

雲仙温泉に生息する好熱菌の非培養法による種組成解析

黒澤佳子¹⁾, 酒井博之¹⁾²⁾³⁾, 黒沢則夫^{1)4)*}

(平成31年4月25日受付, 令和元年6月20日受理)

Species Compositions of Thermophiles in Unzen Hot Spring Revealed by a Culture Independent Method

Keiko KUROSAWA¹⁾, Hiroyuki D. SAKAI¹⁾²⁾³⁾ and Norio KUROSAWA^{1)4)*}

Abstract

In order to reveal the biodiversity of thermophiles inhabiting Unzen Hot Spring, muddy water samples from Suzume-Jigoku and Oito-Jigoku were applied to 16S rRNA gene clone analysis. Eleven clones derived from Suzume-Jigoku were classified in five bacterial and one archaeal species. Among these clones, thermoacidophilic actinobacteria *Acidimicrobium ferrooxidans* and novel bacterium belonging to the class Deltaproteobacteria were relatively dominant. Other clones were affiliated with novel archaeon belonging to the order Thermoplasmatales, *Acidicaldus organivorans* of Alphaproteobacteria, novel species of the genus *Sulfobacillus*, and novel bacterium belonging to the order Clostridiales. On the other hand, eleven clones derived from Oito-Jigoku were classified in two bacterial and seven archaeal species. In this community, only *Thermocladium modestius* of the class Thermoprotei was identified as a described species, and all the other clones were affiliated with novel species. Particularly, one bacterial and one archaeal species showed no relation to any described species phylogenetically, indicating that these species may be affiliated with novel bacterial and archaeal phyla, respectively. Suzume-Jigoku and Oito-Jigoku hot springs had no species in common, indicating that these hot springs were biologically isolated each other. These results showed that Unzen Hot Spring is very interesting habitats for microbiological studies, where a variety of prokaryotes containing many novel species are colonized.

¹⁾創価大学大学院工学研究科環境共生工学専攻 〒192-8577 東京都八王子市丹木町 1-236. ¹⁾Department of Environmental Engineering for Symbiosis, Graduate School of Engineering, Soka University, 1-236 Tangi-machi, Hattouji, Tokyo 192-8577, Japan.

²⁾理化学研究所バイオリソース研究センター微生物材料開発室 〒305-0074 茨城県つくば市高野台 3-1-1. ²⁾Japan Collection of Microorganisms, RIKEN BioResource Research Center, 3-1-1 Koyadai, Tsukuba, Ibaraki 305-0074, Japan.

³⁾日本学術振興会特別研究員 〒102-0083 東京都千代田区麹町 5-3-1. ³⁾Research Fellow of the Japan Society for the Promotion of Science, 5-3-1 Kojimachi, Chiyoda-ku, Tokyo 102-0083, Japan.

⁴⁾創価大学自然環境研究センター 〒192-8577 東京都八王子市丹木町 1-236. ⁴⁾Research Center for Natural Environment, Soka University, 1-236 Tangi-machi, Hattouji, Tokyo 192-8577, Japan. *Corresponding author : E-mail kurosawa@soka.ac.jp, TEL & FAX : 042-691-8175.

Key words : Unzen Hot Spring, Suzume-Jigoku, Oito-Jigoku, Thermophile, 16S rRNA gene clone analysis

要 旨

雲仙温泉に生息する好熱菌の多様性の一端を明らかにするために、雀地獄とお糸地獄において採取した温泉水を用い、16S rRNA 遺伝子クローン解析法による原核生物の種組成解析を行った。雀地獄に由来する 11 クローンは 5 種のバクテリアと 1 種のアーキアに分類された。これらのうち相対的に出現頻度が高かったのは、放線菌綱に属する好熱好酸性バクテリア *Acidimicrobium ferrooxidans* と Deltaproteobacteria 綱に属するバクテリアであった。また、後者は目レベルで新規なバクテリアと推測される。次いで Thermoplasmatales 目に属する新種のアーキアが 2 クローン検出された。また、Alphaproteobacteria 綱に属する好熱好酸性バクテリア *Acidicaldus organivorans*、Clostridia 綱に属する *Sulfobacillus* 属の新種、Clostridiales 目に属する新種のバクテリアがそれぞれ 1 クローンずつ検出された。一方、お糸地獄に由来する 11 クローンは 2 種のバクテリアと 7 種のアーキアに分類された。これらのうち、記載種は Thermoprotei 綱に属する好熱好酸性アーキアの *Thermocladium modestius* のみで、その他は全て新種であると推定された。特にバクテリア 1 種とアーキア 1 種は、類縁性を示す記載種が全く存在せず、それぞれのドメインの新規な門に属する種であると推定された。本研究では、雀地獄とお糸地獄の両方から共通に検出された種は無く、両源泉は微生物学的に完全に隔離されていると推定された。以上の結果から、雲仙温泉には非常に多様かつ新規なバクテリアとアーキアが生息しており、本温泉が微生物分類学および微生物生態学的に非常に興味深い場所である事が確認された。

キーワード：雲仙温泉, バクテリア, アーキア, 好熱菌, 16S rRNA 遺伝子クローン解析

1. 序 論

極限環境に生息する微生物について、その遺伝子情報や生理生態学的性質、および微生物間の相互作用などについて研究することにより、様々な環境因子に対する生物の応答や適応機構について知ることが出来る。これらのうち好熱菌は、バクテリアに属する種とアーキアに属する種が存在するが、それらはいずれも地球上の全生物の進化系統樹において根元付近に位置づけられる。このことから、好熱菌は全生物の共通祖先 (LUCA : Last Universal Common Ancestor) に最も近い性質を持つ微生物であると考えられており (Stetter, 2006a, 2006b)、生物の初期進化の過程を知る上でも非常に重要な生物である。

これまでに多くの好熱菌が深海の熱水噴出孔や陸上温泉から分離されてきた。一方で、近年の環境 DNA を用いた解析の結果から、温泉中にはさらに多くの未培養の好熱菌が生息していることが示唆されている。例として、アメリカのイエローストーン国立公園の試料を用いたバクテリアの群集構造解析 (Hugenholtz *et al.*, 1998)、日本の霧島温泉の試料を用いたアーキアの群集構造解析 (Satoh *et al.*, 2013)、アルゼンチンの Copahue 地熱域の試料を用いたアーキアおよびバクテリアの群集構造解析 (Urbietta *et al.*, 2014) などが挙げられる。雲仙温泉に生息する好熱菌に関しても、環境 DNA を用いた手法により、Korarchaeota 門、Crenarchaeota 門、Euryarchaeota 門に属する非常に新規性の高い種を含むアーキアの群集構造解析結果が報告されている (Takai and Sako, 1999)。しかしながら雲仙温泉のバクテリアについて論文として報告された先行研究は見当たらず、分類学・生態学的知見に乏しい。

そこで本研究では、雲仙温泉に生息する好熱菌の種組成や多様性の一端をバクテリアを含めて明らかにするために、温泉試料から直接抽出した環境 DNA を用いて、16S rRNA 遺伝子クローン解

析法によるバクテリアとアーキア両方の群集構造解析を行う事とした。新規な未培養好熱菌の存在が確認出来れば、それらを実際分離し分類学的研究を行う際の非常に有用な情報となると考えられる。

2. 材料と方法

2.1 試料

長崎県の雲仙温泉は、島原半島のほぼ中央に位置する絹笠山と谷岳に挟まれた標高 700m の小盆地に存在する (Fig. 1, 太田, 1973)。雲仙温泉の地下には、火山性蒸気を熱源とする約 300℃ の地熱水が潜在しており、そこから分離した二次的な蒸気が浅層地下水を加熱し、約 150℃ の酸性 SO₄ 型の熱水が生成している (大沢ら, 2002)。試料採取は、2016 年 11 月 10 日に雲仙温泉の雀地獄内の直径約 15 cm の湯だまり (Fig. 2, 81℃, pH 2.9) およびお糸地獄付近の直径約 50 cm の湯だま



Fig. 1 Oito-Jigoku, Unzen Hot Spring



Fig. 2 Sampling point in Suzume-Jigoku, Unzen Hot Spring



Fig. 3 Sampling point in Oito-Jigoku, Unzen Hot Spring

り (Fig. 3, 79°C, pH 2.9) において実施した. いずれも温泉水を湯だまりの堆積物とともに採取し, 空気が入らないようバイアル瓶に密封し, 室温で実験室に持ち帰った.

2.2 16S rRNA 遺伝子クローンライブラリーの作製

16S rRNA 遺伝子クローンライブラリーの作製と次項「16S rRNA 遺伝子クローンの単離と塩基配列解析」は, Sakai and Kurosawa (2016) に従って行った. 試料 0.5 g から, Extrap Soil DNA Kit Plus ver.2 (日鉄住金環境株式会社) を用いて環境 DNA を抽出した. この DNA を鋳型として, PCR 法によりバクテリアとアーキアの 16S rRNA 遺伝子を増幅した. 酵素および基質類を含む 2×PCR プレミックス試薬として EmeraldAmp[®] MAX PCR Master Mix (タカラバイオ株式会社) を, PCR プライマーにはバクテリアとアーキアの共通プライマーである Pro341F (5'-CCTACGGGNB-GCASCAG) および Pro805R (5'-GACTACNVGGGTATCTAATCC) を用いた (Takahashi *et al.*, 2014). PCR 反応液 25 μL の組成は, PCR プレミックス試薬 12.5 μL, PCR プライマー各 0.5 μmol/L (最終濃度), 鋳型 DNA 1 μL とした. PCR 温度条件は, 94°C で 3 分間の初期変性を行った後, 94°C 30 秒, 65°C (55°C になるまで 1 サイクルごとに 2°C 温度を下げ以後は 55°C) 30 秒, 72°C 30 秒を 35 サイクルとした. 得られた PCR 産物を, NucleoSpin[®] Gel and PCR Clean-up キット (タカラバイオ株式会社) を用いて精製し 16S rRNA 遺伝子クローンライブラリーとした.

2.3 16S rRNA 遺伝子クローンの単離と塩基配列解析

16S rRNA 遺伝子クローンライブラリーを, Ligation high ver.2 キット (TOYOBO) を用いて T-vector pMD20 (タカラバイオ株式会社) に組み込んだ. この組換えプラスミドを用いて形質転換した大腸菌 DH5α 株の菌液を, X-gal (20 mg/mL) およびアンピシリン (100 μg/mL) を含む LB 寒天培地上に塗布した. 37°C で約 20 時間培養後, 組換えプラスミドを保持する大腸菌コロニーを無作為に選択し, 96-well plate に分注したアンピシリン (100 μg/mL) を含む LB 培地 100 μL に一つずつ接種し 37°C で約 20 時間培養した. 得られた培養液を鋳型として, PCR 法によりプラスミドに挿入された 16S rRNA 遺伝子の増幅を行った. 2×PCR プレミックス試薬として EmeraldAmp[®]

MAX PCR Master Mix を、PCR プライマーにはプラスミドベクター pMD20 上の配列に対応する M13 reverse Primer (5'-CAGGAAACAGCTATGA) および U-19mer Primer (5'-GTTTTCCCAGTCACGACGT) を用いた。PCR 反応液 25 μ L の組成は、PCR プレミックス試薬 12.5 μ L, PCR プライマー各 0.5 μ mol/L (最終濃度)、培養液 1 μ L とした。PCR 温度条件は、94°C で 3 分間の初期変性を行った後、94°C 30 秒、50°C 30 秒、72°C 30 秒を 30 サイクルとした。PCR 産物すなわち 16S rRNA 遺伝子クローン約 450 bp の塩基配列をサンガー法により決定した。

2.4 微生物群集構造解析

互いの塩基配列相同性が 98% 以上の 16S rRNA 遺伝子クローンを 1 つの Operational Taxonomic Unit (OTU : 種に相当する) としてまとめた。各 OTU を代表する配列を 1 つずつ選び、NCBI BLAST program (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 上で相同性検索を行いクローンが由来する微生物の同定を行った。また、群集構造解析において試料中の原核生物をどの程度網羅できたかのかを表す指標である homologous coverage (C) を、式 $C = 1 - (N/n)$ を用いて算出した (Good, 1953 ; Singleton *et al.*, 2001)。この式において N は検出された OTU 数、n は解析したクローンの総数を示す。

3. 結果および考察

3.1 雀地獄の湯だまりにおける原核生物群集構造

雀地獄に由来する 16S rRNA 遺伝子 11 クローンは、互いの相同性の値から 6 つの OTU に分類された (Table 1)。これらのうち出現頻度が相対的に高かったのは、OTU : EVA-10 と EVA-08 でそれぞれ 3 クローン検出された。EVA-10 の塩基配列は、Actinobacteria (放線菌) 綱に属する *Acidimicrobium ferrooxidans* の 16S rRNA 遺伝子と 99.3% 一致し本種に由来すると推定された。*A. ferrooxidans* は至適生育温度が 45–50°C、至適生育 pH が 2 付近の好気性好熱好酸性バクテリアであり、空気中よりも高い CO₂ 濃度 (5%) でよく増殖する混合栄養性の微生物であるとされている (Clark and Norris, 1996)。一方 EVA-08 の塩基配列は、Deltaproteobacteria 綱 Syntrophobacterales 目 Syntrophaceae 科のイオウ還元バクテリア *Desulfomonile limimaris* の 16S rRNA 遺伝子と最も

Table 1 Detected species from Suzume-Jigoku

OTU	Closest species	16S rRNA gene similarity (%)	Affiliation	Number of clones
EVA-10	<i>Acidimicrobium ferrooxidans</i>	99.3	<i>Acidimicrobium ferrooxidans</i>	3
EVA-08	<i>Desulfomonile limimaris</i>	86.3	Novel order of the class Deltaproteobacteria	3
EVA-17	<i>Thermoplasma volcanium</i>	90.6	Novel family of the order Thermoplasmatales	2
EVA-18	<i>Acidicaldus organivorans</i>	99.0	<i>Acidicaldus organivorans</i>	1
EVA-11	<i>Sulfobacillus acidophilus</i>	95.0	Novel species of the genus <i>Sulfobacillus</i>	1
EVA-12	<i>Sulfobacillus acidophilus</i>	93.5	Novel genus of the order Clostridiales	1

高い相同性を示したが, その値は 86.3% であった. この値は一般に, 別目に属するバクテリア種間で見られる値であることから (Yarza *et al.*, 2014), EVA-08 は, Deltaproteobacteria 綱の新規な目に属する未記載のバクテリアに由来すると推定された.

これらに続いて 2 クローン検出された OTU: EVA-17 は, Thermoplasmata 綱 Thermoplasmatales 目に属する *Thermoplasma* 属, *Thermogymnomonas* 属, *Cuniculiplasma* 属, *Picrophilus* 属, *Acidiplasma* 属および *Ferroplasma* 属アーキアの 16S rRNA 遺伝子とそれぞれ 89.4-90.6%, 90.3%, 90.1%, 88.4-88.7%, 86.7%, および 86.0-86.7% の相同性を示した. したがって EVA-17 はこれら 6 つの属のいずれにも帰属しない Thermoplasmatales 目の新規な科に属するアーキアに由来すると推定された.

残り 3 つの OTU のうち, OTU: EVA-18 の塩基配列は, *Acidicaldus organivorans* の 16S rRNA 遺伝子と 99.0% 一致したことから, 本種に由来すると推定された. *A. organivorans* は生育温度範囲が 40-65°C (至適生育温度 50-55°C), 生育 pH 範囲が 1.8-3.0 (至適生育 pH 2.5-3.0) の好熱好酸性バクテリアであり, 原記載株はアメリカのイエローストーン国立公園の温泉から分離されている (Johnson *et al.*, 2006). 好気条件下だけでなく, Fe³⁺ を還元して嫌気条件下でも生育する通性嫌気性バクテリアである (Johnson *et al.*, 2006).

EVA-11 と EVA-12 の塩基配列は, 硫化鉱物を酸化する中等度好熱好酸性バクテリア *Sulfobacillus acidophilus* の 16S rRNA 遺伝子と, それぞれ 95.0% および 93.5% の相同性を示したことから, 前者は *Sulfobacillus* 属の未記載種に, 後者は Clostridiales 目の新属に由来すると推定された.

雀地獄の湯だまりにおける原核生物群集構造解析での homologous coverage は 0.45 であり, ここに生育する種の半数弱が本研究により明らかになったと推定された.

3.2 お糸地獄付近の湯だまりにおける原核生物群集構造

お糸地獄に由来する 16S rRNA 遺伝子 11 クローンは, 互いの相同性の値から 9 つの OTU に分類された (Table 2). いずれの OTU も 1 クローンまたは 2 クローン検出され, 特に高い頻度で検出された OTU は無かった. 驚くべき事に, それら OTU のうち記載種に由来すると同定できたのは 1 OTU (EVB-09) のみで, 他の 8 OTU はすべて未記載種に由来した. 特に 2 つの OTU: EVB-08 および EVB-17 の新規性は非常に高く, それぞれバクテリアとアーキアの新規な門に由来すると推定された. 以下に各 OTU の要点を述べる.

OTU: EVB-09 の塩基配列は, Crenarchaeota 門 Thermoprotei 綱 Thermoproteales 目 Thermoproteaceae 科の好熱好酸性アーキア *Thermocodium modestius* の 16S rRNA 遺伝子と 99.3% 一致した. *T. modestius* は至適生育温度が 75°C 付近, 至適生育 pH が 4 付近, 嫌気性または微好気性で従属栄養性の好熱好酸性アーキアである (Itoh *et al.*, 1998). 本種はこれまでに野路温泉 (福島県), 川湯温泉 (北海道), 玉川温泉 (秋田県) から分離されているが (Itoh *et al.*, 1998), 本研究により雲仙温泉にも生息していることが確認された.

OTU: EVB-12 の塩基配列は, Deltaproteobacteria 綱 Desulfurellales 目 Desulfurellaceae 科 *Desulfurella* 属の 5 種 *D. acetivorans*, *D. multipotens*, *D. kamchatkensis*, *D. propionica*, *D. amilii* の 16S rRNA 遺伝子と 96.6-97.9% の相同性を示したことから, *Desulfurella* 属の新種に由来すると推定された. これら 3 つの近縁種はいずれも嫌気性の好熱好酸性イオウ還元バクテリアであることから, EVB-12 の塩基配列を有するお糸地獄のバクテリアも同様の性質を有していると推定された.

OTU: EVB-18 と相同性が最も高かった記載種は Crenarchaeota 門 Thermoprotei 綱の *Thermogladus calderae* であったがその値は 86.3% と低く, Thermoprotei 綱の新規な目に由来すると推定された. 一方でこの OTU の配列は, 同じく雲仙温泉の原核生物を非培養法により解析した Takai

Table 2 Detected species from Oito-Jigoku

OTU	Closest species	16S rRNA gene similarity (%)	Affiliation	Number of clones
EVB-09	<i>Thermocladium modestius</i>	99.3	<i>Thermocladium modestius</i>	1
EVB-12	<i>Desulfurella acetivorans</i>	97.9	Novel species of the genus <i>Desulfurella</i>	2
EVB-18	<i>Thermogladus calderae</i>	86.3	Novel order of the class Thermoprotei	1
EVB-16	<i>Thermogymnomonas acidicola</i>	84.9	Novel order of the class Thermoplasmata	1
EVB-13	<i>Thermogymnomonas acidicola</i>	84.2	Novel order of the class Thermoplasmata	1
EVB-11	<i>Picrophilus torridus</i>	82.3	Novel order of the class Thermoplasmata	1
EVB-15	<i>Nitrososphaera viennensis</i>	84.4	Novel order of the class Nitrososphaeria	2
EVB-08	None	<76.0	Novel phylum of the Bacteria	1
EVB-17	None	<77.0	Novel phylum of the Archaea	1

and Sako (1999) において、Thaumarchaeota 門に属すと推定されたアーキアのクローン pUWA43 と 96% の相同性を示した。この相同性は、一般に同属別種間で示される値であることから、OTU : EVB-18 の分類学的帰属についてはより詳細な解析が必要である。

OTU : EVB-16 および EVB-13 の塩基配列は、Euryarchaeota 門 Thermoplasmata 綱 Thermoplasmatales 目の好熱好酸性アーキア *Thermogymnomonas acidicola* の 16S rRNA 遺伝子と最も高い相同性を示したが、その値はそれぞれ 84.9% および 84.2% であったことから、Thermoplasmata 綱の新規な目に属するアーキアに由来すると推定された。OTU : EVB-11 の塩基配列も同じく Thermoplasmatales 目の好熱好酸性アーキア *Picrophilus torridus* と最も高い相同性を示したが、その値は 82.3% とさらに低かった。したがって EVB-11 も、Thermoplasmata 綱の新規な目に属するアーキアに由来すると推定された。

OTU : EVB-15 の塩基配列は、Thaumarchaeota 門 Nitrososphaeria 綱 Nitrososphaerales 目 Nitrososphaeraceae 科の *Nitrososphaera viennensis* と最も高い相同性を示したが、その値は 84.4% と低く、Nitrososphaeria 綱の新規な目に由来すると推定された。そもそも *Nitrososphaera viennensis* は中性付近の pH で生育する中温性のアーキアであり、お糸地獄 (79°C, pH 2.9) から検出された EVB-15 が由来する種は、*N. viennensis* とは相当異なっていることが容易に推定された。

OTU : EVB-08 と EVB-17 にいたっては、それぞれバクテリアドメインとアーキアドメインに帰属されるという以外、類縁性を示す記載種が全く存在せず、新規な門に属する種に由来すると推定された。

お糸地獄付近の湯だまりにおける原核生物群集構造解析での homologous coverage は 0.18 と非常に低く、本研究で明らかにされた種はここに生息する微生物の 2 割弱に過ぎないと推定された。

4. 結 論

雲仙温泉の雀地獄とお糸地獄付近の湯だまり温泉における原核生物の種組成を, 16S rRNA 遺伝子クローン解析法により調べた結果, バクテリアが7種, アーキアが8種の計15種が検出された。これらの内, 記載種はわずかに3種(バクテリア2種, アーキア1種)で, 他は全て未記載の新規な原核生物であった。環境DNAを用いた種組成解析において, 8割が未記載種で占められることは特段珍しいことでは無くむしろ一般的な結果と言えるが, それらの多くが門レベルで新規な系統であったことは分類学的に特筆される。また今回の解析では, 塩基配列決定できたクローン数が合計で22クローンと非常に少なかったにもかかわらず15種の原核生物が検出され, 雲仙温泉に生息する好熱菌の多様性も非常に高いことが推定された。さらに, 雀地獄とお糸地獄の両方から共通に検出された種は無かったことから, 両源泉は微生物学的に完全に隔離されていると推定された。微生物は, 分離培養することによって詳しい生理生化学的特徴を調べることができ, それらのデータを用いて種の記載も可能となる。今回検出された種の系統分類学的知見を参考にすることによって, 今後, 数種の新規バクテリアやアーキアを分離培養することができる可能性が示唆される。

謝 辞

環境省九州地方環境事務所雲仙自然保護官事務所自然保護官の中山良太氏には, 雲仙温泉での試料採取に際して様々なご助言を賜りました。この紙面を借りて深く感謝申し上げます。

引用文献

- Clark, D.A. and Norris, P.R. (1996) : *Acidimicrobium ferrooxidans* gen. nov., sp. nov. : mixed-culture ferrous iron oxidation with *Sulfobacillus* species. *Microbiology*, **142**, 785-790.
- Good, I.J. (1953) : The population frequencies of species and the estimation of population parameters. *Biometrika*, **40**, 237-264.
- Hugenholtz, P., Pitulle, C., Hershberger, K.L., & Pace, N.R. (1998) : Novel division level bacterial diversity in a Yellowstone hot spring. *Journal of Bacteriology*, **180**, 366-376.
- Itoh, T., Suzuki, K.I. and Nakase, T. (1998) : *Thermocladium modestius* gen. nov., sp. nov., a new genus of rod-shaped, extremely thermophilic crenarchaeote. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **48**, 879-887.
- Johnson, D.B., Stallwood, B., Kimura, S. and Hallberg, K.B. (2006) : Isolation and characterization of *Acidicaldus organivorius*, gen. nov., sp. nov. : a novel sulfur-oxidizing, ferric iron-reducing thermo-acidophilic heterotrophic Proteobacterium. *Archives of Microbiology*, **185**, 212-221.
- 大沢信二, 風早康平, 安原正也 (2002) : 島原半島の温泉・鉱泉の流体地球化学, *温泉科学*, **52**, 51-68.
- 太田一也 (1973) : 島原半島における温泉の地質学的研究, 九州大学理学部島原火山観測所研究報告, **8**, 1-33.
- Sakai, H.D. and Kurosawa, N. (2016) : Exploration and isolation of novel thermophiles in frozen enrichment cultures derived from a terrestrial acidic hot spring. *Extremophiles*, **20**, 207-214.
- Satoh, T., Watanabe, K., Yamamoto, H., Yamamoto, S. and Kurosawa, N. (2013) : Archaeal community structures in the solfataric acidic hot springs with different temperatures and elemental compositions. *Archaea*, **2013**, Article ID 723871.
- Singleton, D.R., Furlong, M.A., Rathbun, S.L. and Whitman, W.B. (2001) : Quantitative comparisons

- of 16S rRNA gene sequence libraries from environmental samples. *Applied and environmental microbiology*, **67**, 4374-4376.
- Stetter, K.O. (2006a) : History of discovery of the first hyperthermophiles. *Extremophiles*, **10**, 357-362.
- Stetter, K.O. (2006b) : Hyperthermophiles in the history of life. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B : Biological Sciences*, **361**, 1837-1843.
- Takahashi, S., Tomita, J., Nishioka, K., Hisada, T., & Nishijima, M. (2014) : Development of a prokaryotic universal primer for simultaneous analysis of bacteria and archaea using next-generation sequencing. *PloS one*, **9**, e105592.
- Takai, K. and Sako, Y. (1999) : A molecular view of archaeal diversity in marine and terrestrial hot water environments. *FEMS Microbiology Ecology*, **28**, 177-188.
- Urbietta, M.S., Toril, E.G., Giaveno, M.A., Bazán, Á.A. and Donati, E.R. (2014) : Archaeal and bacterial diversity in five different hydrothermal ponds in the Copahue region in Argentina. *Systematic and Applied Microbiology*, **37**, 429-441.
- Yarza, P., Yilmaz, P., Pruesse, E., Glöckner, F.O., Ludwig, W., Schleifer, K-H., William B. Whitman, W.B., Euzéby, J., Amann, R. and Rosselló-Móra, R. (2014) : Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences. *Nature Reviews Microbiology*, **12**, 635-645.