



原 著

## 集積培養と 16S rRNA 遺伝子クローン解析法による インドネシアの温泉からの培養可能な新規好熱菌の探索

宮林裕香<sup>1)</sup>, 坪井和彦<sup>1)</sup>, 酒井博之<sup>2)</sup>, Naswandi NUR<sup>3)</sup>,

Antonius SUWANTO<sup>3)</sup>, 黒沢則夫<sup>1) 2) 4)\*</sup>

(令和3年1月11日受付, 令和3年2月26日受理)

## Exploring of Culturable Novel Thermophiles from Indonesian Hot Springs by Enrichment Culture and 16S rRNA gene Clone Analysis

Hiroka MIYABAYASHI<sup>1)</sup>, Kazuhiko Tsuboi<sup>1)</sup>, Hiroyuki D. SAKAI<sup>2)</sup>,  
Naswandi NUR<sup>3)</sup>, Antonius SUWANTO<sup>3)</sup> and Norio KUROSAWA<sup>1) 2) 4)\*</sup>

### Abstract

In order to obtain knowledge of taxonomy about microorganisms habiting in Indonesian hot springs, the spring water samples from geothermal areas Kawah Domas and Gunung Pancar in western Java, Indonesia, were applied to enrichment cultivation and identification of microorganisms. Only archaea were detected in the enrichment cultures derived from Kawah Domas, and only bacteria were detected in the enrichment cultures derived from Gunung Pancar. Thermoacidophilic archaeon *Metallosphaera sedula* and *Thermoplasma acidophilum* were detected as described species from Kawah Domas. In addition, novel species of the genus *Sulfurisphaera* which was thermoacidophilic archaeon was detected. Moreover, Archaeal Richmond Mine Acidophilic Nanoorganisms (ARMAN) and Miscellaneous Crenarchaeota Group (MCG) which were uncultured archaeal group were detected in enrichment cultures. On the other hand, *Thermus brockianus*, *Thermus arciformis*, *Sulfurihydrogenibium subterraneum*, and *Geobacillus icigianus* were detected as described bacterial species from Gunung Pancar hot spring. Additionally, a novel specie of the genus *Thermus* was detected. As described above, the detected microorganisms include two archaeal species, which are

<sup>1)</sup>創価大学大学院理工学研究科環境共生工学専攻. <sup>1)</sup>Department of Environmental Engineering for Symbiosis, Graduate School of Science and Engineering, Soka University. \*Corresponding author : E-mail kurosawa@soka.ac.jp, TEL & FAX : 042-691-8175.

<sup>2)</sup>創価大学理工学部共生創造理工学科. <sup>2)</sup>Department of Science and Engineering for Sustainable Innovation, Faculty of Science and Engineering, Soka University.

<sup>3)</sup>IPB 大学 (インドネシア) 数理学部. <sup>3)</sup>Department of Biology, Faculty of Science and Mathematics, IPB University.

<sup>4)</sup>創価大学自然環境研究センター. <sup>4)</sup>Research Center for Natural Environment, Soka University.

difficult to culture and highly novel, as well as multiple new species, and reaffirm the value of Indonesian hot springs as a research field of microbial taxonomy.

Key words : Indonesia, Thermophile, Archaea, Bacteria, 16S rRNA gene clone analysis

## 要 旨

インドネシアの温泉に生息する培養可能な好熱菌に関する分類学的な知見を得ることを目的として、ジャワ島西部の地熱地帯 Kawah Domas 及び Gunung Pancar において採取した温泉水を用い、好熱菌の集積培養ならびに培養された好熱菌の種同定を行った。Kawah Domas の温泉 (泉温 62~75°C, pH 3.3~3.8) 由来の試料を用いた集積培養液からは、計 5 種のアーキアが検出され、それらのうち 2 種は、好熱性クレンアーキア *Metallosphaera sedula* と好熱性ユーリアーキア *Thermoplasma acidophilum* と同定された。また 1 種は、好酸性クレンアーキア *Sulfurisphaera* 属の新種であると推定された。さらに、Archaeal Richmond Mine Acidophilic Nanoorganisms (ARMAN) および Miscellaneous Crenarchaeota Group (MCG) と呼ばれる系統群に属する難培養性アーキアが、それぞれ 1 種ずつ集積培養液中に検出された。一方、Gunung Pancar の温泉 (泉温 65°C, pH 7.0) 由来の試料を用いた集積培養液からは、計 5 種のバクテリアが検出され、それらのうち 4 種は、*Thermus brockianus*, *Thermus arciformis*, *Sulfurihydrogenibium subterraneum*, および *Geobacillus icigianus* と同定された。残り 1 種は、*Thermus* 属の新種であると推定された。以上のように、検出された微生物には、複数の新種とともに難培養性で非常に新規性が高いアーキアも含まれており、インドネシアの温泉が新規好熱菌の探索フィールドとして価値があるという結果となった。

キーワード：インドネシア，微生物，アーキア，バクテリア，16S rRNA 遺伝子クローン解析

## 1. 序 論

好熱菌は、深海の熱水噴出孔、陸上温泉、酸性鉱山などの高温環境に生息している。陸上温泉は、一般的な好熱菌の分離源であり、これまでに世界各地の温泉水や温泉底泥から好熱菌の分離記載例が報告されている。インドネシアはユーラシアプレートとインド・オーストラリアプレートの収束境界に位置し、70以上の活動的火山がある (Fauzi *et al.*, 2000 ; Yohandini and Muharni, 2015)。そのため、多数の地熱地帯と様々な泉質を有する温泉が広く分布している (Yohandini and Muharni, 2015 ; Sriwana *et al.*, 2000)。このような環境は多様な好熱菌の分離源として有望であると推定される。

環境中の微生物多様性を調べる方法として、分離培養や集積培養を行い、単離した微生物の性状や集積培養液内の種組成を解析する「培養に依存した手法」と、環境中から直接抽出した DNA を用いて種組成を解析する「培養に依存しない手法」がある。しかし、環境中に生息する微生物についてその性状を解析するためには、純粋培養菌を得る必要がある。インドネシアのいくつかの温泉では、「培養に依存した手法」と「培養に依存しない手法」を用いて微生物の多様性が調べられており、多様な好熱菌の存在が確認されている (Huber *et al.*, 1991 ; Baker *et al.*, 2001 ; Löhr *et al.*, 2006 ; Aminin *et al.*, 2008 Aditiawati *et al.*, 2009 ; Yohandini and Muharni, 2015)。これらは、ジャワ島をはじめ、サンゲアン島、バリ島、スマトラ島の温泉に生息する微生物の多様性を調べており、同定された種の中には、生理生態学的特徴や最近縁種との 16S rRNA 遺伝子の相同性から新種と推定されるものも複数存在することがわかっている。ジャワ島の硫気地帯 Kawah Domas, Kawah Sikidang, Kawah Sileri の温泉水からは最近縁種との 16S rRNA 遺伝子の相同性から *Thermoplasma* 属の新種が同定されており (Huber *et al.*, 1991)、同じくジャワ島の硫気地帯 Kawah Candradimuka, Kawah Sileri の温泉水や、インドネシア西部の Domas や Cimanggu の温泉水からは生理生態学的特徴から新種と推定されるバクテリアが同定されている (Huber *et al.*, 1991 ; Baker *et al.*, 2001)。さらに、

ジャワ島西部の地熱地帯 Kawah Hujan B から同定された Crenarchaeota 門に属する複数種は、16S rRNA 遺伝子に基づく進化系統樹上の位置から既知種と別のクラスターを形成し、それらは新種の可能性が高いと考えられている (Aditiawati *et al.*, 2009). しかしながら、これらの新種と推定される種を分離し、記載した例は、ジャワ島の硫気地帯 Kawah Candradimuka 由来の新種バクテリア *Ammonifex degensii* の1種しかない (Huber *et al.*, 1996). それに加えて、その他のインドネシアの温泉に由来する新規好熱菌の分離報告例は、バクテリアでは2件しかなく (Kim *et al.*, 2001; Yokota *et al.*, 2016), アーキアでは、本論文中で述べる *Sulfurisphaera javensis* (Tsuboi *et al.*, 2018) 以外、報告がなかった. これらのことから、インドネシアの温泉において新種と推定される好熱菌の存在は確認されているものの、それらのほとんどが新規好熱菌として記載されていないのが現状である. そこで本研究では、インドネシアの温泉に生息する新規好熱菌の探索と記載のために、あらためて培養可能な微生物を探索し、分類学的な知見を得ることを目的として、微生物の集積培養と16S rRNA 遺伝子クローン解析法による種組成解析を行った.

## 2. 材料と方法

### 2.1 試料

2015年4月にインドネシアジャワ島西部の地熱地帯Kawah Domas (6.76S, 107.63E) 及びGunung Pancar (6.58S, 106.98E) において (Fig. 1), それぞれ2ヶ所及び1ヶ所の湯溜まりから、底泥を含む温泉水を採取した (Fig. 2). Kawah Domasの1つめの湯溜まり (KD1) の泉温は62℃, pHは3.3,



Fig. 1 Location of Kawah Domas and Gunung Pancar.

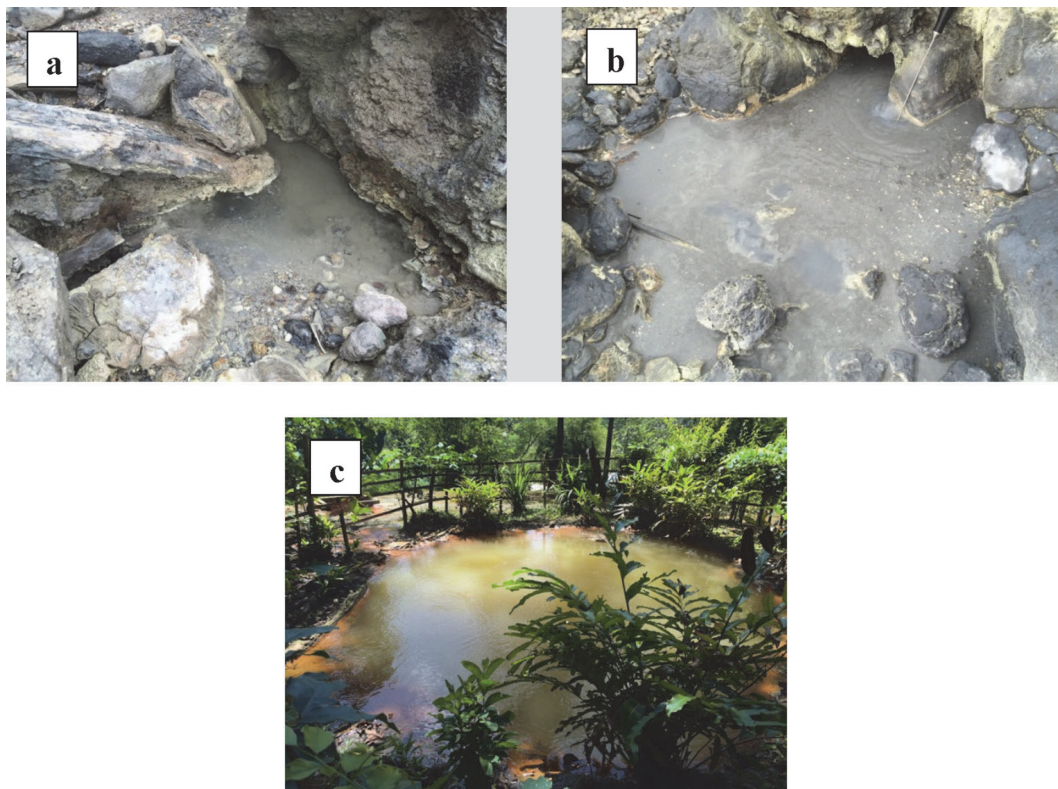


Fig. 2 Sampling ponds. a) KD1, Kawah Domas. b) KD2, Kawah Domas. c) GP, Gunung Pancar.

2つめの湯溜まり (KD2) の泉温は 75℃, pH は 3.8 であった. 採取時, これらの湯溜まりの表面には単体硫黄が析出しており, 硫化水素の匂いがした. また, Kawah Domas において湧出する温泉は酸性硫黄泉であるとの報告もあることから (Purnomo *et al.* 2016 ; Rahayudin *et al.*, 2018), 今回試料を採取した KD1 と KD2 も共に酸性硫黄泉であると推定された. Gunung Pancar の湯溜まり (GP) の泉温は 65℃, pH は 7.0 であった. Gunung Pancar の地質はカオリナイト ( $\text{Al}_4\text{Si}_4\text{O}_{10}(\text{OH})_8$ ) やディッカイト ( $\text{Al}_2\text{Si}_2\text{O}_5(\text{OH})\text{O}_4$ ) などが含まれていることが報告されており (Yoga *et al.*, 2020), 塩化物硫酸塩泉であると推定された. これらの試料は 20 mL のガラスバイアル瓶に入れ, 保温などの温度コントロール無しに実験室に輸送された.

## 2.2 集積培養

0.1% Yeast Extract を加えた MBS 培地 (Kurosawa *et al.*, 1998) 5 mL を, ねじ口試験管 (ST-16.5L, 日電理化硝子) に取り, 採取された温泉試料を 50  $\mu\text{L}$  加えて好熱菌の集積培養を行った. 培養温度と培地 pH は, 65℃, pH 3.0 (KD1), 75℃, pH 4.0 (KD2), 65℃, pH 7.0 (GP1) とした. さらに, いずれの温泉試料を用いた集積培養においても, 培養液に単体硫黄を添加しない系列と添加する系列を設け, 全 6 系列 (KD1 由来: Kd1, Kd1-S, Kd2, Kd2-S, GP 由来: Gp, Gp-S) とした. ねじ口試験管のキャップを軽く緩めた状態で, アルミブロック恒温槽 (DTU-1BN, タイテック) にセットし, 各培養温度で保温した. 好熱菌の増殖は, 培養液の 600 nm における吸光度 ( $\text{OD}_{600}$ ) を毎日測定することにより観察した. 好熱菌の増殖が確認された集積培養液 50  $\mu\text{L}$  を, 新しい培地 5 mL に植え

継ぎ, 同じ条件で培養を行うという操作(継代培養)を繰り返した。この継代培養を, 最初の培養を1代目として5代目まで行った。5代目の集積培養液を, 微生物種組成解析のためのDNA抽出用と, 分離培養に用いるための微生物凍結保存用に分け, それぞれ次のように調製, 保存した。まずDNA抽出用の試料として, 集積培養液1 mLを遠心分離(21,880 g, 25°C, 5分)し, 上澄み液を除いた湿菌体を-25°Cで冷凍保存した。微生物凍結保存用の試料は, 集積培養液600 µLに50%グリセロールを200 µL加えてよく混ぜることにより調製し, -80°Cで保存した。

### 2.3 16S rRNA 遺伝子クローン解析法による集積培養液中の微生物種組成解析

冷凍保存した湿菌体をTEバッファー(10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) 450 µLに再懸濁し, DNA抽出キット(Extrap Soil DNA Kit Plus ver. 2, 日鉄住金環境)を用いて全DNAを抽出した。このDNAを鋳型として, PCR法によりアーキアおよびバクテリアの16S rRNA遺伝子を増幅した。PCRプライマーとして, アーキアの16S rRNA遺伝子の増幅にはA340F(5'-CCCTAYGGYGCASCAG)とU1000R(5'-GGCCATGCACYWCYTCTC)(Gantner *et al.*, 2011)を, バクテリアの16S rRNA遺伝子の増幅にはB27F(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG)とU1492RM(5'-GGYTACCTTGTTACGACTT)(Nishiyama *et al.*, 2013)を用いた。PCR条件は, 初期変性(94°C, 3分), [変性(94°C, 30秒), アニール(57°C, 30秒), 伸長(72°C, 2分)]を30サイクル, 最終伸長(72°C, 5分)とした。得られたPCR産物を, DNA精製キット(NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Kit, タカラバイオ)を用いて精製し, Nishiyama *et al.* (2013)に従い16S rRNA遺伝子クローンライブラリーを構築した。これを用いて, Sakai and Kurosawa (2016)に従い各集積培養液中の微生物の種組成を明らかにした。16S rRNA遺伝子配列はEzTaxon(Kim *et al.*, 2012)を用いて既知の配列と比較し(Kim *et al.*, 2012), 98%以上の配列相同性を有する株は同種とみなした。

## 3. 結果および考察

インドネシアの地熱地帯の3ヶ所の温泉試料を用いて, それぞれ採取した環境に近い培養温度とpHを設定し, 硫黄を添加する系列と添加していない計6つの集積培養系列Kd1, Kd1-S, Kd2, Kd2-S, Gp, Gp-Sで微生物の集積培養を行った。その結果, 全ての系列で好熱菌の増殖が認められた。これら6つの集積培養系列それぞれに対し, 16S rRNA遺伝子クローン解析を行い, Kd1で39クローン, Kd1-Sで37クローン, Kd2で13クローン, Kd2-Sで11クローン, Gpで16クローン, Gp-Sで15クローンの合計131クローンが得られた。これらのクローンの塩基配列について, DNAデータベースに対する相同性検索を行った結果をTable 1に示す。

### 3.1 Kawah Domasの温泉由来の微生物

Kawah Domasの温泉由来の微生物はすべてアーキアであり, 記載種としてはいずれも好熱好酸性の*Metallosphaera sedula*と*Thermoplasma acidophilum*が検出された。*M. sedula*は生育温度50~80°C(至適生育温度75°C), 生育pH 1.0~4.5の偏性好気性アーキアであり, 酸性硫黄泉に生息する(Huber *et al.*, 1989)。また, 独立栄養的にも従属栄養的にも生育ができ, 独立栄養時には黄鉄鉱, 黄銅鉱, 閃亜鉛鉱などの硫化鉱石から金属を溶出する(Huber *et al.*, 1989)。さらに, 重金属に耐性を持つことから, 鉱石から金属を回収する技術であるバイオリッチングへの応用が期待されている(Huber *et al.*, 1989; Auernik *et al.*, 2008)。*T. acidophilum*は生育温度45~63°C(至適生育温度59°C), 生育pH 0.5~4(至適生育pH 1~2)の通性嫌気性アーキアである(Segerer *et al.*, 1988)。本種は1970年に石炭廃棄物から初めて分離され, その後も硫黄温泉や硫気孔などに生

育していることが確認されている (Darland *et al.*, 1970; Segerer *et al.*, 1988; Yasuda *et al.*, 1995). またインドネシアの温泉においても, *Thermoplasma* 属の存在が分離されているが (Huber *et al.*, 1991; Malik *et al.*, 2014), 性状に関する報告は無い. *T. acidophilum* は, 単体硫黄存在下で生育が非常に良くなることが知られており (Segerer *et al.*, 1988; Yasuda *et al.*, 1995), 本研究においても硫黄を含む集積培養液 (Kd1-S) 中でのみ増殖したと考えられる (Table. 1). また, 本研究では 65°C で集積培養を行ったが, *T. acidophilum* の基準株は生育上限温度が 63°C であると報告されている (Darland *et al.*, 1970; Segerer *et al.*, 1988). 今回検出された *T. acidophilum* の記載種との相性は 99.3% であるが, 生育温度の違いを考慮すると基準株とは別種の可能性もある.

KD1 の温泉由来の微生物に関して最も特筆すべき結果は, Archaeal Richmond Mine Acidophilic Nanoorganisms (ARMAN) 系統群および Miscellaneous Crenarchaeota group (MCG) 系統群に属する難培養性のアーキアが集積培養液中に検出されたことである. ARMAN 系統群は, 2006 年にアメリカのリッチモンド鉱山の強酸性廃水中で Baker らによって発見された新門レベルの未培養アーキア系統群である (Baker *et al.*, 2006). また, この系統群は, 細胞とゲノムサイズが非常に小さく, 代謝能力が制限され共生性のアーキアであると推定されている DPANN グループに属する (Chen *et al.*, 2018; Comolli *et al.*, 2009). しかしながら ARMAN の培養株が得られた例は今までになく, その生理学的特徴は不明な点が多い. 本研究では, ARMAN を含む集積培養液の 4 回の継代培養に成功したことから, 用いた培養条件が ARMAN の生育に適していたと考えられ, 今後, ARMAN の生理学的特性の特性評価が可能となることが期待される. 現在われわれは, これらのアーキアの性質の解明ならびに記載を目的として, 鋭意培養実験を行っているところである.

また, ARMAN に加えて MCG 系統群に属するアーキアも KD1 の集積培養液中に検出された. MCG 系統群は 2003 年に深海の海底堆積物から豊富に検出され, Miscellaneous Crenarchaeota group と呼ばれるようになり (Inagaki *et al.*, 2003), 2014 年に Bathyarchaeota 門として提唱された (Meng *et al.*, 2014). この系統群は地下水や水田土壌, 海底などの無酸素環境で生息する主要なアーキアの 1 つであり, 地球の生物地球化学的循環において重要な役割を果たしていると考えられている (Inagaki *et al.*, 2003; Lloyd *et al.*, 2013; Meng *et al.*, 2014; Pan *et al.*, 2020). しかしながら,

Table 1 Identified bacterial species in the enrichment cultures

Enrichment culture	Estimated species	Domain	16S rRNA gene similarity with closest species (%)	Number of clones
Kd1	<i>Metallosphaera sedula</i>	Archaea	99.1	37
	novel species of the MCG clade	Archaea	no related species	1
	novel species of the ARMAN clade	Archaea	no related species	1
Kd1-S	<i>Thermoplasma acidophilum</i>	Archaea	99.3	27
	<i>Metallosphaera sedula</i>	Archaea	99.1	7
	novel species of ARMAN clade	Archaea	no related species	3
Kd2	novel species of the genus <i>Sulfurisphaera</i>	Archaea	97.2	13
Kd2-S	novel species of the genus <i>Sulfurisphaera</i>	Archaea	97.2	6
	<i>Metallosphaera sedula</i>	Archaea	99.3	5
Gp	<i>Thermus brockianus</i>	Bacteria	98.9	13
	novel species of the genus <i>Thermus</i>	Bacteria	97.8	2
	<i>Thermus arciformis</i>	Bacteria	98.4	1
Gp-S	<i>Sulfurihydrogenibium subterraneum</i>	Bacteria	99.3	14
	<i>Geobacillus icigianus</i>	Bacteria	99.3	1

ARMAN と同様にこの系統群も純粋培養株が得られた例は今までになく、分離されれば少なくとも新綱レベルで新規なアーキアとなる。

KD2 由来の集積培養液中からは、KD1 由来の集積培養液中でも検出された既載種の *M. sedula* に加えて、同じく好熱好酸性アーキアである *Sulfurisphaera* 属の新種 1 種が検出された。この *Sulfurisphaera* 属の新種は、われわれのグループで集積培養液から単離し、詳細な性質解析結果に基づいて、すでに *Sulfurisphaera javensis* として記載されている (Tsuboi *et al.*, 2018)。性質解析の結果、*S. javensis* は生育温度 60~90°C (至適生育温度 80~85°C)、生育 pH 2.5~6.0 (至適生育 pH 3.5~4.0) の通性嫌気性アーキアであることがわかった (Tsuboi *et al.*, 2018)。また、単体硫黄、塩化鉄 (III) の存在下で嫌氣的に増殖し、好氣的条件下で化学独立栄養的に増殖する (Tsuboi *et al.*, 2018)。*Sulfurisphaera* 属は 1998 年に箱根の大涌谷温泉から分離された超好熱菌 *Sulfurisphaera ohwakuensis* が記載されて以来 20 年間 1 種のみであった (Kurosawa *et al.*, 1998)。今回、*S. javensis* の記載と同時に *Sulfurisphaera tokodaii* の再分類も行われ、*Sulfurisphaera* 属は現在 3 種で構成されている。インドネシアの温泉からの新規超好熱性アーキアの分離例はこれまでに無く、*Sulfurisphaera* 属として記載された最初の例となった。

### 3.2 Gunung Pancar の温泉由来の微生物

Gunung Pancar の温泉由来の集積培養液中に検出された好熱菌はすべてバクテリアであり、硫黄を含まない集積培養液中 (Gp) からは、新種を含む 3 種の *Thermus* 属に属する種が検出された。現在までに、*Thermus* 属には合計 17 種が記載されており、これらの原記載株は主に中国、アメリカ合衆国、およびアイスランドの温泉から分離されている (Brock and Freeze, 1969; Williams *et al.*, 1995; Chung *et al.*, 2000; Bjornsdottir *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2010; Ming *et al.*, 2014; Yu *et al.*, 2015; Khan *et al.*, 2017; Zhou *et al.*, 2018; Ming *et al.*, 2020)。また、この種は温泉だけではなく、水道水のような人工的な環境からも分離され、世界中の熱環境の至る所に分布している (Brock and Freeze, 1969; Kristjansson *et al.*, 1994; Williams *et al.*, 1995)。*Thermus* 属は、グラム陰性の桿菌で好気性のバクテリアとして知られており、生育温度 40~79°C (至適生育温度 70~72°C)、生育 pH 6~9.5 (至適生育 pH 7.5~7.8) である (Brock and Freeze, 1969)。

硫黄を含む集積培養液中 (Gp-S) からは Gp では検出されなかった記載種 *Sulfurihydrogenibium subterraneum* と *Geobacillus icigianus* が検出された。*S. subterraneum* は生育温度 40~70°C (至適生育温度 60~65°C)、生育 pH 6.4~8.8 (至適生育 pH 7.5) の通性嫌気性のバクテリアである (Takai *et al.*, 2003)。原記載株は鹿児島県の菱刈金鉱山の地下の熱水帯水層から分離された (Takai *et al.*, 2003)。種名の由来である「subterranean」は「地下」を意味するが、今回は地下ではなく陸上温泉から検出された。また、今までにインドネシアのいくつかの温泉において微生物の多様性が調べられきたが (Huber *et al.*, 1991; Baker *et al.*, 2001; Löhr *et al.*, 2006; Aminin *et al.*, 2008 Aditiawati *et al.*, 2009; Yohandini and Muharni, 2015)、本種が属する Aquificae 門のバクテリアがインドネシアの温泉で検出されたのは初めてである。Aquificae 門は水素をエネルギー源として利用できることが特徴的であり (Gupta, 2014)、本種は水素、チオ硫酸塩、または硫黄元素を電子供与体として、二酸化炭素を炭素源としてのみ増殖できる偏性化学合成独立栄養性細菌である (Takai *et al.*, 2002)。本研究において検出された *S. subterraneum* は、硫黄を添加した Gp-S の集積培養液中で優占しており (14 クローン)、単体硫黄を利用することで増殖能力が向上した可能性がある。一方 *G. icigianus* は、生育温度 50~75°C (至適生育温度 60~65°C)、生育 pH 5.0~9.0 (至適生育 pH 6.5~7.0) の好気性もしくは通性嫌気性のバクテリアである (Bryanskaya *et al.*, 2015)。原記載株はロシアの間欠泉から分離された (Bryanskaya *et al.*, 2015)。現在までに、*Geobacillus* 属には計 14 種が

記載されているが、これらの原記載株は中国、ロシア、カザフスタンなど世界中に広く分布しており、油田や缶詰、土壌などあらゆるところから分離されている (Donk, 1920 ; Priest *et al.*, 1988 ; Manachini *et al.*, 2000 ; Nazina *et al.*, 2001 ; Kuisiene *et al.*, 2004 ; Nazina *et al.*, 2005 ; Bryanskaya *et al.*, 2015 ; Semenova *et al.*, 2019)。

#### 4. ま と め

インドネシアジャワ島西部の地熱地帯 Kawah Domas 及び Gunung Pancar において計 3 ヶ所の温泉試料を用いて集積培養を行い、培養液中の好熱菌の種組成を調べた。その結果、6 種のアーキアと 5 種の細菌が集積培養液中に検出された。集積培養条件に硫黄の添加の有無を加えることにより、より多くの種の検出に成功した。本研究により、これまで情報の少なかったインドネシアの温泉に生息する好熱菌に関する知見が広がったが、同国にはまだまだ無数の温泉が分布し多種多様な好熱菌が生息していると考えられ、今回得られた情報はその一端に過ぎない。また、採取した 3 つの温泉水全てで新種が検出された。検出された新種の中には、難培養性で非常に新規性の高いアーキアも含まれており、インドネシアの温泉が新規好熱菌の探索フィールドとして価値があるという結果となった。

#### 引用文献

- Adiawati, P., Yohandini, H., Madayanti, F. and Akhmaloka. (2009) : Microbial diversity of acidic hot spring (Kawah Hujan B) in geothermal area West Java-Indonesia. *Open Microbiol. J.*, **3**, 58-66.
- Aminin, A.L.N., Warganegara, F.M., Aditiawati, P., Akhmaloka. (2008) : Simple enrichment and independent cultures to expand bacterial community analysis from Gedongsongo Hot Spring. *J. Biosci. Bioeng.*, **106**, 211-214.
- Auernik, K.S., Maezato, Y., Blum, P.H. and Kelly, R.M. (2008) : The genome sequence of the metal-mobilizing, extremely thermoacidophilic archaeon *Metallosphaera sedula* provides insights into bioleaching-associated metabolism. *Appl. Environ. Microbiol.*, **74**, 682-692.
- Baker, B.J., Tyson, G.W., Webb, R.L., Flanagan, J., Hugenholtz, P., Allen, E.E. and Banfield, J.F. (2006) : Lineages of acidophilic archaea revealed by community genomic analysis. *Science*, **314**, 1933-1935.
- Baker, G.C., Gaffar, S., Cowan, D.A. and Suharto, A.R. (2001) : Bacterial community analysis of Indonesian hot springs. *FEMS Microbiol. Lett.*, **200**, 103-109.
- Bjornsdottir, S.H., Petursdottir, S.K., Hreggvidsson, G.O., Skirnisdottir, S., Hjorleifsdottir, S., Arnfinnsson, J. and Kristjansson, J.K. (2009) : *Thermus islandicus* sp. nov., a mixotrophic sulfur-oxidizing bacterium isolated from the Torfajokull geothermal area. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **59**, 2962-2966.
- Brock, T.D. and Freeze, H. (1969) : *Thermus aquaticus* gen. n., a nonsporulating extreme thermophile. *J. Bacteriol.*, **98**, 289-297.
- Bryanskaya, A.V., Rozanov, A.S., Slynko, N.M., Shekhovtsov, S.V. and Peltek, S.E. (2015) : *Geobacillus icigianus* sp nov., a thermophilic bacterium isolated from a hot spring. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **65**, 864-869.
- Chen, L.-X., Méndez-García, C., Dombrowski, N., Servín-Garcidueñas, L.E., Eloë-Fadrosh, E.A.,



- Fang, B.-Z., Luo, Z.-H., Tan, S., Zhi, X.-Y., Hua, Z.-S. *et al.* (2018) : Metabolic versatility of small archaea Micrarchaeota and Parvarchaeota. *ISME J.*, **12**, 756–775.
- Chung, A.P., Rainey, F.A., Valente, M., Nobre M.F. and da Costa, M.S. (2000) : *Thermus igniterrae* sp. nov. and *Thermus antranikianii* sp. nov., two new species from Iceland. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **50**, 209–217.
- Comolli, L.R., Baker, B.J., Downing, K.H., Siegerist, C.E. and Banfield, J.F. (2009) : Three-dimensional analysis of the structure and ecology of a novel, ultra-small archaeon. *ISME J.*, **3**, 159–167.
- Darland, G., Brock, T.D., Samsonoff, W. and Conti, S.F. (1970) : A thermophilic, acidophilic mycoplasma isolated from a coal refuse pile. *Science*, **170**, 1416–1418.
- Donk, P.J. (1920) : A highly resistant thermophilic organism. *J. Bacteriol.*, **5**, 373–374.
- Fauzi, A., Bahri, S. and Akuanbatin, H. (2000) : Geothermal development in Indonesia : an overview of industry status and future growth. *Proceedings World Geothermal Congress 2000, Japan.*
- Gantner, S., Andersson, A.F., Alonso-Sáez, L. and Bertilsson S. (2011) : Novel primers for 16S rRNA-based archaeal community analyses in environmental samples. *J. Microbiol. Methods*, **84**, 12–18.
- Gupta, R.S. (2014) : “The Phylum Aquificae,” in *The Prokaryotes : Other Major Lineages of Bacteria and The Archaea*, eds Rosenberg, E., DeLong, E.F., Lory, S., Stackebrandt, E. and Thompson, F. (Berlin, Heidelberg: Springer), 417–445.
- Huber, G., Huber, R., Jones, B.E., Laurer, A., Neuner, A., Segerer, A., Stetter, K.O. and Degens, E.T. (1991) : Hyperthermophilic archaea and bacteria occurring within Indonesian hydrothermal areas. *Syst. Appl. Microbiol.*, **14**, 397–404.
- Huber, G., Spinnler, C., Gambacorta, A. and Stetter, K.O. (1989) : *Metallosphaera sedula* gen. and sp. nov. represents a new genus of aerobic, metal-mobilizing, thermoacidophilic archaeobacteria. *Syst. Appl. Microbiol.*, **12**, 38–47.
- Huber, R., Rossnagel, P., Woese, C.R., Rachel, R., Langworthy, T.A. and Stetter, K.O. (1996) : Formation of ammonium from nitrate during chemolithoautotrophic growth of the extremely thermophilic bacterium *Ammonifex degensii* gen. nov. sp. nov. *Syst. Appl. Microbiol.*, **19**, 40–49.
- Inagaki, F., Suzuki, M., Takai, K., Oida, H., Sakamoto, T., Aoki, K., Nealson, K.H. and Horikoshi, K. (2003) : Microbial communities associated with geological horizons in coastal seafloor sediments from the Sea of Okhotsk. *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**, 7224–7235.
- Khan, I.U., Habib, N., Hussain, F., Xian, W.D., Amin, A., Zhou, E.M., Ahmed, I., Zhi, X.Y. and Li, W.J. (2017) : *Thermus caldifontis* sp. nov., a thermophilic bacterium isolated from a hot spring. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **67**, 2868–2872.
- Kim, B.-C., Grote, R., Lee, D.-W., Antranikian, G. and Pyun, Y.-R. (2001) : *Thermoanaerobacter yonseiensis* sp. nov., a novel extremely thermophilic, xylose-utilizing bacterium that grows at up to 85°C. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **51**, 1539–1548.
- Kim, O.-S., Cho, Y.-J., Lee, K., Yoon, S.-H., Kim, M., Na, H., Park, S.-C., Jeon, Y.S., Lee, J.-H., Yi, H., Won, S. and Chun, J. (2012) : Introducing EzTaxon-e : a prokaryotic 16S rRNA gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **62**, 716–721.
- Kristjansson, J.K., Hjörleifsdóttir, S., Marteinson, V.T. and Alfredsson, G.A. (1994) : *Thermus*

- scotoductus*, sp. nov., a Pigment-Producing Thermophilic Bacterium from Hot Tap Water in Iceland and Including *Thermus* sp. X-1. Syst. appl. Microbiol., **17**, 44–50.
- Kuisiene, N., Raugalas, J. and Chitavichius, D. (2004) : *Geobacillus lituanicus* sp. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., **54**, 1991–1995.
- Kurosawa, N., Itoh, Y.H., Iwai, T., Sugai, A., Uda, I., Kimura, N., Horiuchi, T. and Itoh, T. (1998) : *Sulfurisphaera ohwakuensis* gen. nov., sp. nov., a novel extremely thermophilic acidophile of the order Sulfolobales. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., **48**, 451–456.
- Lloyd, K.G., Schreiber, L., Petersen, D.G., Kjeldsen, K.U., Lever, M.A., Steen, A.D., Stepanauskas, R., Richter, M., Kleindienst, S., Lenk, S., Schramm, A. and Jørgensen, B.B. (2013) : Predominant archaea in marine sediments degrade detrital proteins. Nature, **496**, 215–218.
- Löhr, A.J., Laverman, A.M., Braster, M., van Straalen, N.M. and Röling, W.F.M. (2006) : Microbial communities in the World's Largest Acidic Volcanic Lake, Kawah Ijen in Indonesia, and in the Banyupahit river originating from it. Microbiol. Ecol., **52**, 609–618.
- Malik, A., Santoso, I., Yehuda, A., Freisleben, S.K.U., Wanandi, S.I., Huber, H., Luthfa, Z., Saleh, R. and Freisleben, H.-J. (2014) : Characterization of thermoplasma species cultured from sampling on Tangkuban Perahu, Indonesia. Microbiol. Indones., **8**, 16–23.
- Manachini, P.L., Mora, D., Nicastro, G., Parini, C., Stackebrandt, E., Pukall, R. and Fortina, M.G. (2000) : *Bacillus thermodenitrificans* sp. nov., nom. rev. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., **50**, 1331–1337.
- Meng, J., Xu, J., Qin, D., He, Y., Xiao, X. and Wang, F. (2014) : Genetic and functional properties of uncultivated MCG archaea assessed by metagenome and gene expression analyses. ISME J., **8**, 650–659.
- Ming, H., Yin, Y.R., Li, S., Nie, G.X., Yu, T.T., Zhou, E.M., Liu, L., Dong, L., Li, W.J. (2014) : *Thermus caliditerrae* sp. nov., a novel thermophilic species isolated from a geothermal area. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., **64**, 650–656.
- Ming, H., Zhao, Z.-l., Ji, W.-l., Ding, C.-L., Cheng, L.-j., Niu, M.-m., Li, M., Yi, B.-f., Xia, T.-t. and Nie, G.-x. (2020) : *Thermus thermamylovorans* sp. nov., isolated from a hot spring. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., **70**, 1729–1737.
- Nazina, T.N., Tourova, T.P., Poltarau, A.B., Novikova, E.V., Grigoryan, A.A., Ivanova, A.E., Lysenko, A.M., Petrunyaka, V.V., Osipov, G.A., Belyaev, S.S. *et al.* (2001) : Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli : descriptions of *Geobacillus subterraneus* gen. nov., sp. nov. and *Geobacillus uzenensis* sp. nov. from petroleum reservoirs and transfer of *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus thermocatenulatus*, *Bacillus thermoleovorans*, *Bacillus kaustophilus*, *Bacillus thermodenitrificans* to *Geobacillus* as the new combinations *G. stearothermophilus*, *G. thermocatenulatus*, *G. thermoleovorans*, *G. kaustophilus*, *G. thermoglucosidasius* and *G. thermodenitrificans*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., **51**, 433–446.
- Nazina, T.N., Sokolova, D.S.h., Grigoryan, A.A., Shestakova, N.M., Mikhailova, E.M., Poltarau, A.B., Tourova, T.P., Lysenko, A.M., Osipov, G.A. and Belyaev, S.S. (2005) : *Geobacillus jurassicus* sp. nov., a new thermophilic bacterium isolated from a high-temperature petroleum reservoir, and the validation of the *Geobacillus* species. Syst. Appl. Microbiol., **28**, 43–53.
- Nishiyama, M., Yamamoto, S. and Kurosawa, N. (2013) : Microbial community analysis of a coastal hot spring in Kagoshima, Japan, using molecular- and culture-based approaches. J. Microbiol.,

51, 413-422.

- Pan, J., Zhou, Z., Bèjà, O., Cai, M., Yang Y., Liu, Y., Gu, J.-D. and Li, M. (2020) : Genomic and transcriptomic evidence of light-sensing, porphyrin biosynthesis, Calvin-Benson-Bassham cycle, and urea production in Bathyarchaeota. *Microbiome*, **8**, 43.
- Priest, F.G., Goodfellow, M. and Todd, C. (1988) : A numerical classification of the genus *Bacillus*. *J. Gen. Microbiol.*, **134**, 1847-1882.
- Purnomo, B.J., Pichler, T. and You, C.-F. (2016) : Boron isotope variations in geothermal systems on Java, Indonesia. *J. Volc. Geotherm. Res.*, **311**, 1-8.
- Rahayudin, Y., Kashiwaya, K., Tada, Y., Koike, K., Heriawan, M.N. and Susmanto, A. (2018) : Clarifying the fluid interaction process by water geochemistry with a case study of the Tangkuban Perahu area, West Java, ISME-XV, Kyoto, Japan.
- 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.
- Seegerer, A., Langworthy, T.A. and Stetter, K.O. (1988) : *Thermoplasma acidophilum* and *Thermoplasma volcanium* sp. nov. from solfatara fields. *Syst. Appl. Microbiol.*, **10**, 161-171.
- Semenova, E.M., Sokolova, D.S., Grouzdev, D.S., Poltarau, A.B., Vinokurova, N.G., Tourova, T.P. and Nazina, T.N. (2019) : *Geobacillus proteiniphilus* sp. nov., a thermophilic bacterium isolated from a high-temperature heavy oil reservoir in China. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **69**, 3001-3008.
- Sriwana, T., van Bergen, M.J., Varekamp, J.C., Sumarti, S., Takano, B., van Os, B.J.H. and Leng, M.J. (2000) : Geochemistry of the acid Kawah Putih lake, Patuha Volcano, West Java, Indonesia. *J. Volcanol. Geotherm. Res.*, **97**, 77-104.
- Takai, K., Hirayama, H., Sakihama, Y., Inagaki, F., Yamato, Y. and Horikoshi, K. (2002) : Isolation and metabolic characteristics of previously uncultured members of the order *Aquificales* in a subsurface gold mine. *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**, 3046-3054.
- Takai, K., Kobayashi, H., Neelson, K.H. and Horikoshi, K. (2003) : *Sulfurihydrogenibium subterraneum* gen. nov., sp. nov., from a subsurface hot aquifer. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **53**, 823-827.
- Tsuboi, K., Sakai, H.D., Nur, N., Stedman, K.M., Kurosawa, N. and Suwanto, A. (2018) : *Sulfurisphaera javensis* sp. nov., a hyperthermophilic and acidophilic archaeon isolated from Indonesian hot spring, and reclassification of *Sulfolobus tokodaii* Suzuki *et al.* 2002 as *Sulfurisphaera tokodaii* comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **68**, 1907-1913.
- Williams, R.A.D., Smith, K.E., Welch, S.G., Micallef, J. and Sharp, R.J. (1995) : DNA relatedness of *Thermus* strains, description of *Thermus brockianus* sp. nov., and proposal to reestablish *Thermus thermophilus* (Oshima and Imahori). *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **45**, 495-499.
- Yasuda, M., Oyaizu, H., Yamagishi, A. and Oshima, T. (1995) : Morphological variation of new *Thermoplasma acidophilum* isolates from Japanese hot springs. *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**, 3482-3485.
- Yoga, D.A., Sahdarani, D.N., Sihombing, F.M.H., Grandis, G., Supriyanto and Kadja, G.T.M. (2020) : Characteristics of surface hydrothermal alteration around Gunung Pancar area, West Java, Indonesia. *IOP Conf. Ser. : Earth Environ. Sci.*, **538**, 012017.
- Yohandini, H. and Muharni, J. (2015) : Isolation and phylogenetic analysis of thermophile community within Tanjung Sakti hot spring, South Sumatera, Indonesia. *HAYATI J. Biosci.*, **22**, 143-148.

- Yokota, A., Ningsih, F., Nurlaili, D.G., Sakai, Y., Yabe, S., Oetari, A., Santoso, I. and Sjamsuridzal, W. (2016) : *Paenibacillus cisolokensis* sp. nov., isolated from litter of a geyser. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., **66**, 3088-3094.
- Yu, T.T., Ming, H., Yao, J.C., Zhou, E.M., Park, D.J., Hozzein, W.N., Kim, C.-J., Wadaan M.A.M. and Li, W.-J. (2015) : *Thermus amyloliquefaciens* sp. nov., isolated from a hot spring sediment sample. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., **65**, 2491-2495.
- Zhang, X.-Q., Ying, Y., Ye, Y., Xu, X.-W., Zhu, X.-F. and Wu, M. (2010) : *Thermus arciformis* sp. nov., a thermophilic species from a geothermal area. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., **60**, 834-839.
- Zhou, E.-M., Xian, W.-D., Jiao, J.-Y., Liu, L., Li, M.-M., Ding, Y.-P., Yin, Y.-R., Zhao, J., Nimaichand, S., Xiao, M. and Li, W.-J. (2018) : Physiological and genomic properties of *Thermus tenuipunicus* sp. nov., a novel slight reddish color member isolated from a terrestrial geothermal spring. Syst. Appl. Microbiol., **41**, 611-618.