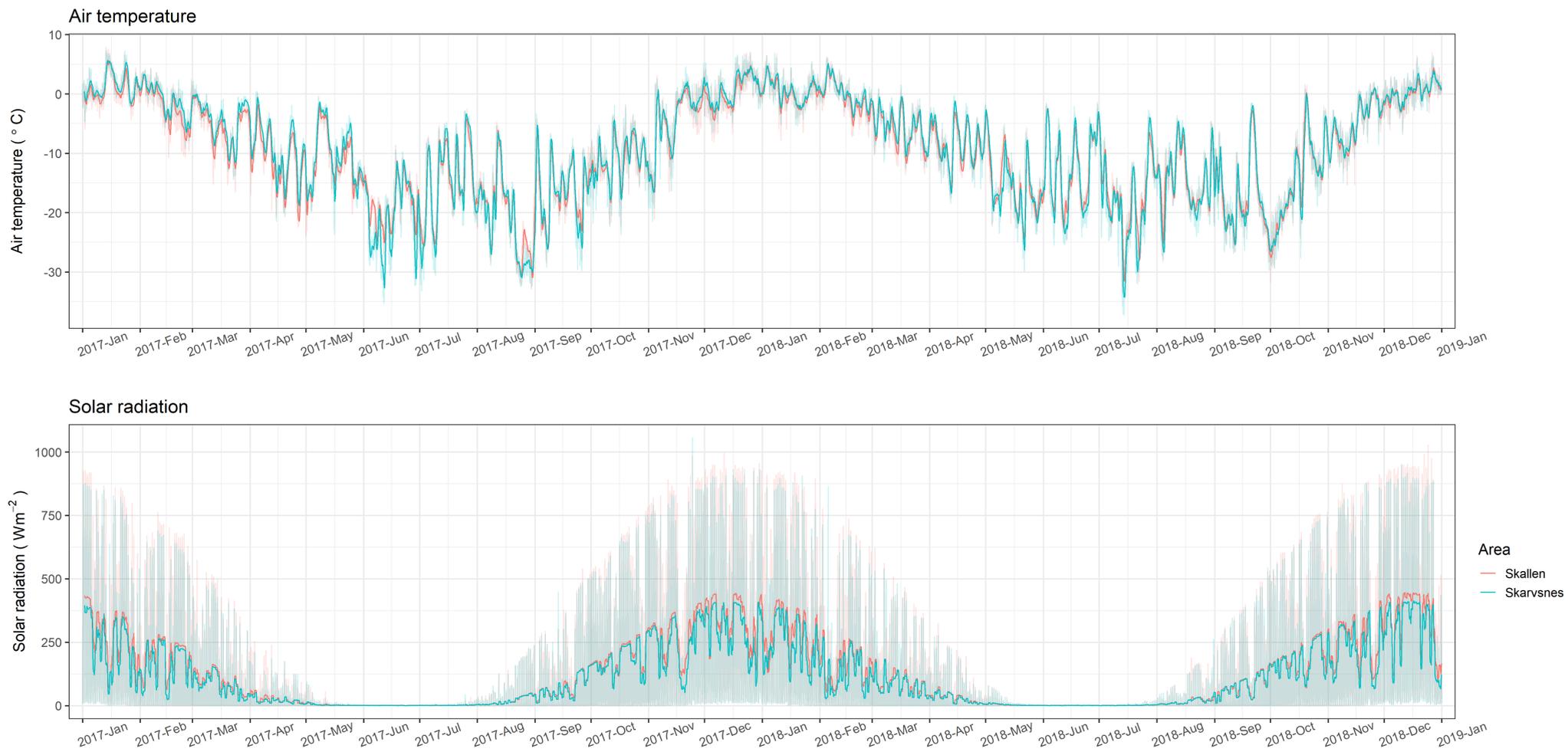
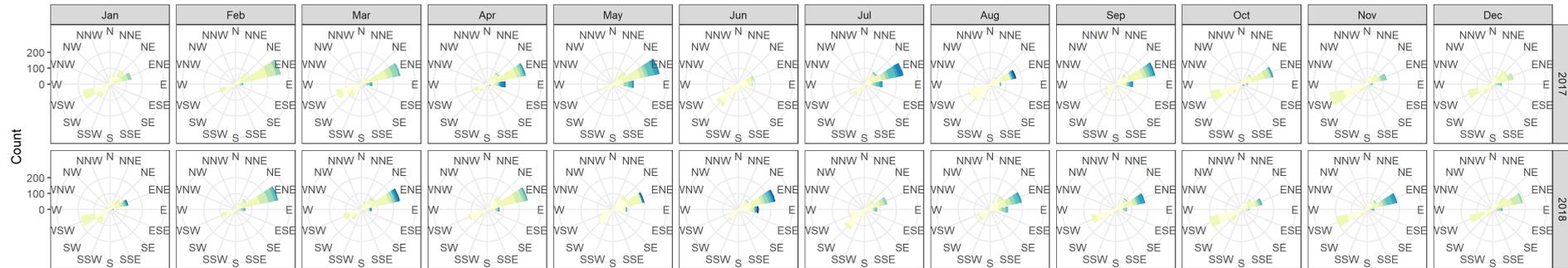


図2 2017年から2018年における気象観測結果。上図は気温，下図は全天日射量について，1時間毎観測値(透過折れ線)と24時間移動平均(実線折れ線)を示した。各色は各地点の時系列変化を表す。

Skarvsnes



Skallen

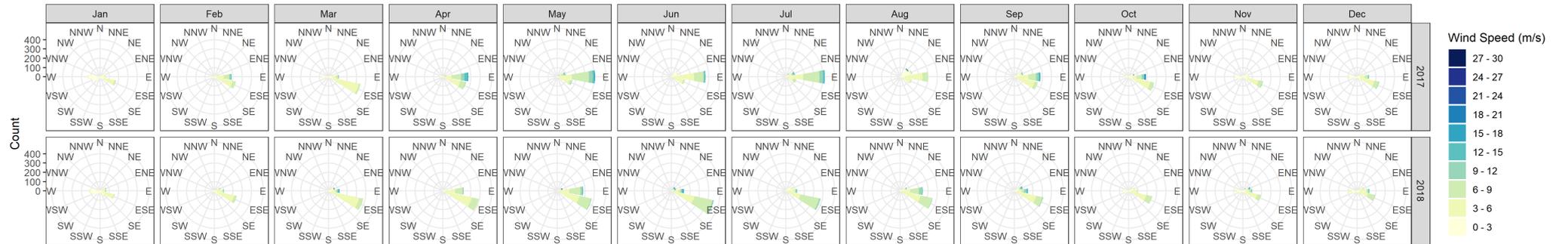


図3 2017年から2018年における気象観測より得られた風配図. 上図はスカルブスネス露岩域, 下図はスカーレン露岩域について, 1時間毎観測値の風向, 風速の頻度を示した. ある風向の花弁が大きいほどその風向の頻度が高いことを示し, 風速ごとに色分けしている.



図4 上；ゴムボートでサンプリングを実施する様子. 下；採取した湖底マット表層サンプル.

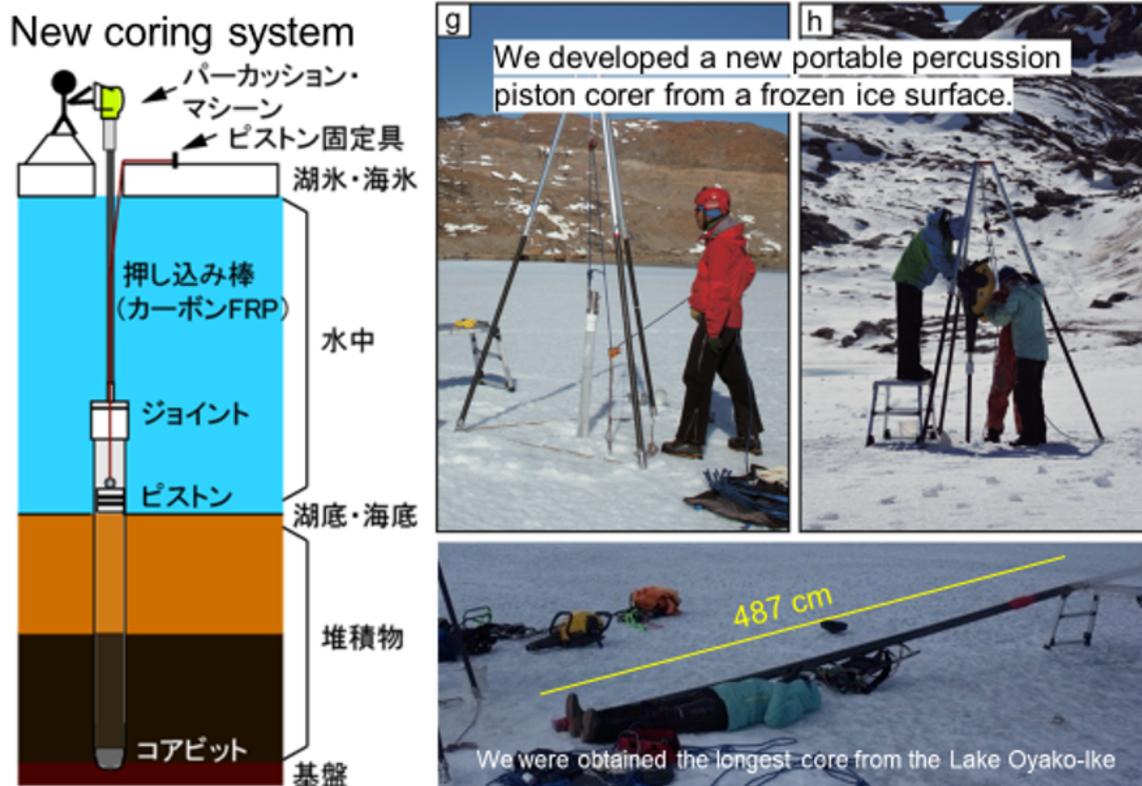


図5 左図；コアリングシステムの概要図. 右上写真；実際にパーカッションコアラールを使用している様子. 右下写真；採取した湖底堆積物コアサンプル. (川又氏作成図を引用)

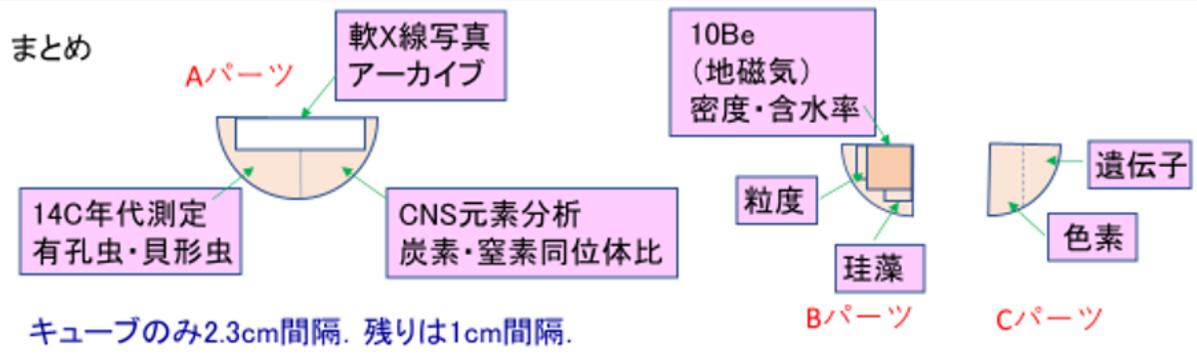


図6 コアサンプルの処理方法, 分析項目を示した. 円柱形のコアサンプルを鉛直方向に切断し, 1 cm ごとにスライスすることで半月形のパーツを得た. パーツをさらに分割し, 各分析に供した. (田邊氏作成図を引用)

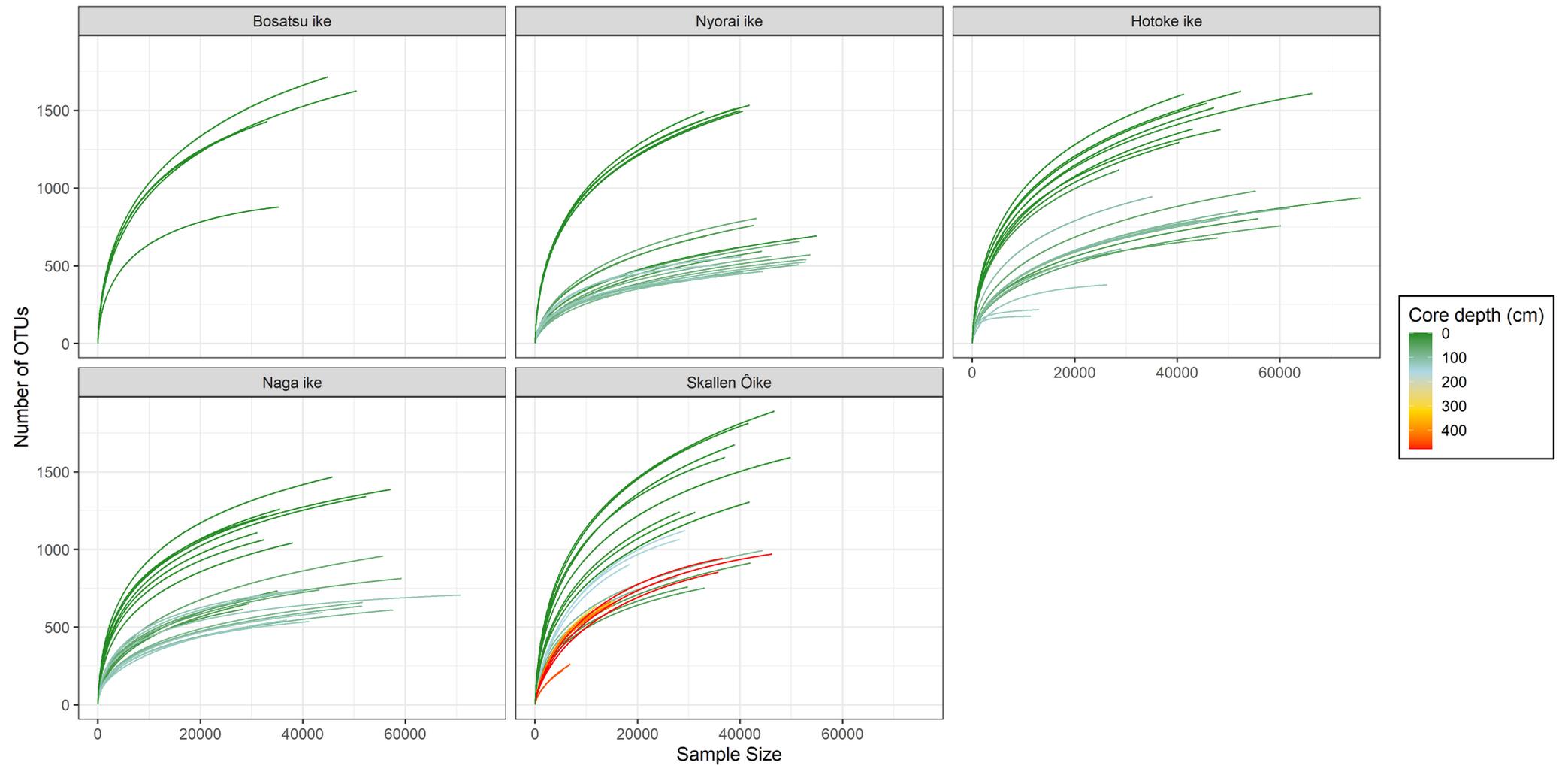


図7 各湖沼の湖底マット表層サンプル、堆積物コアの各深度サンプルにおける群集データから作成した希薄化曲線。サンプルサイズ(リード数)を変えながらランダムリサンプリングを行なったとき、観測される OTU 数がどのように変化するかを示した。

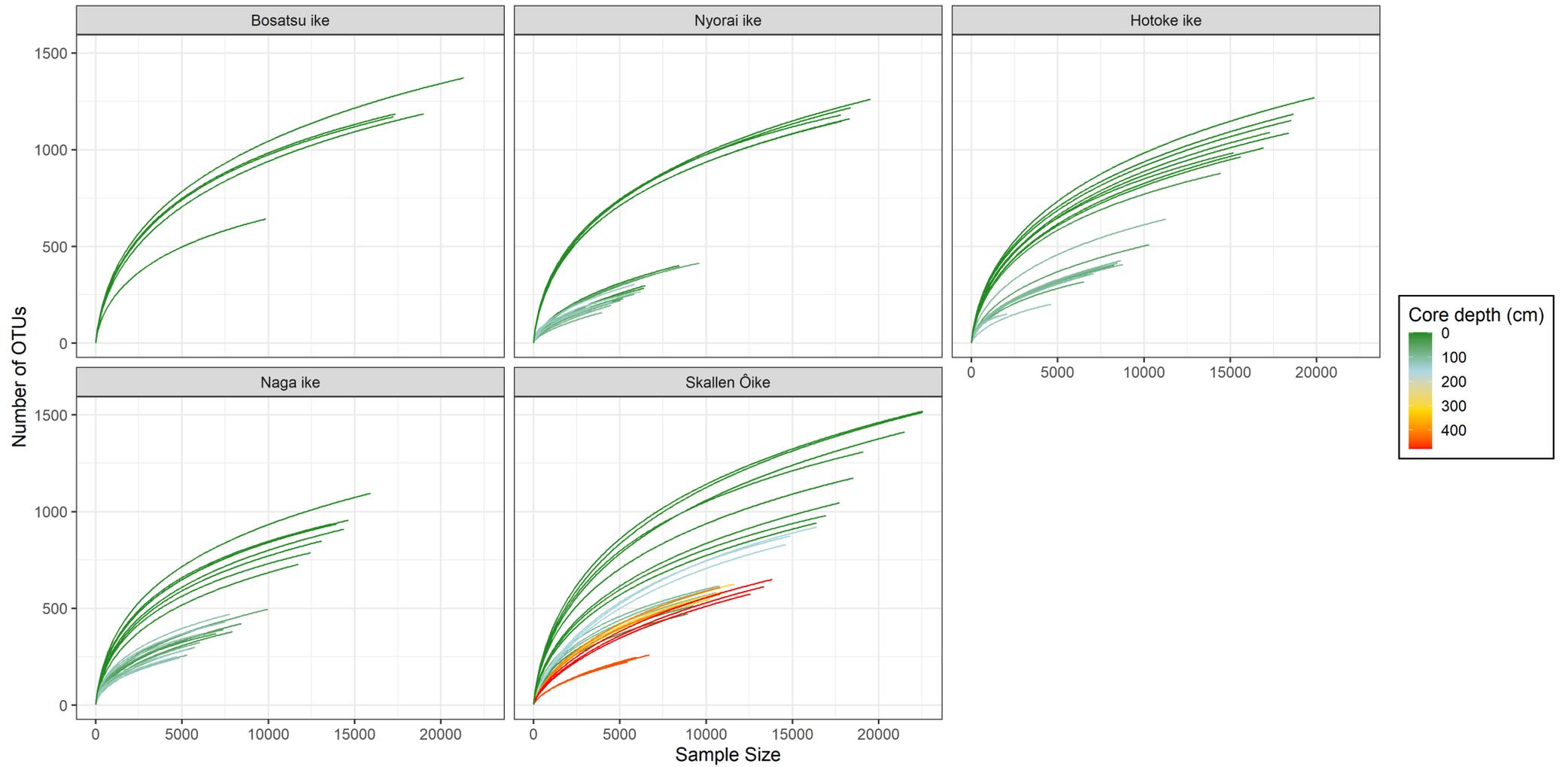


図8 各湖沼の湖底マット表層サンプル、堆積物コアの各深度サンプルにおける Rarefaction 処理をした群集データから作成した希薄化曲線。サンプルサイズ(リード数)を変えながらランダムリサンプリングを行なったとき、観測される OTU 数がどのように変化するかを示した。

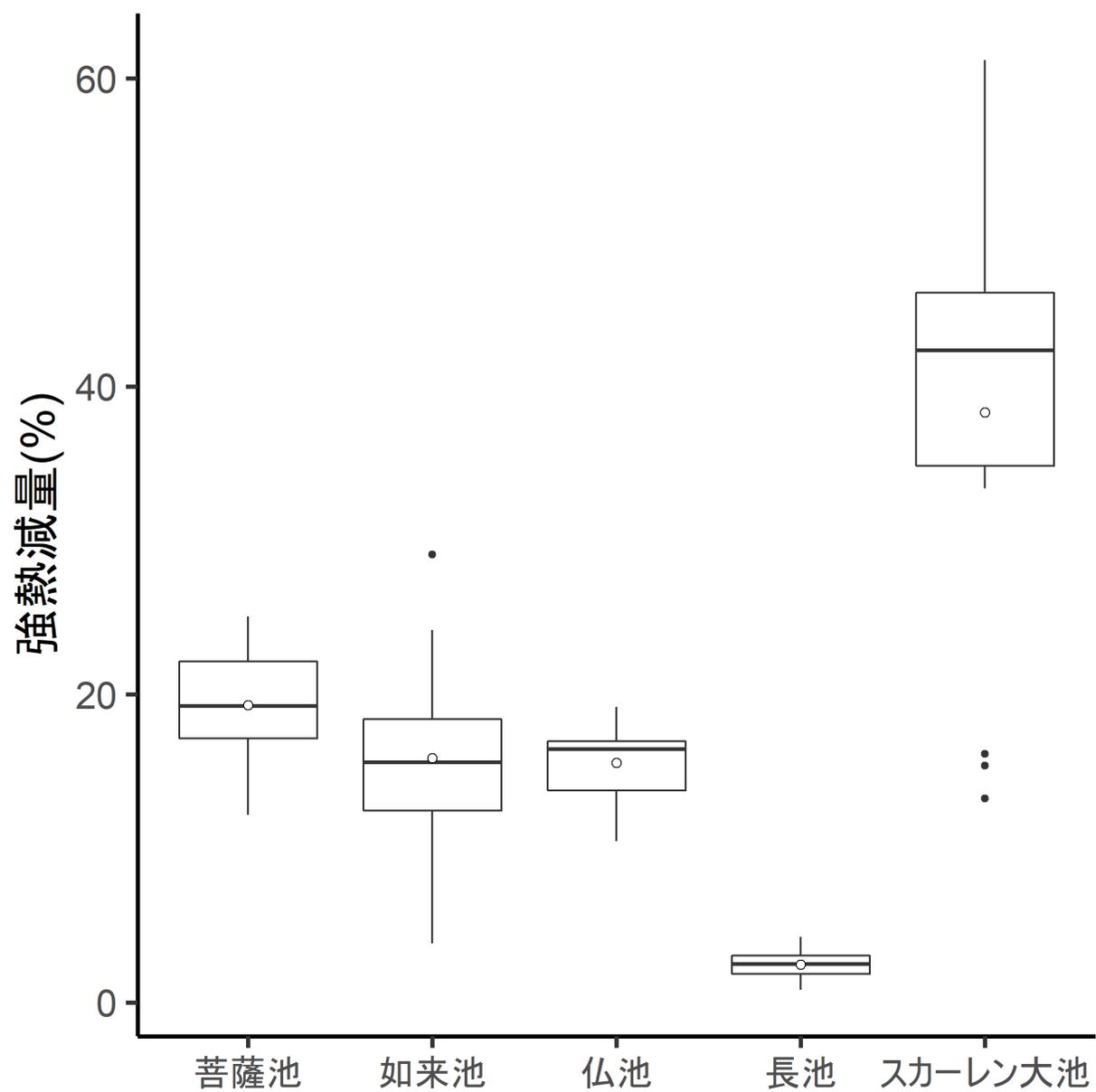


図9 各湖沼における湖底マット表層サンプルの強熱減量 (%). 箱ひげ図中の白丸は平均値を表す. Tukey Kramer 検定によって菩薩池, 仏池, 如来池間には有意差が見られなかった一方, これらの湖沼と長池 ($p < 0.01$), スカーレン大池間 ($p < 0.01$), そして長池とスカーレン大池間 ($p < 0.01$) では有意差が見られた.

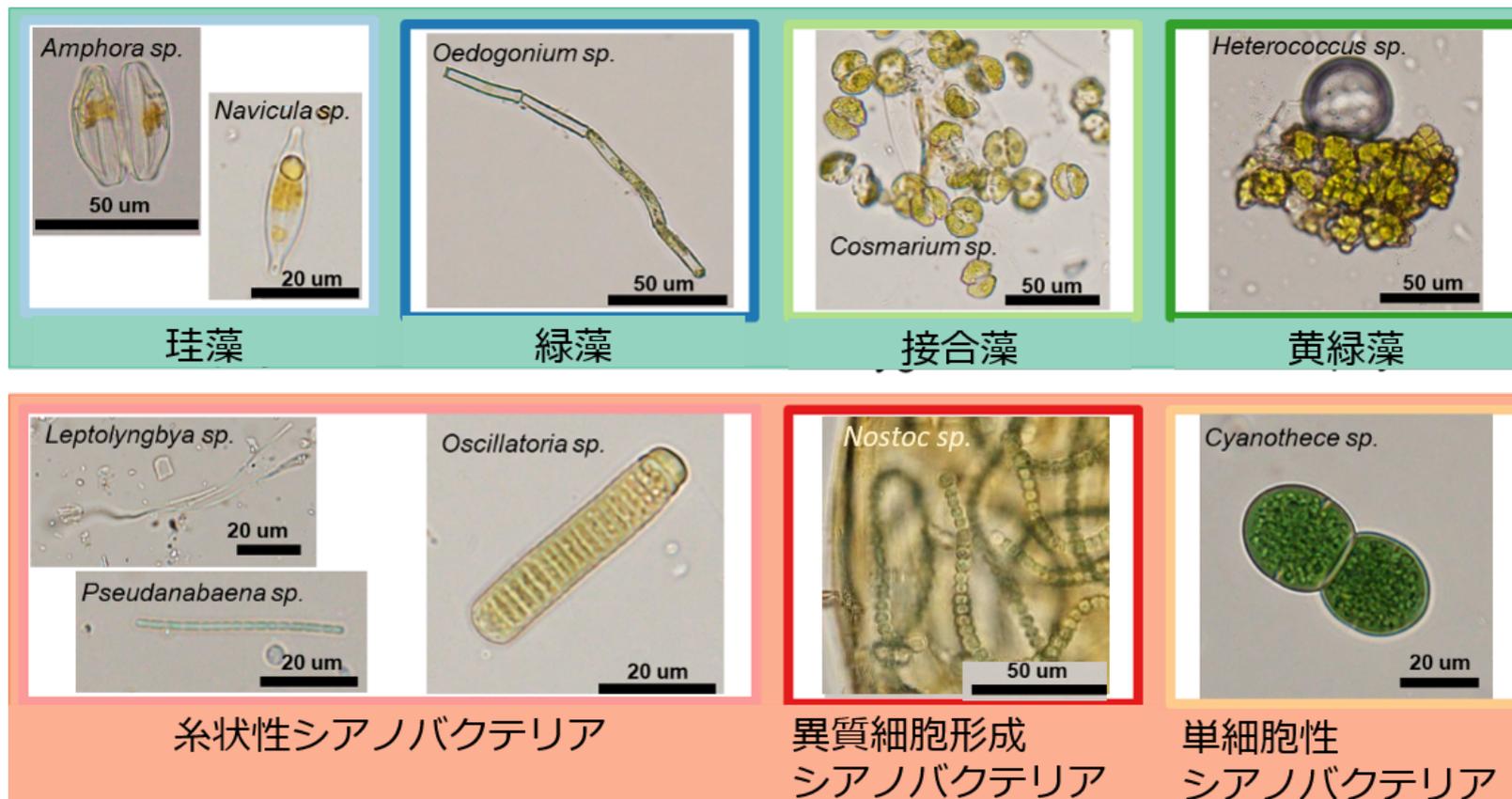


図 10 顕微鏡観察によって撮影された光合成微生物 7つの分類群それぞれの代表種。緑色の背景は真核微細藻類であることを，橙色の背景はシアノバクテリアであることを意味する。推定される属名とスケールをそれぞれの顕微鏡写真に示した。

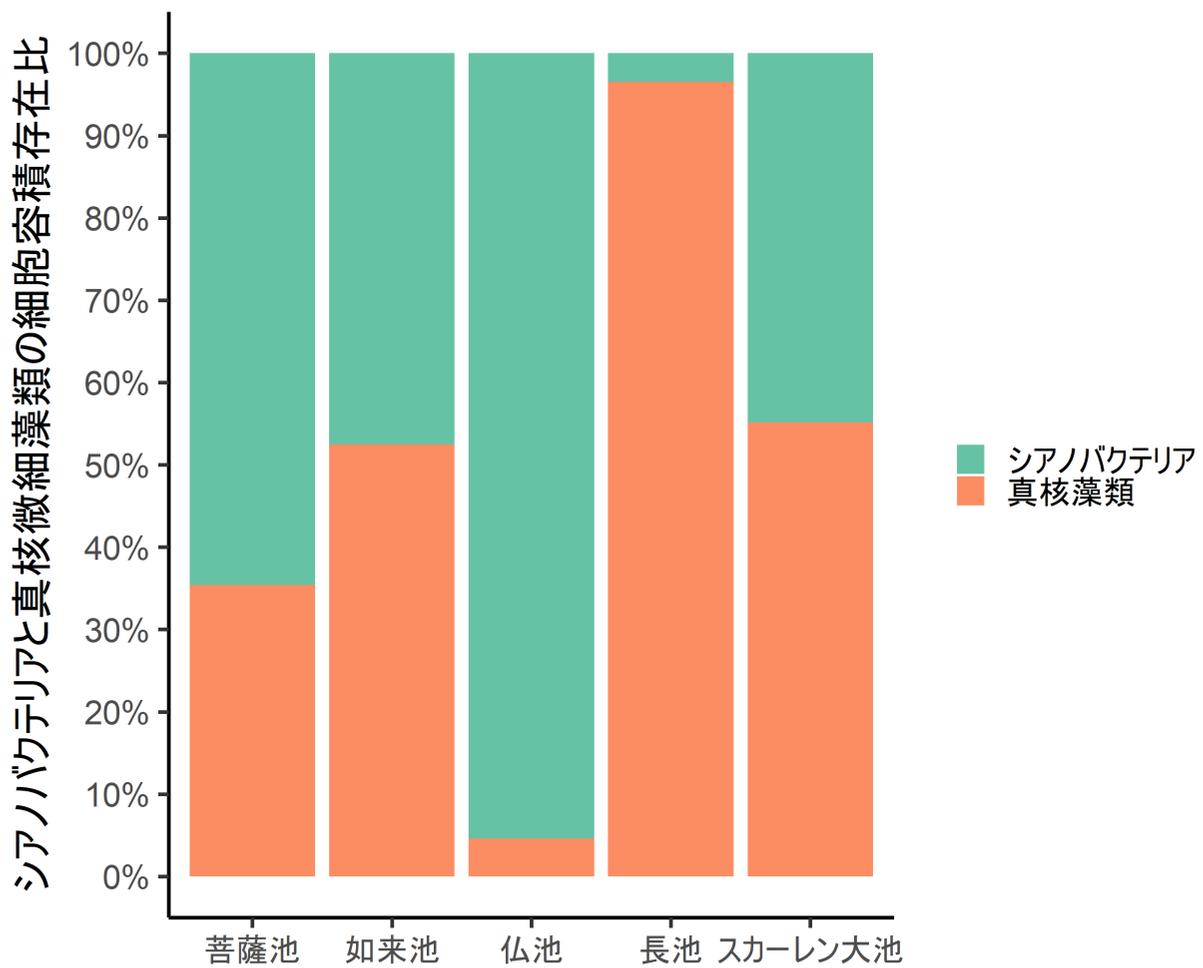


図 11 各湖沼におけるシアノバクテリアと真核微細藻類の細胞容積の存在比。凡例は緑色がシアノバクテリア，橙色が真核微細藻類を示す。

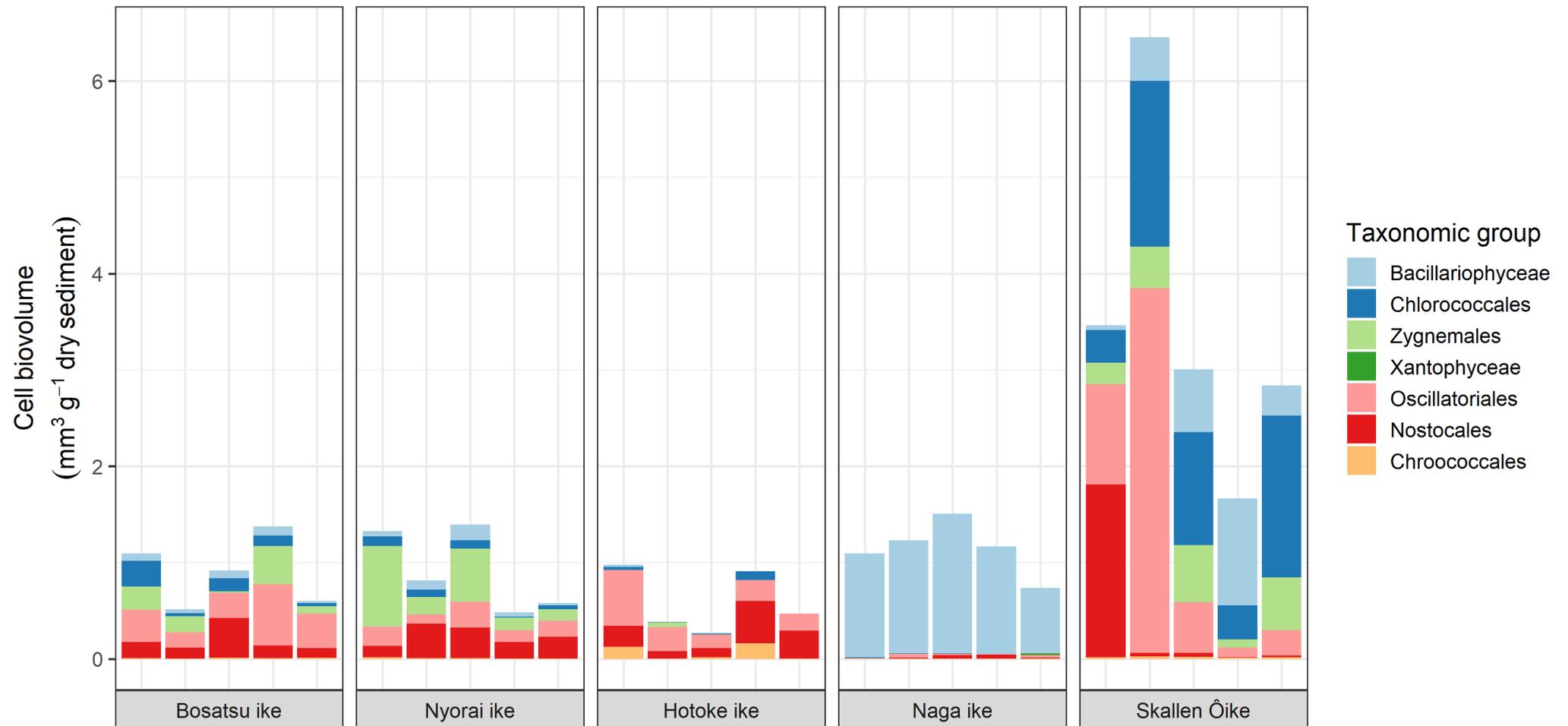


図 12 各サンプリング地点におけるグループごとの細胞容積 (mm³ g⁻¹ 乾燥サンプル). 凡例は, Bacillariophyceae が珪藻類, Chlorococcales が緑藻類, Zygnemales が接合藻類, Xantophyceae が黄緑藻類, Oscillatoriales が糸状性シアノバクテリア, Nostocales が異質細胞形成シアノバクテリア, Chroococcales が単細胞性シアノバクテリアであることを意味する.

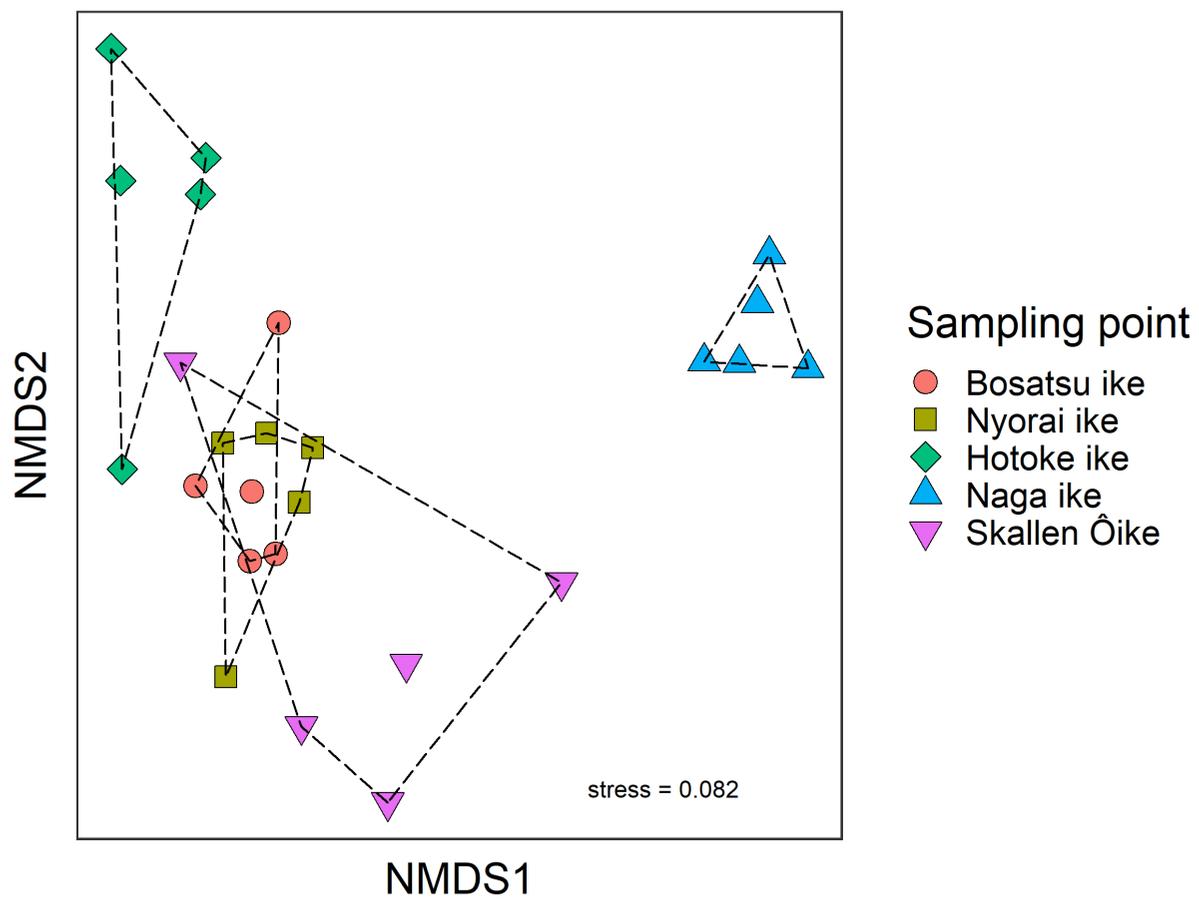


図 13 各サンプリング地点の湖底マット表層サンプルの 7 分類群の細胞容積についての Bray-Curtis 非類似度の距離行列に基づいた NMDS(非計量多次元尺度法) プロット. 湖沼ごとの分散の程度を可視化するために, 各湖沼の外側のプロットどうしを点線でつないだ. 凡例, ストレス値を図中に示した.

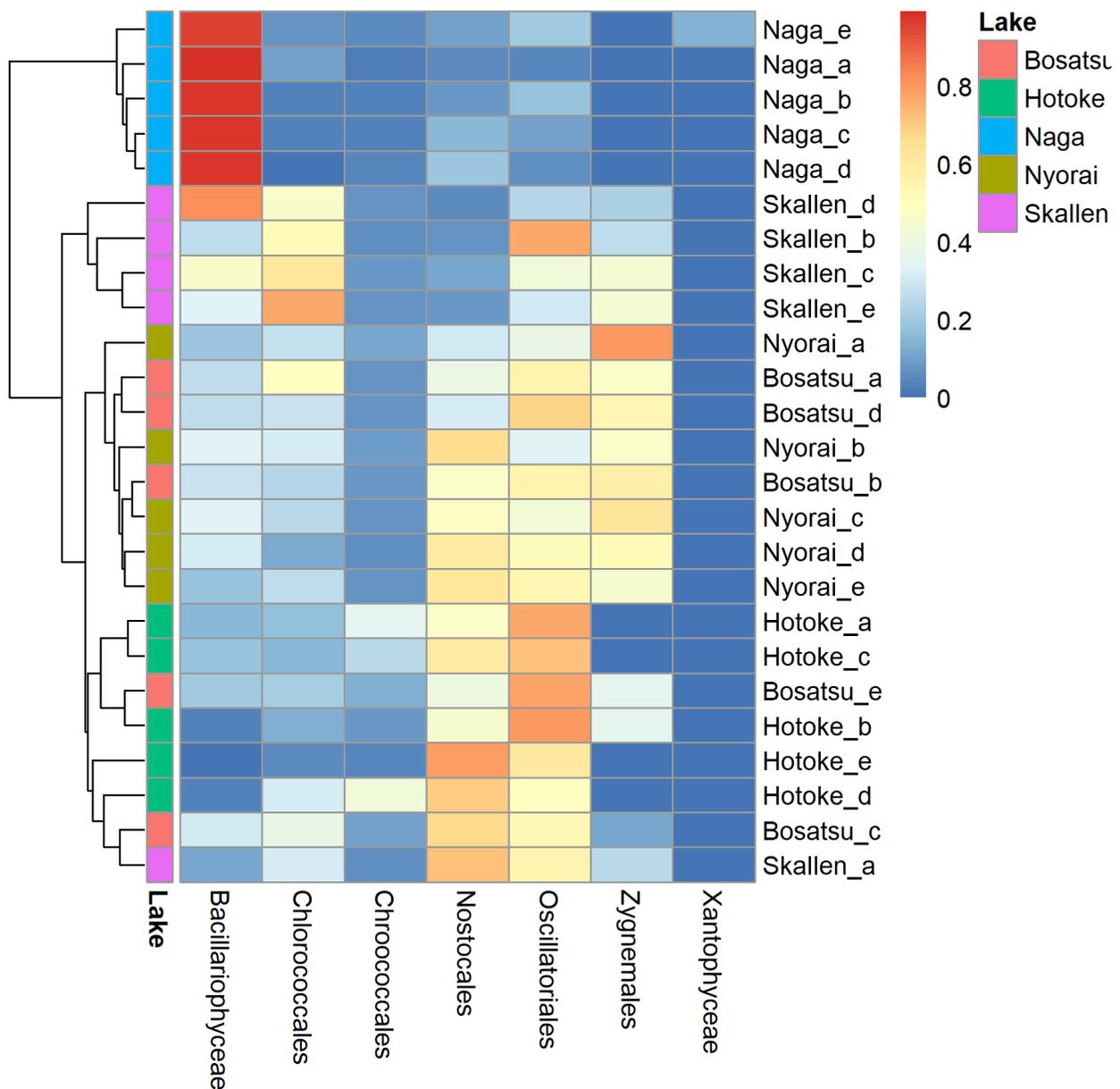


図 14 各湖沼の光合成微生物群集構造についてのクラスター解析に基づく樹状図と各分類群の生物量を示したヒートマップ。サンプル間の Bray-curtis 非類似度に基づいた UPGMA 法によってクラスタリングを行なった。y 軸ラベルは“湖沼_サンプリング地点”を意味する。ヒートマップは数字が大きい = 赤味が強いほど生物量が多いことを示す。

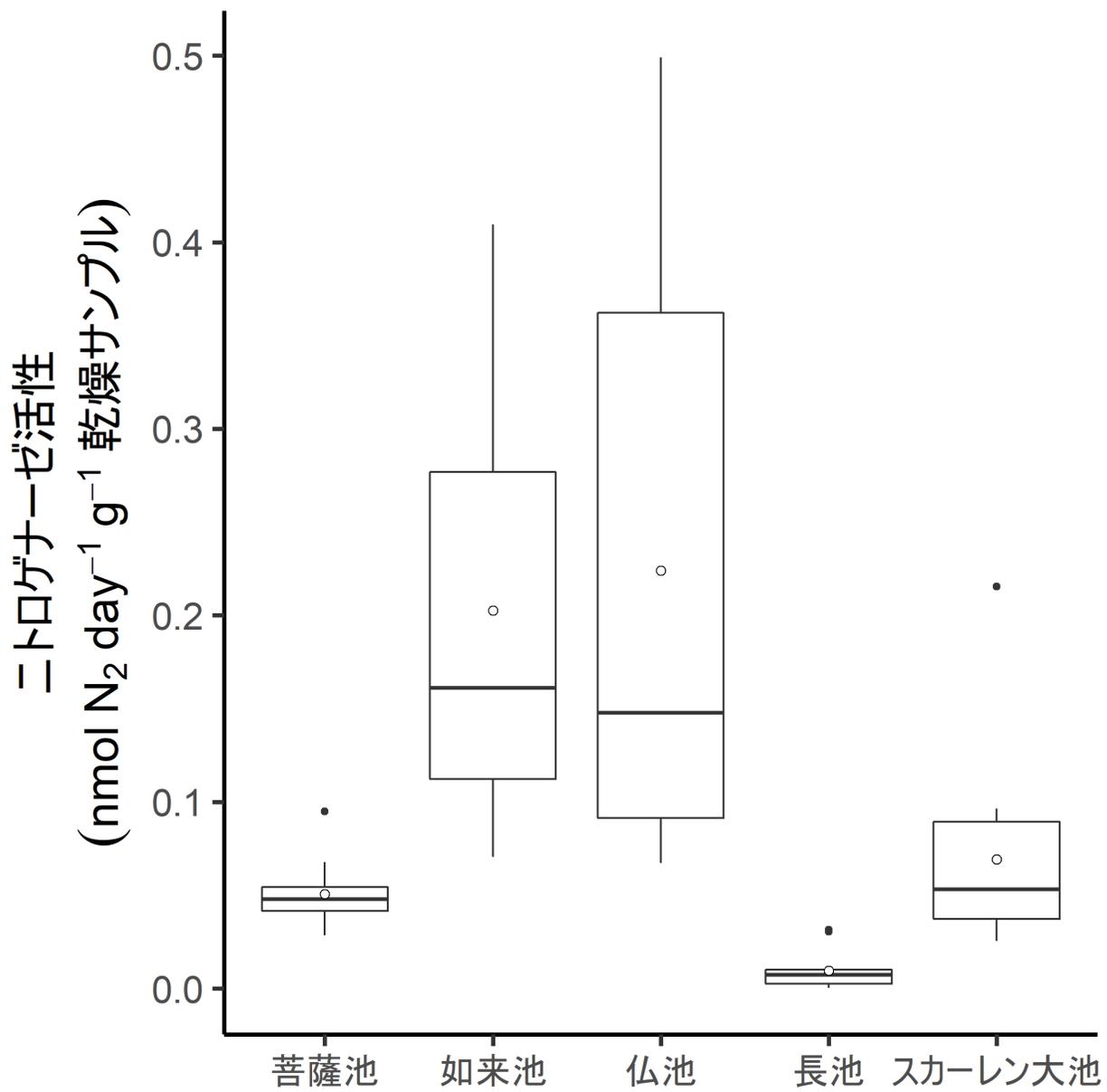


図 15 各湖沼の湖底マット表層サンプルのニトロゲナーゼ活性 ($\text{nmol N}_2 \text{ day}^{-1} \text{ g}^{-1}$ 乾燥サンプル). 箱ひげ図中の白丸は平均値を表す. Tukey Kramer 検定によって仏池-如来池間と, 菩薩池-長池-スカーレン大池間には 95% 有意水準における有意差が見られなかった一方, 仏池や如来池と, 菩薩池や長池やスカーレン大池の間には有意差が見られた ($p < 0.01$).

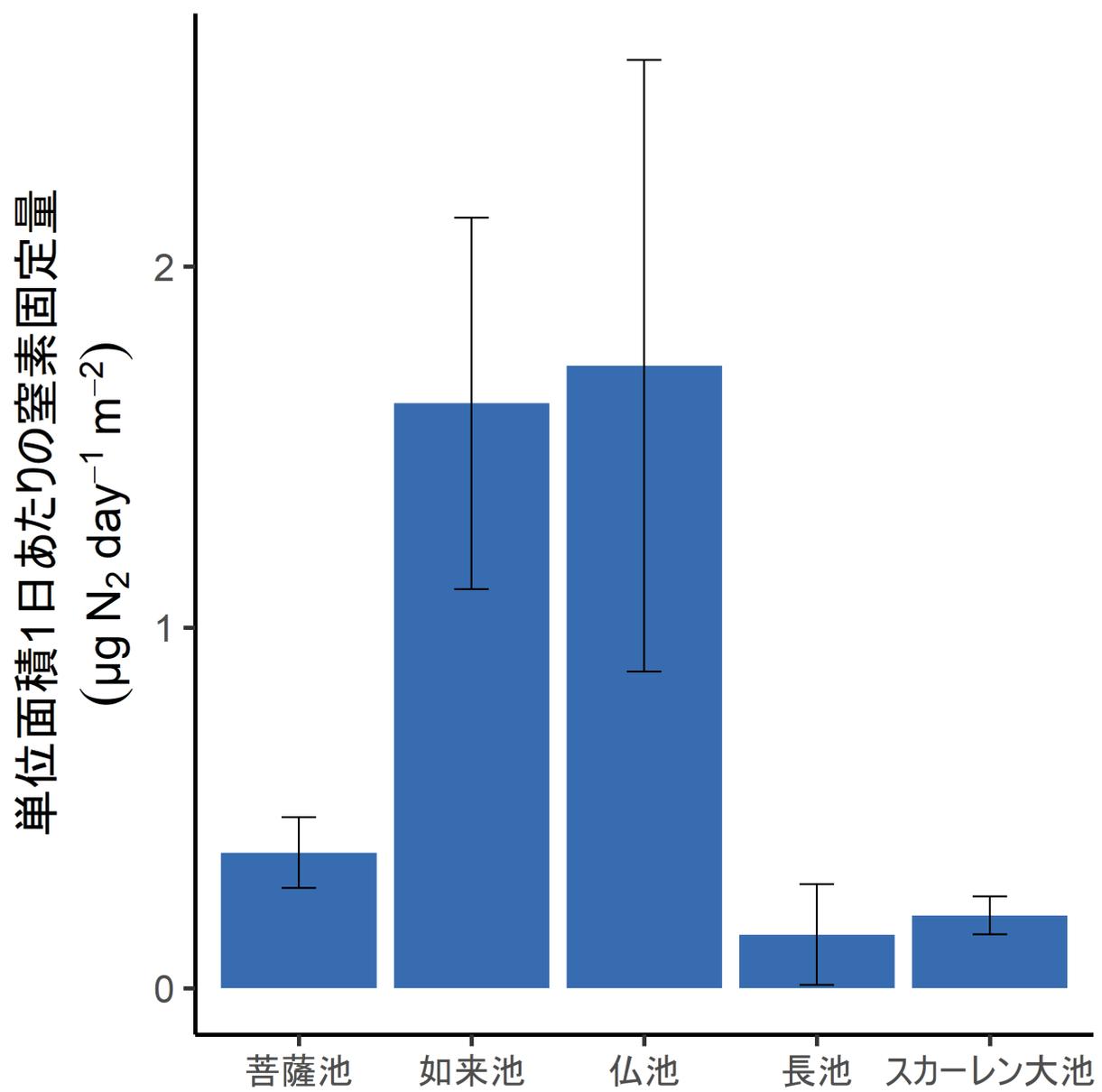


図 16 各湖沼の湖底マット表層サンプル 1 m² において 1 日に固定される窒素量 (μg N₂ day⁻¹ m²). エラーバーは標準偏差を示す。

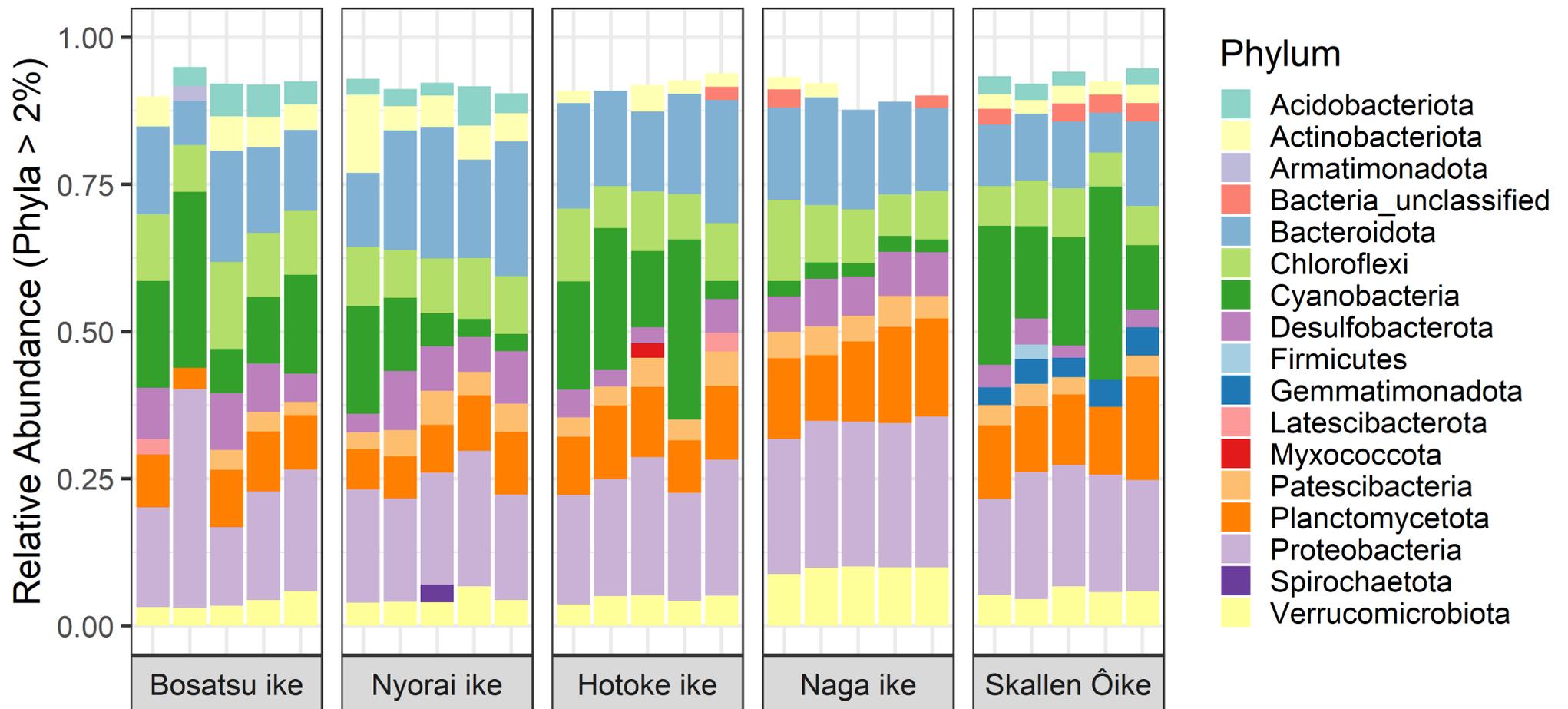


図 17 各サンプリング地点の湖底マット表層サンプルにおける OTU の門レベルの分類による細菌群集構造。OTU について 16S rRNA の門レベルに分類し、相対比が 2% 以上の分類群について積み上げ棒グラフに示した。各湖沼で 5 サンプルを採取し、分析に供したため、各湖沼について 5 本の bar plot が存在する。

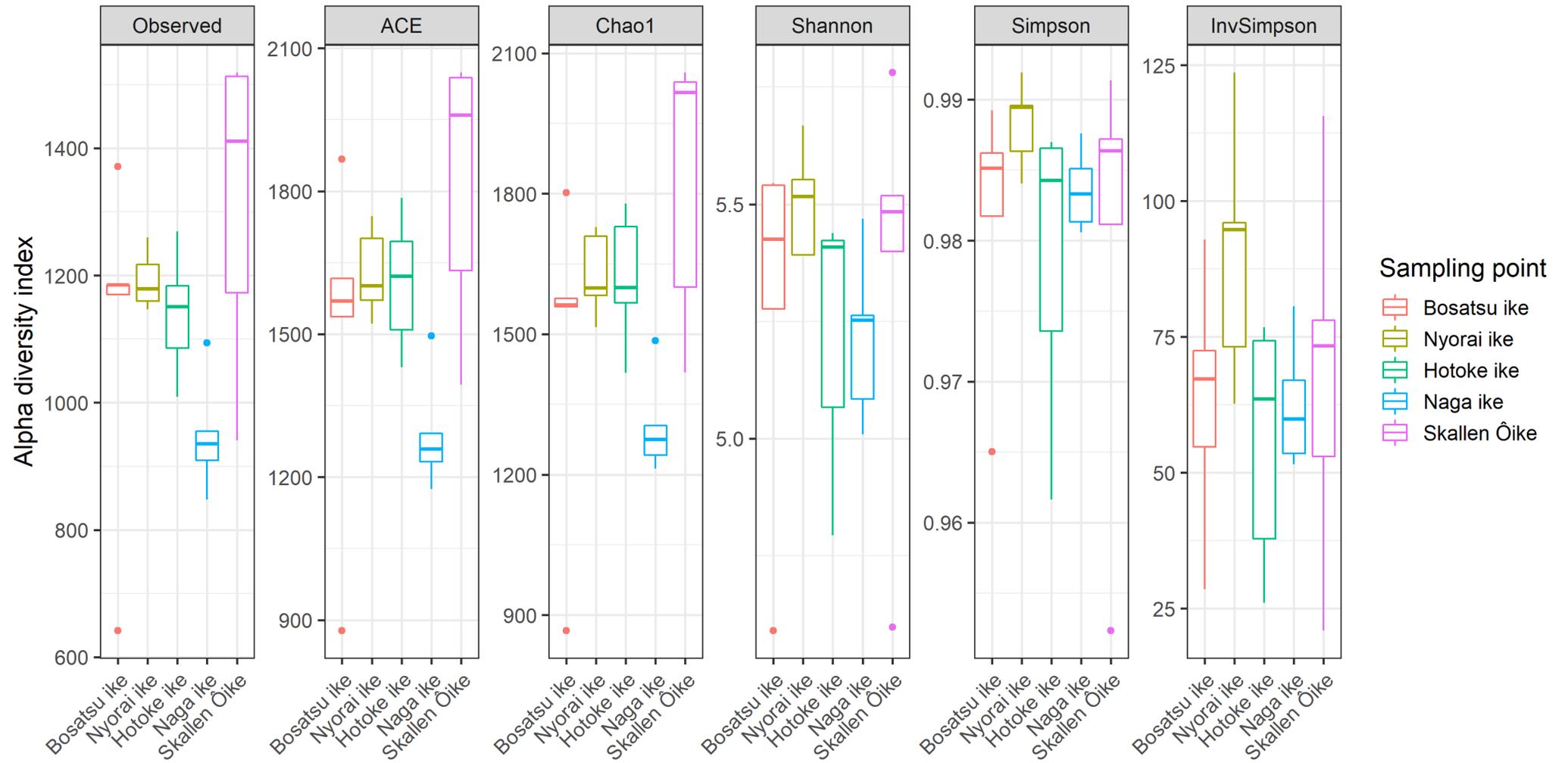


図 18 各湖沼の湖底マット表層サンプルにおける細菌群集の α 多様性. 6つの指標について算出し, 箱ひげ図に示した.

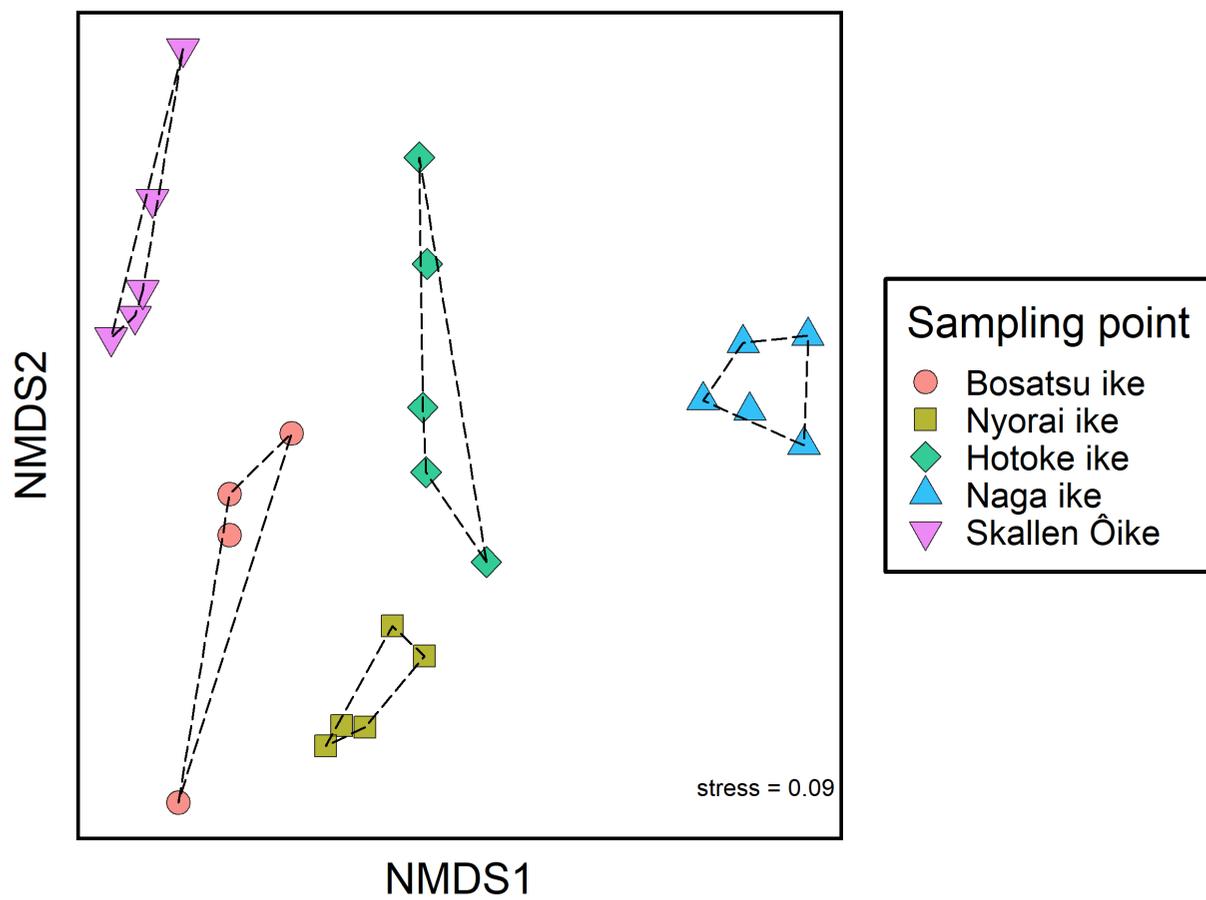


図 19 各サンプリング地点の湖底マット表層サンプルの細菌群集についての Bray-Curtis 非類似度の距離行列に基づいた NMDS(非計量多次元尺度法) プロット. 菩薩池.2 のデータを除去し解析した. 湖沼ごとの分散の程度を可視化するために, 各湖沼の外側のプロットどうしを点線でつないだ. 凡例, ストレス値を図中に示した.

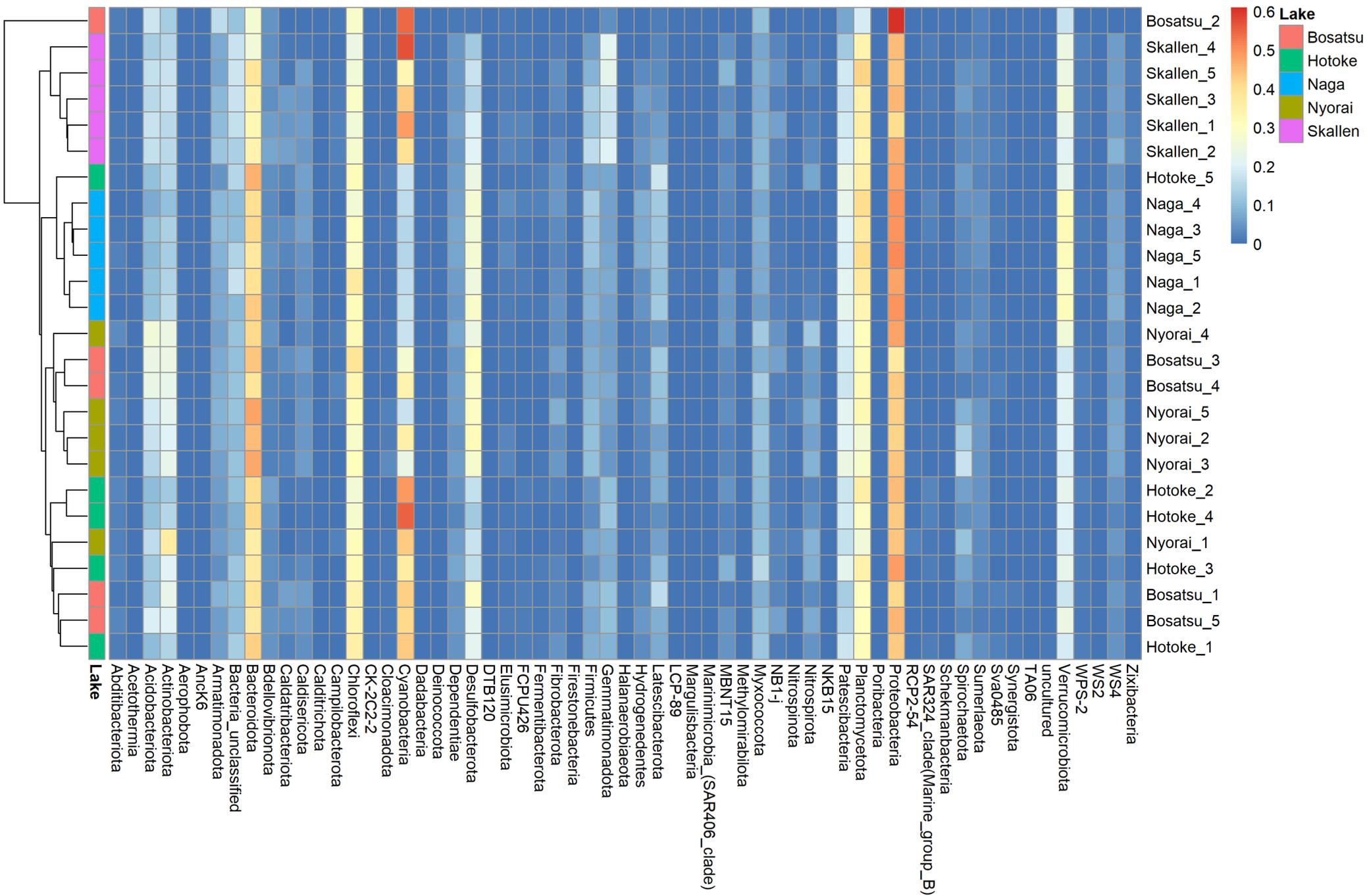


図 20 各サンプリング地点の湖底マット表層サンプルの細菌群集についての Bray-Curtis 非類似度の距離行列に基づいた UPGMA 法によってクラスタリングを行った。同時に門レベルでの細菌群集の出現レベル (Hellinger 変換したリード数) をヒートマップとして示した。

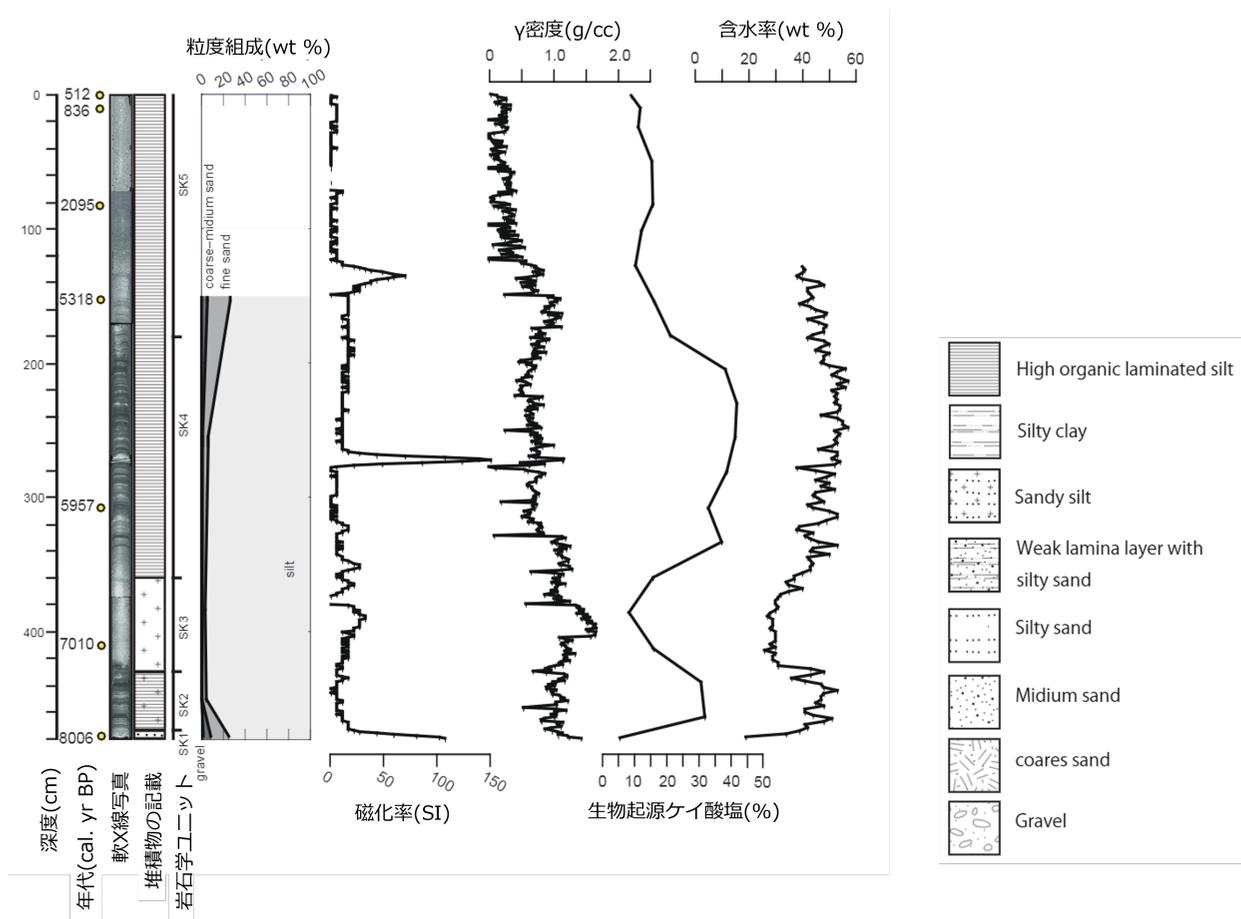


図 21 スカレン大池の湖底堆積物コアの柱状図，物理化学的性質を示した．y 軸はコア記載長を示す．データは左から，放射年代，軟 X 線写真，堆積物の記載，岩石学ユニット，粒度組成，磁化率， γ 密度，生物起源ケイ酸塩，含水率である．(川又氏作成図を引用)

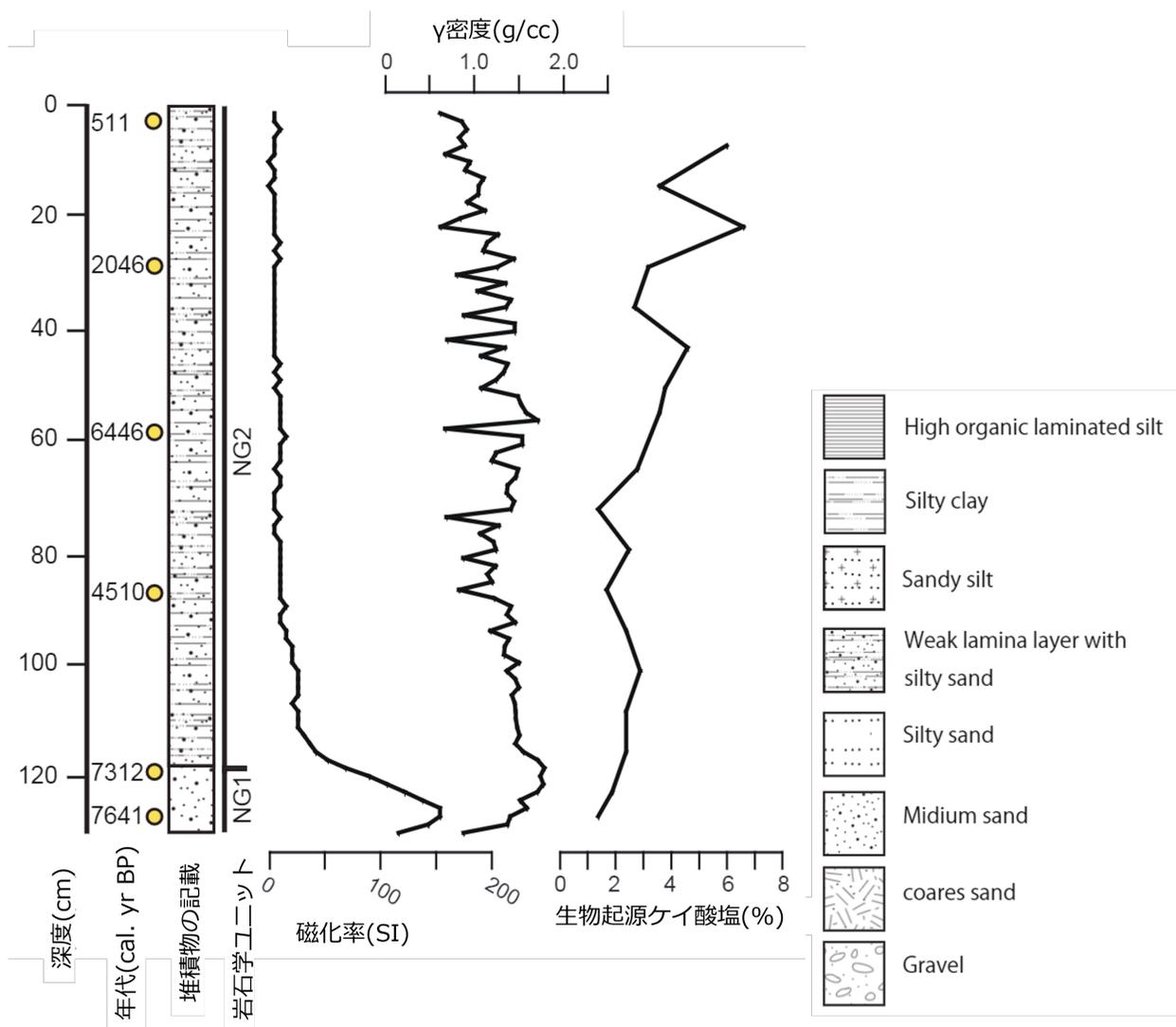


図 22 長池の湖底堆積物コアの柱状図，物理化学的性質を示した．y 軸はコア記載長を示す．データは左から，放射年代，堆積物の記載，岩石学ユニット，磁化率， γ 密度，生物起源ケイ酸塩である．(川又氏作成図を引用)

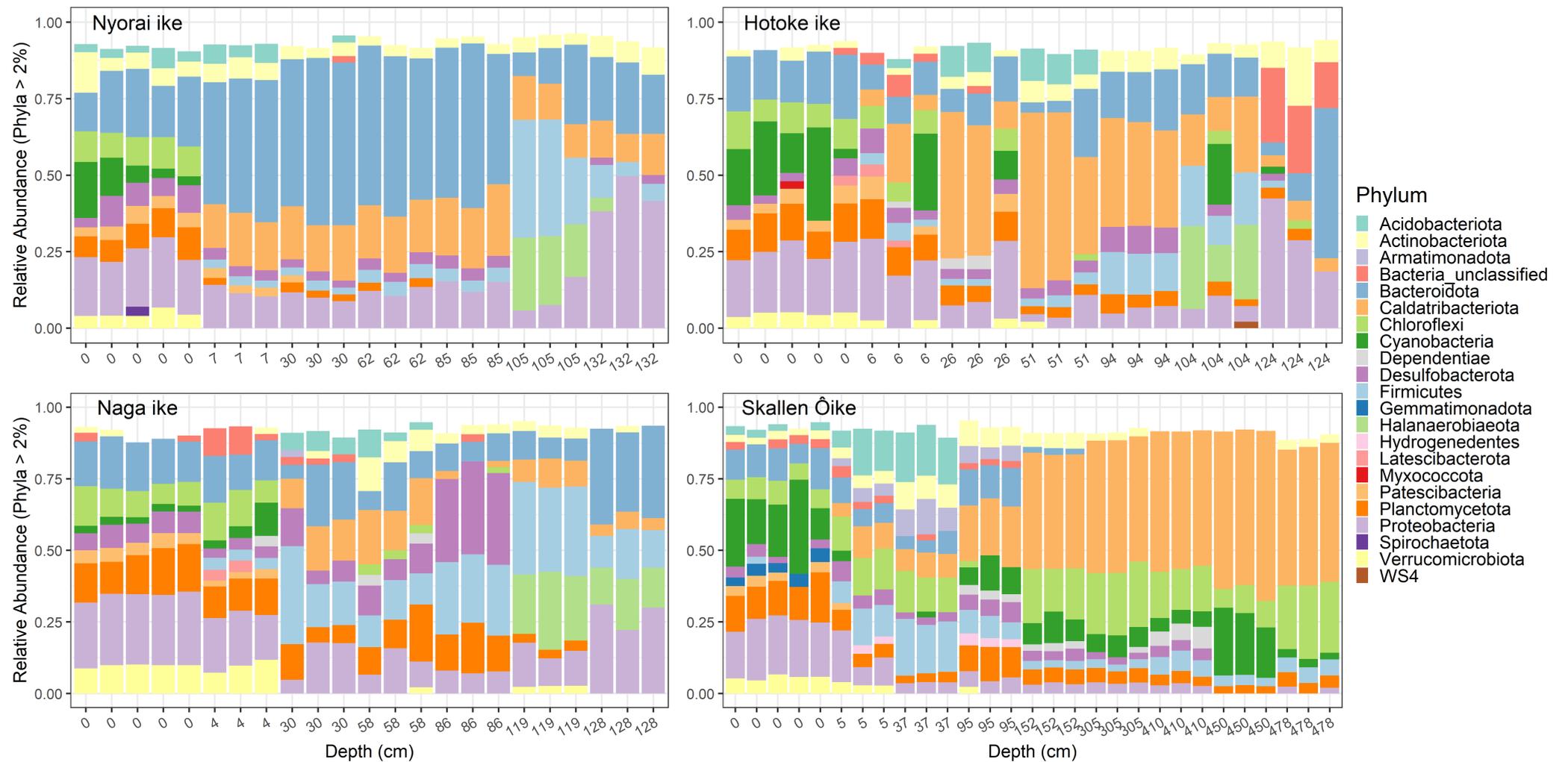


図 23 各湖沼の湖底マット、各湖沼・各深度の湖底堆積物コアサンプルにおける OTU の門レベルの分類による細菌群集。各 OTU について門レベルに分類し、相対比が 2% 以上の分類群について積み上げ棒グラフに示した。x 軸ラベルは分析を行なったスライスの校正した深度を意味する。各マットサンプル、コアスライスについて 5 回もしくは 3 回分析を実施した。湖沼の名称を各グラフの左上に、各分類群の色凡例をグラフの右に示した。

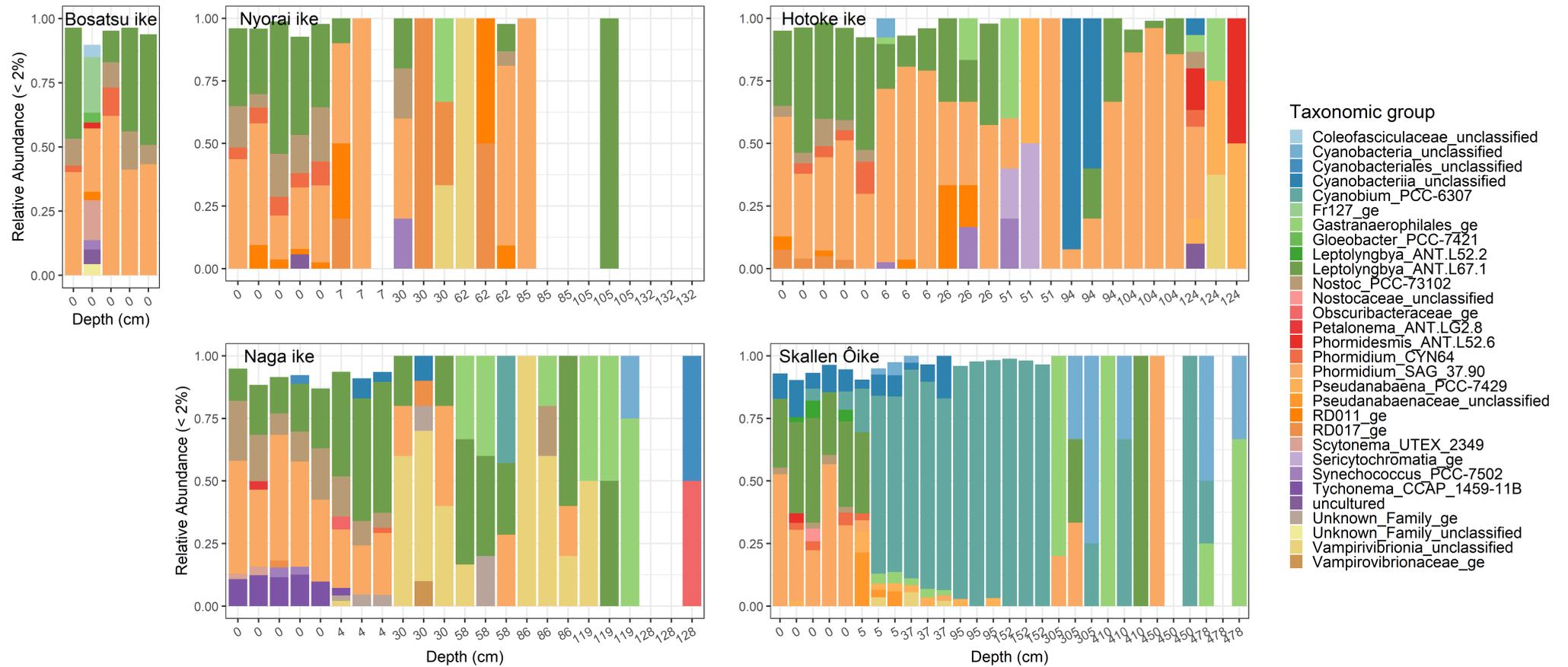


図 24 各湖沼の湖底マット，各湖沼・各深度の湖底堆積物コアサンプルにおける OTU の属レベルの分類によるシアノバクテリア群集構造。細菌群集データからシアノバクテリア門を抽出し，各 OTU について属レベルに分類し，相対比が 2% 以上の分類群について積み上げ棒グラフに示した。x 軸ラベルは分析を行ったスライスの校正した深度を意味する。各マットサンプル，コアスライスについて 5 回もしくは 3 回分析を実施した。湖沼の名称を各グラフの左上に，各分類群の色凡例をグラフの右に示した。

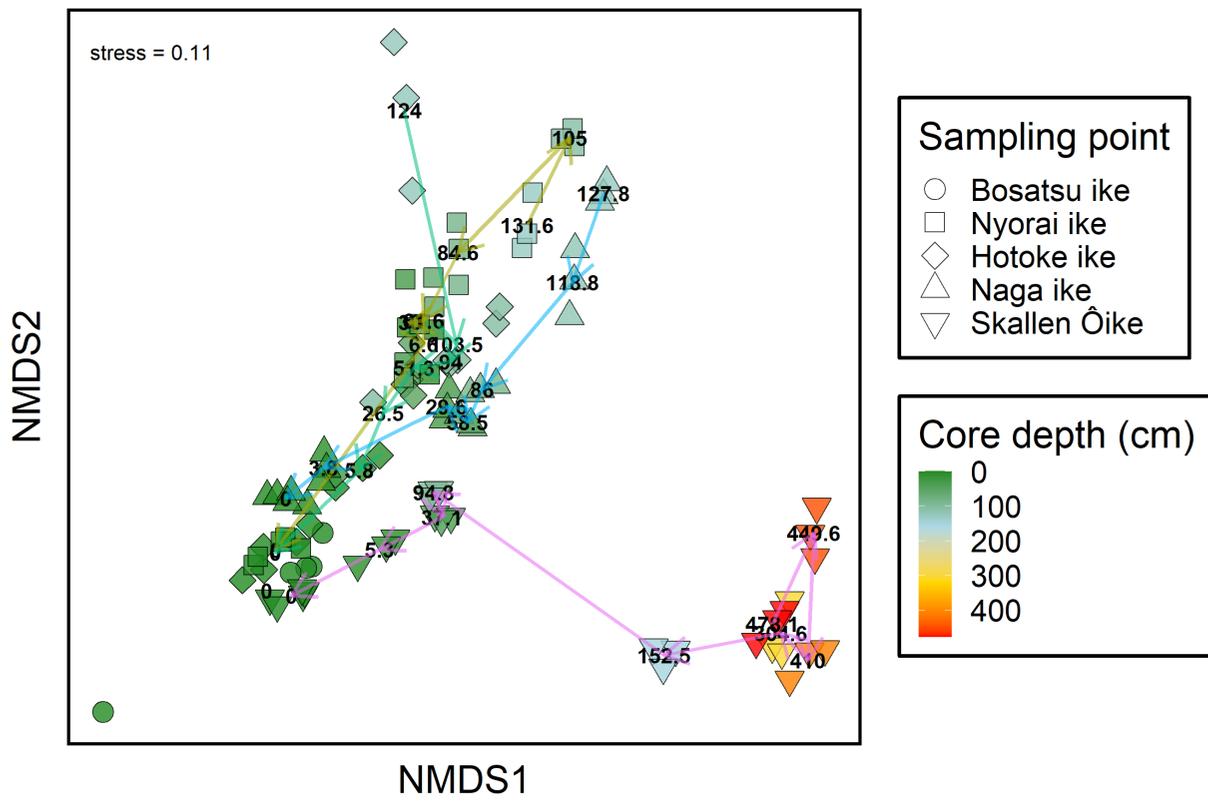


図 26 各湖沼の湖底マット，湖底堆積物コアの細菌群集についての Bray-Curtis 非類似度の距離行列に基づいた NMDS(非計量多次元尺度法) プロット. シンボルの形状が各湖沼を，色が堆積物中の深度を示す.，ストレス値を図中に示した. 各湖沼の各深度のプロットの重心をとり，コアの深いサンプルの重心から浅いサンプルの重心へ向けて矢印でつないだ.

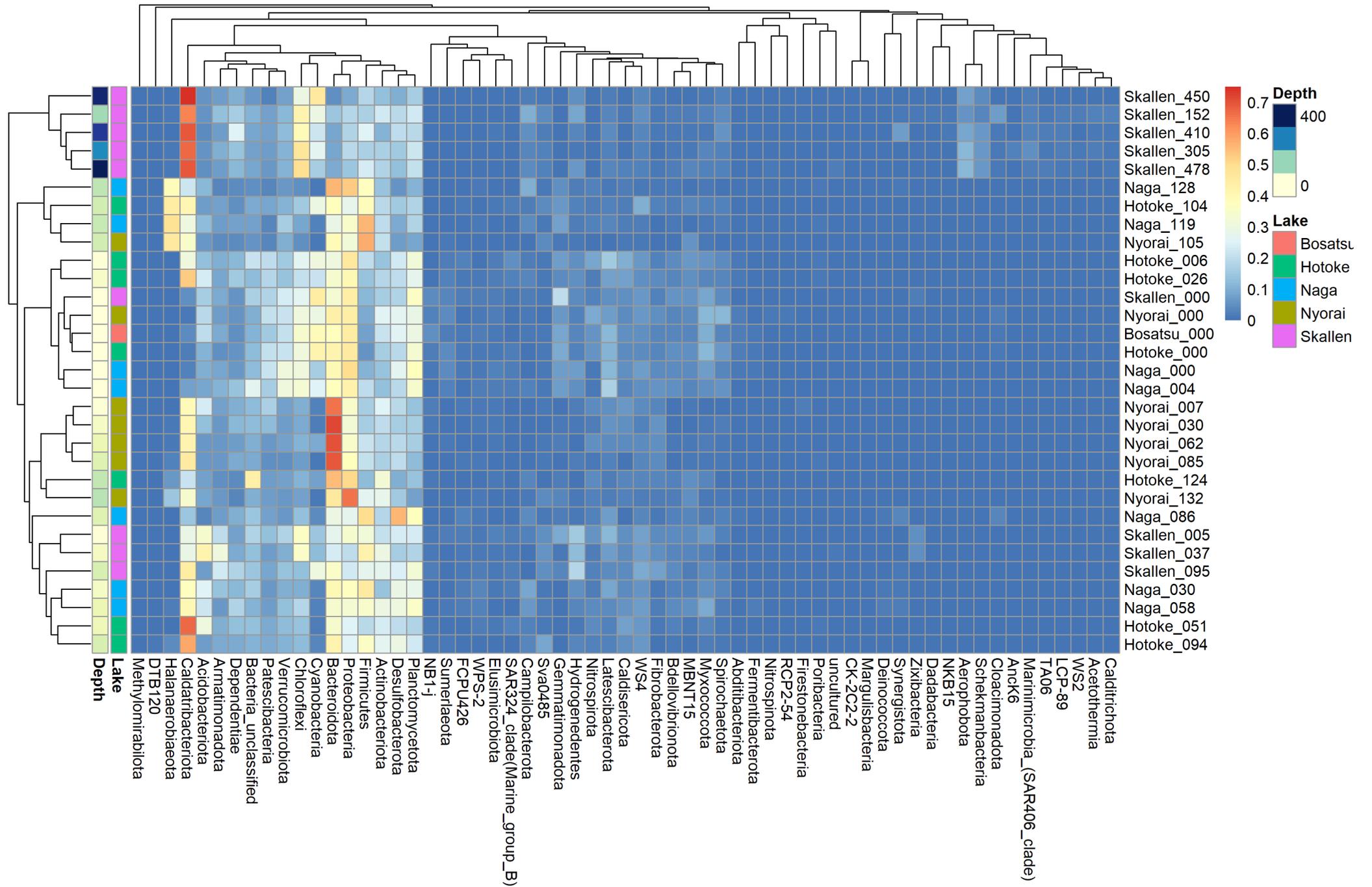


図 27 各湖沼の湖底マット，湖底堆積物コアの細菌群集についての Bray-Curtis 非類似度の距離行列に基づいた UPGMA 法によってクラスタリングを行った。同時に門レベルでの細菌群集の出現レベル (Hellinger 変換したリード数) をヒートマップとして示した。

Phylum

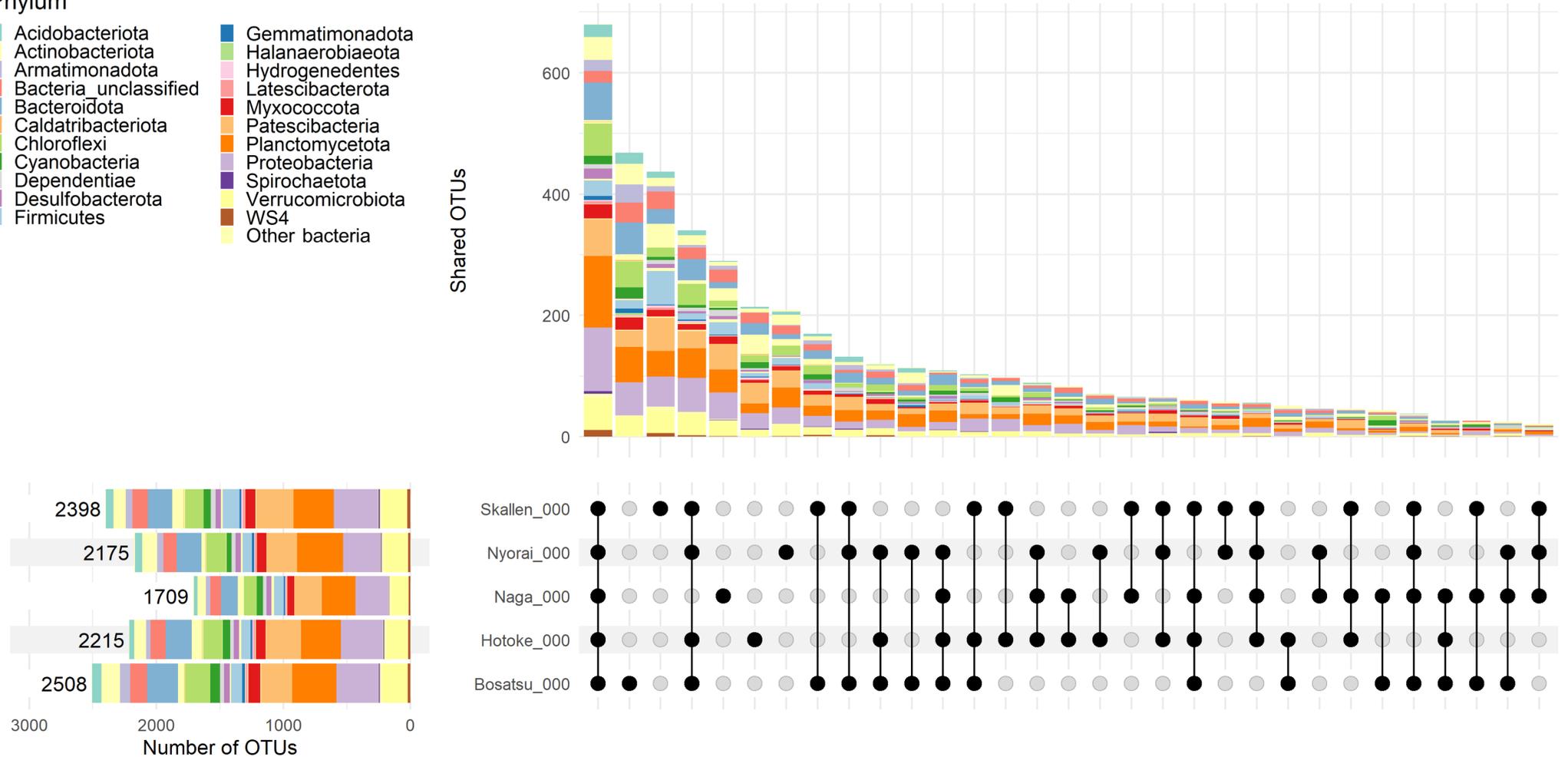
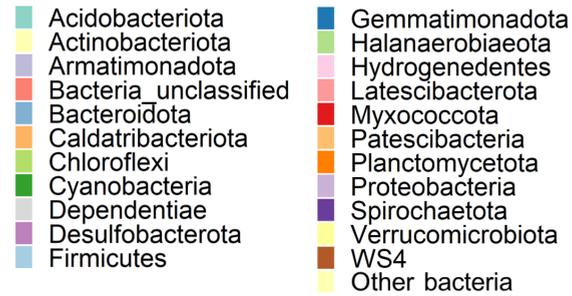


図 28 各湖沼の湖底マット表層サンプルにおける細菌群集の UpSet プロット。左図では、各湖沼における門レベルの分類群ごとの OTU 数を棒グラフに示し、合計 OTU 数を各プロット左端に付した。右図では、サンプル間で共有する OTU 数、もしくはあるサンプルにのみ存在する OTU 数を降順で示した。右図下部の実線で繋がれた●、もしくは独立した●は、それぞれ該当する湖沼サンプルから検出された OTU の積集合であること、ある湖沼でのみ検出された OTU であることを意味する。右図上部では、右図下部で示した各集合の要素数 (OTU 数) と、その分類学的な内訳 (門レベルの分類) を積み上げ棒グラフで示した。●が 1 つの場合は、どのサンプルとも共有していない OTU であることを意味する。細菌分類群の凡例を図中に示した。

Phylum

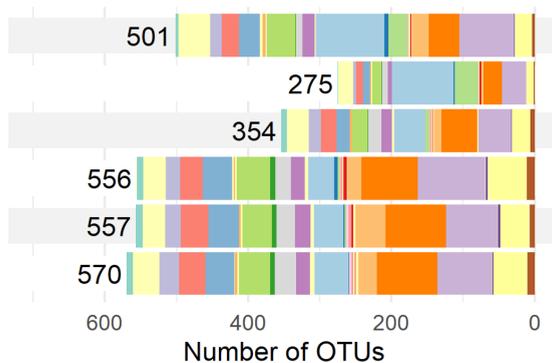
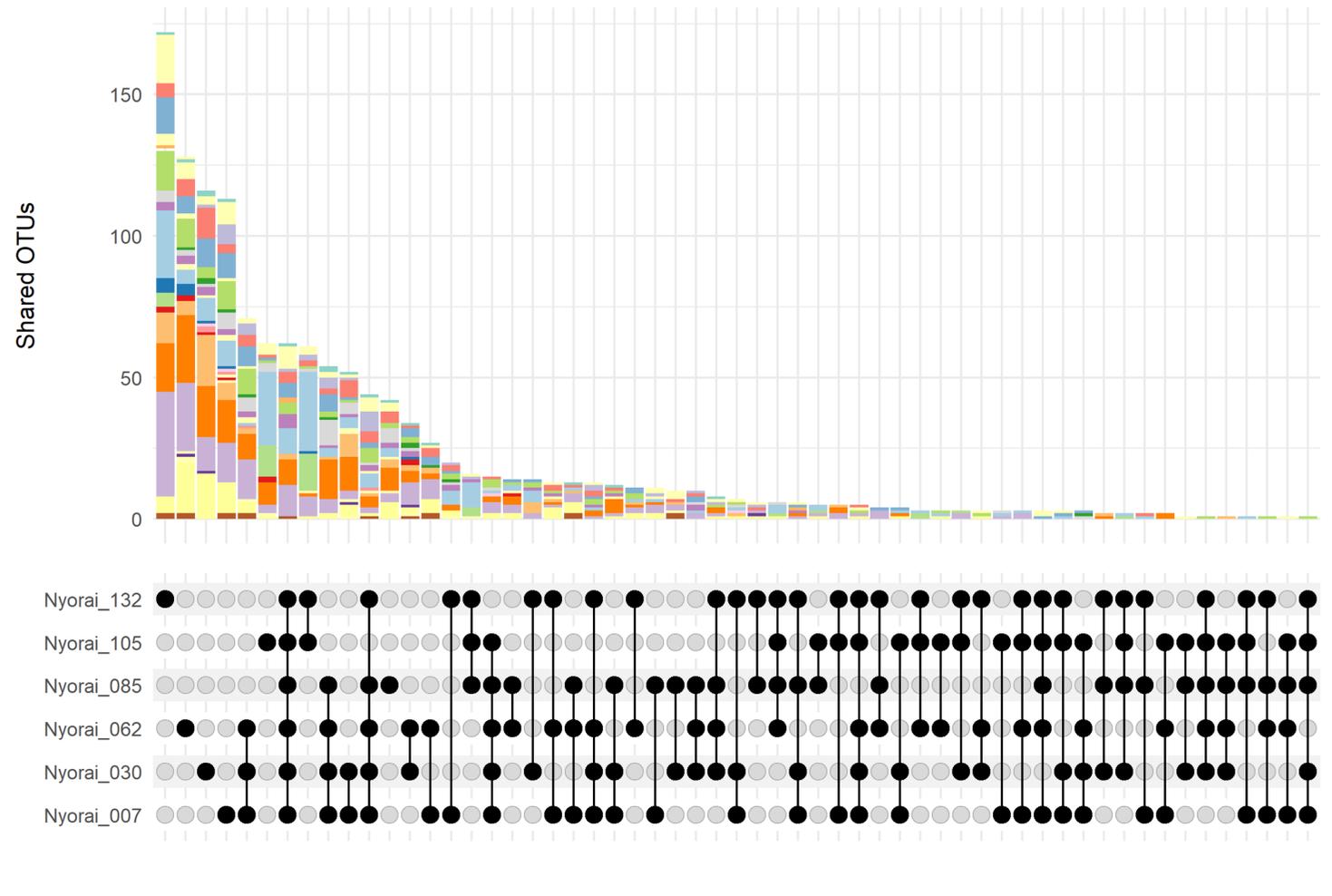
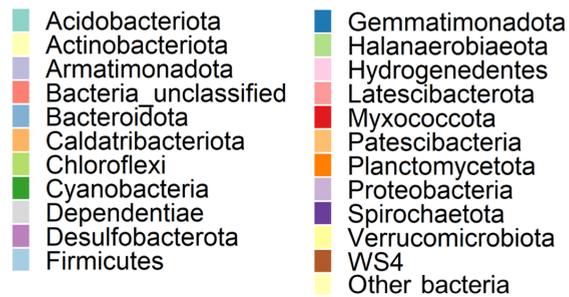


図 29 如来池コアサンプルの各深度における細菌群集の UpSet プロット. 左図では、各深度における門レベルの分類群ごとの OTU 数を棒グラフに示し、合計 OTU 数を各プロット左端に付した. 右図では、サンプル間で共有する OTU 数、もしくはあるサンプルにのみ存在する OTU 数を降順で示した. 右図下部の実線で繋がれた●、もしくは独立した●は、それぞれ該当する深度のサンプルから検出された OTU の積集合であること、ある深度でのみ検出された OTU であることを意味する. 右図上部では、右図下部で示した各集合の要素数 (OTU 数) と、その分類学的な内訳 (門レベルの分類) を積み上げ棒グラフで示した. ●が 1 つの場合は、どのサンプルとも共有していない OTU であることを意味する. 右図下部の y 軸は“湖沼名_校正した深度”を意味する. 細菌分類群の凡例を図中に示した.

Phylum

- Acidobacteriota
- Actinobacteriota
- Armatimonadota
- Bacteria_unclassified
- Bacteroidota
- Caldatibacteriota
- Chloroflexi
- Cyanobacteria
- Dependentiae
- Desulfobacterota
- Firmicutes
- Gemmatimonadota
- Halanaerobiaeota
- Hydrogenedentes
- Latescibacterota
- Myxococcota
- Patescibacteria
- Planctomycetota
- Proteobacteria
- Spirochaetota
- Verrucomicrobiota
- WS4
- Other bacteria

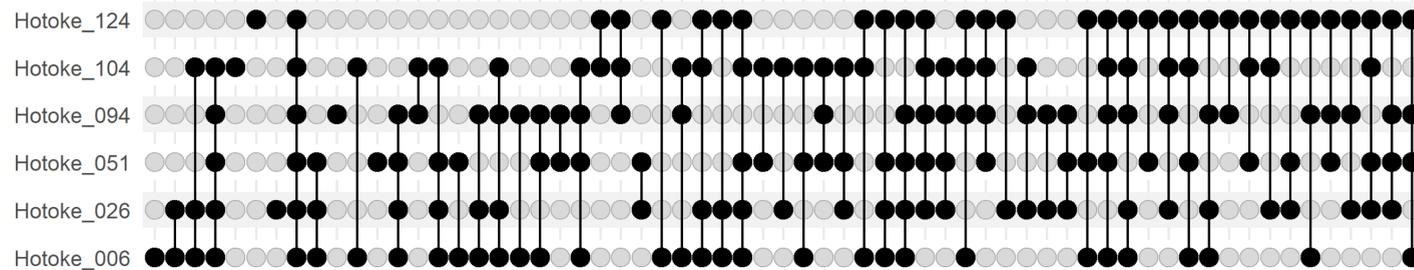
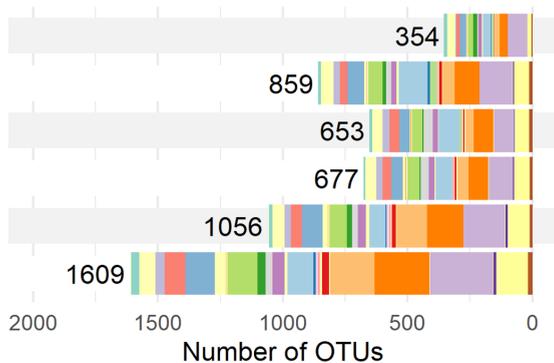
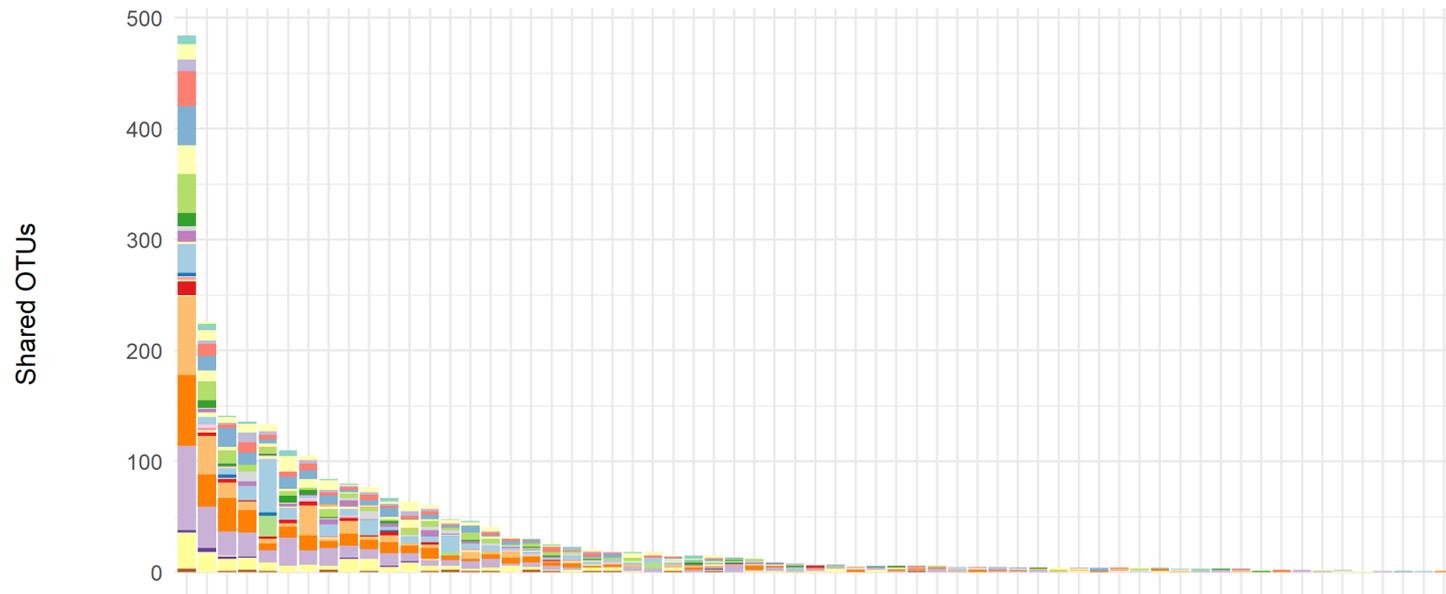


図 30 仏池コアサンプルの各深度における細菌群集の UpSet プロット. 左図では, 各深度における門レベルの分類群ごとの OTU 数を棒グラフに示し, 合計 OTU 数を各プロット左端に付した. 右図では, サンプル間で共有する OTU 数, もしくはあるサンプルにのみ存在する OTU 数を降順で示した. 右図下部の実線で繋がれた●, もしくは独立した●は, それぞれ該当する深度のサンプルから検出された OTU の積集合であること, ある深度でのみ検出された OTU であることを意味する. 右図上部では, 右図下部で示した各集合の要素数 (OTU 数) と, その分類学的な内訳 (門レベルの分類) を積み上げ棒グラフで示した. ●が 1 つの場合は, どのサンプルとも共有していない OTU であることを意味する. 右図下部の y 軸は “湖沼名_校正した深度” を意味する. 細菌分類群の凡例を図中に示した.

Phylum

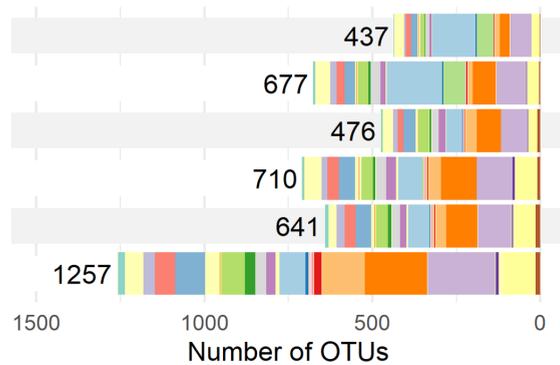
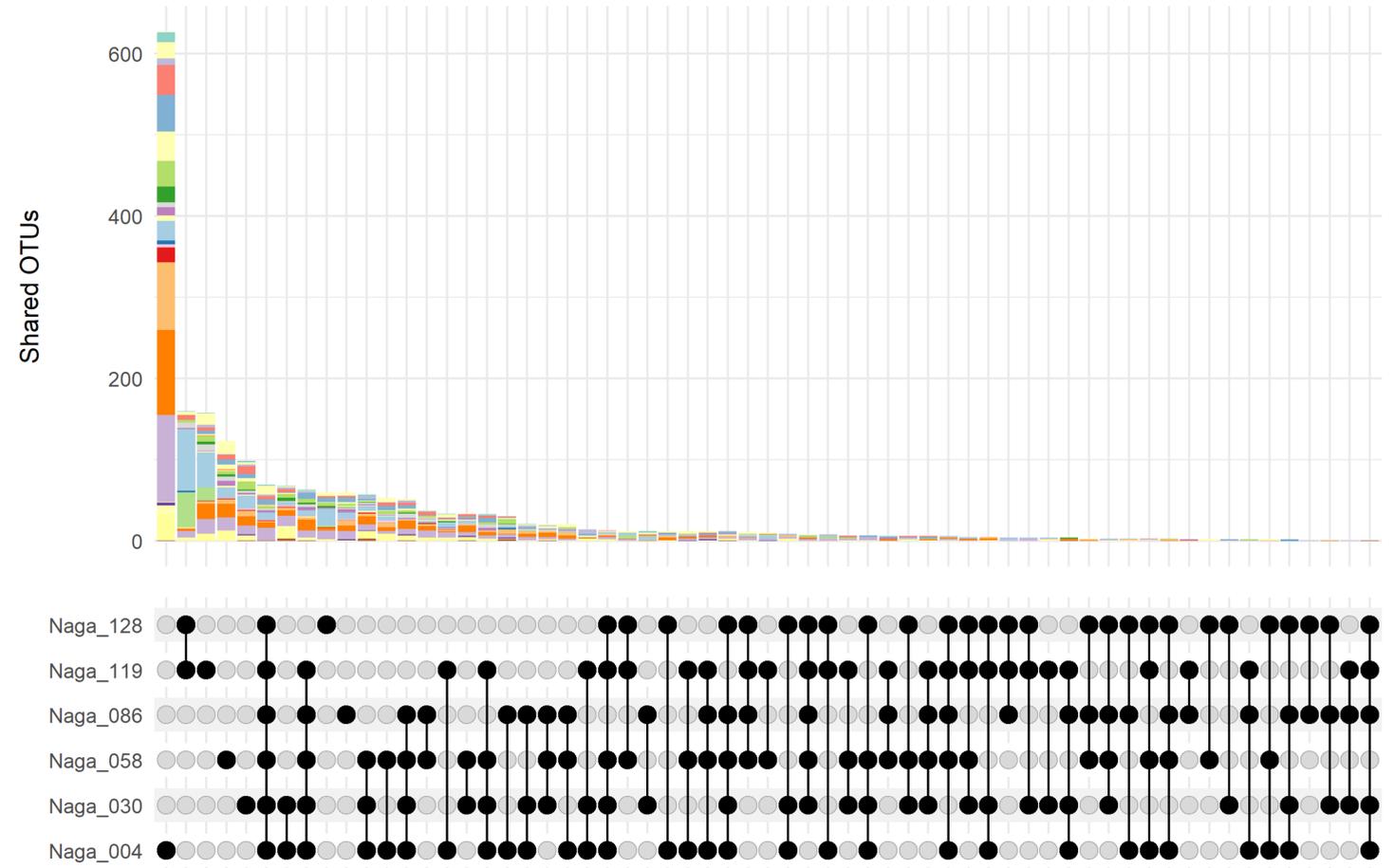
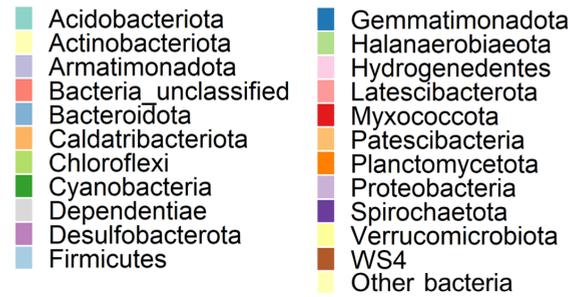


図 31 長池コアサンプルの各深度における細菌群集の UpSet プロット. 左図では, 各深度における門レベルの分類群ごとの OTU 数を棒グラフに示し, 合計 OTU 数を各プロット左端に付した. 右図では, サンプル間で共有する OTU 数, もしくはあるサンプルにのみ存在する OTU 数を降順で示した. 右図下部の実線で繋がれた●, もしくは独立した●は, それぞれ該当する深度のサンプルから検出された OTU の積集合であること, ある深度でのみ検出された OTU であることを意味する. 右図上部では, 右図下部で示した各集合の要素数 (OTU 数) と, その分類学的な内訳 (門レベルの分類) を積み上げ棒グラフで示した. ●が 1 つの場合は, どのサンプルとも共有していない OTU であることを意味する. 右図下部の y 軸は “湖沼名_校正した深度” を意味する. 細菌分類群の凡例を図中に示した.

Phylum

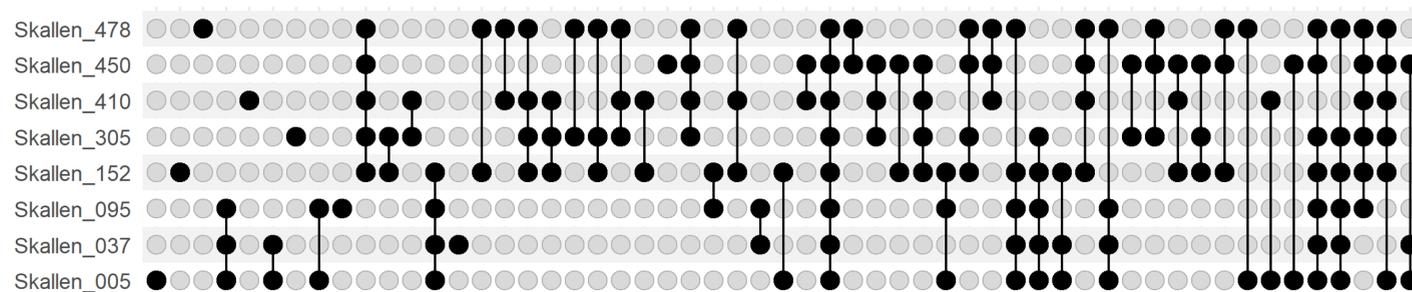
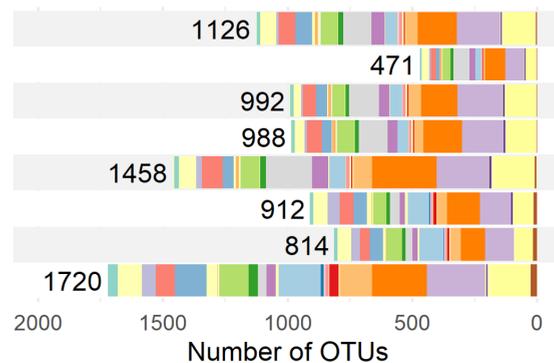
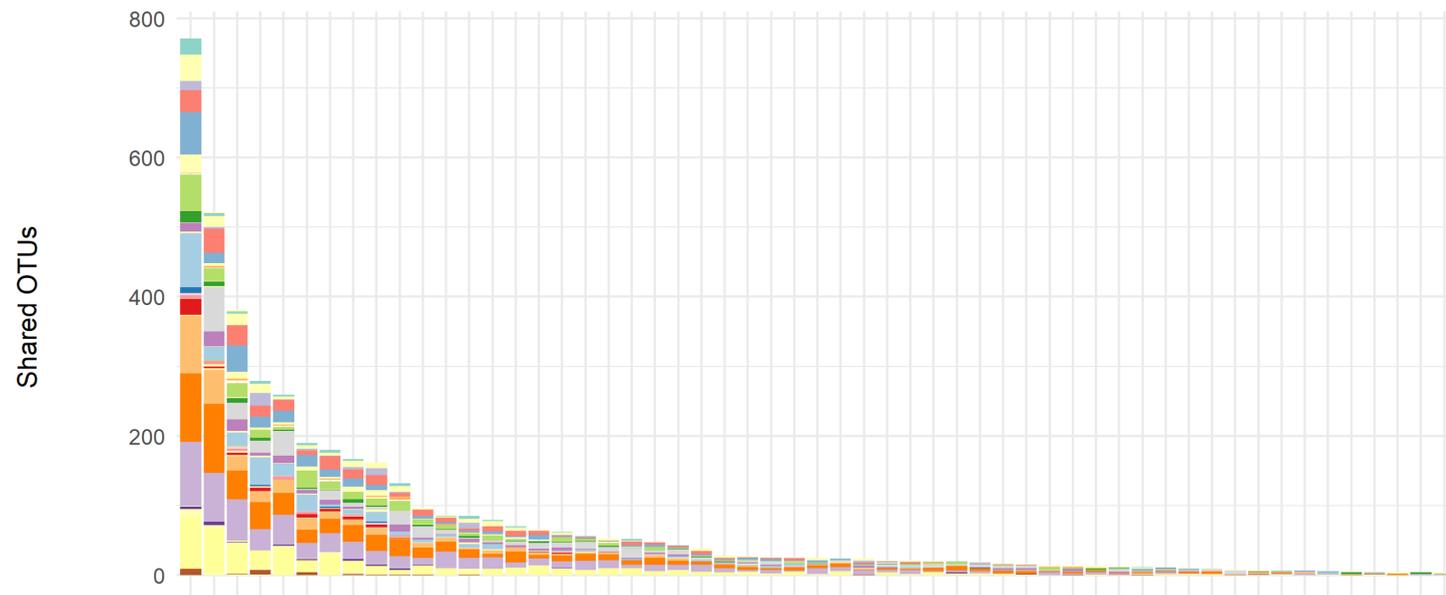
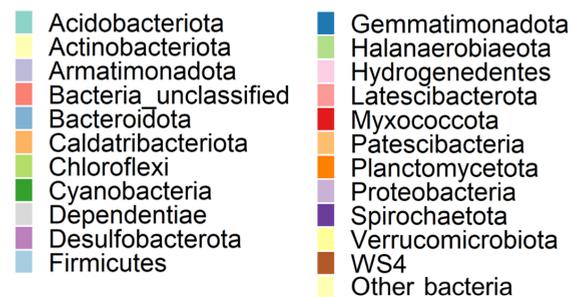


図 32 スカーレン大池コアサンプルの各深度における細菌群集の UpSet プロット。左図では、各深度における門レベルの分類群ごとの OTU 数を棒グラフに示し、合計 OTU 数を各プロット左端に付した。右図では、サンプル間で共有する OTU 数、もしくはあるサンプルにのみ存在する OTU 数を降順で示した。右図下部の実線で繋がれた●、もしくは独立した●は、それぞれ該当する深度のサンプルから検出された OTU の積集合であること、ある深度でのみ検出された OTU であることを意味する。右図上部では、右図下部で示した各集合の要素数 (OTU 数) と、その分類学的な内訳 (門レベルの分類) を積み上げ棒グラフで示した。●が 1 つの場合は、どのサンプルとも共有していない OTU であることを意味する。右図下部の y 軸は“湖沼名_校正した深度”を意味する。細菌分類群の凡例を図中に示した。