



## 鹿児島県霧島地域の高温・強酸性温泉における 原核生物群集の生物多様性評価

佐藤 智子<sup>1)</sup>

(平成 27 年 11 月 26 日受付, 平成 27 年 12 月 25 日受理)

### Prokaryotic Community Structures and Biodiversity in the Highly Acidic Hot Springs in the Kirishima Geothermal area, Kagoshima Prefecture

Tomoko SATOH<sup>1)</sup>

#### Abstract

The biosphere in terrestrial, highly acidic hot springs is composed solely of chemotrophic prokaryotic communities. The major environmental factors affecting these organisms are expected to be temperature and chemical composition. The bacterial and archaeal 16S rRNA gene composition and environmental characteristics of four distinct solfataric-acidic ponds in the Kirishima geothermal area, Kagoshima Prefecture, Japan, were compared. The four ponds were selected based on differences in temperature and the total concentration of examined chemical components : 1) Pond-A : 93°C and 57.9 mmol L<sup>-1</sup> ; 2) Pond-B : 66°C and 73.4 mmol L<sup>-1</sup> ; 3) Pond-C : 88°C and 6.73 mmol L<sup>-1</sup> ; and 4) Pond-D : 67°C and 11.5 mmol L<sup>-1</sup>. In total, 372 clones of the bacterial 16S rRNA gene were classified into 35 phylotypes. The dominant bacterial group was the class  $\gamma$ -Proteobacteria. Bacterial species diversity was greatest in Pond-D, and the dominant phylotype detected (37% of all clones) was closely related to *Acinetobacter junii*. Pond-B had the relative highest total concentration of examined chemical components, where the bacterial species diversity was the lowest despite the greatest genetic diversity among the four ponds. The bacterial community was dominated by a phylotype closely related to *Acidithiobacillus caldus* as well as an uncultured species of  $\delta$ -Proteobacteria. Pond-A and Pond-C had the relative highest temperatures and were dominated by a phylotype closely related to *Acinetobacter johnsonii* (accounted for more than 57% of the identified clones). On the other hand, total 431 clones of the archaeal 16S rRNA gene were classified into 26 phylotypes. In Pond-B, the archaeal genetic diversity and the species diversity was the highest among the four, and the member of order Sulfolobales were dominant. The Pond-D also shown relatively high species diversity and

<sup>1)</sup>創価大学理工学部共生創造理工学科 〒192-8577 東京都八王子市丹木町 1-236. <sup>1)</sup>Department of Science and Engineering for Sustainable Innovation, Faculty of Science and Engineering, Soka University, 1-236 Tangi-machi, Hachioji, Tokyo 192-8577, Japan. \*Corresponding author : E-mail astomoko76@soka.gr.jp

the most frequent group was uncultured thermoacidic spring clone group. In contrast to Pond-B and Pond-D, much less diverse archaeal clones were detected in Pond-A and Pond-C showing higher temperatures. Especially in Pond-A showing relatively high total concentration of examined chemical components, the archaeal genetic diversity and the species diversity was the lowest among the four ponds. The dominant archaeal groups in these ponds were also different. The members of the order Sulfolobales shared of 89% of total clones in Pond-A, and the uncultured crenarchaeal groups shared 99% of total Pond-C clones. This study highlights the different bacterial and archaeal species composition and biodiversity present in solfataric-acidic ponds characterized by different temperatures and chemical components.

Key words : Kirishima geothermal area, bacteria, archaea, community structure, diversity, statistical analysis, environmental factor

## 要 旨

高温 (60°C 以上)・強酸性 (pH4 未満) の温泉生態系に生息する唯一の生物は、化学合成を行う原核生物であり、それらに最も影響を与える主要環境要因は温度および化学成分であると考えられる。本研究では、温度や化学成分が異なる温泉間における原核生物の群集構造および生物多様性を評価・比較するため、鹿児島県霧島地域に分布する 4 つの強酸性硫黄泉における細菌および古細菌群集構造を、16S rRNA 遺伝子クローン解析法、および統計学的手法を用いて解析した。選択した温泉の温度および総化学成分量は、1) Pond-A : 93°C, 57.9 mmol L<sup>-1</sup>, 2) Pond-B : 66°C, 73.4 mmol L<sup>-1</sup>, 3) Pond-C : 88°C, 6.73 mmol L<sup>-1</sup>, 4) Pond-D : 67°C, 11.5 mmol L<sup>-1</sup> であった。4 つの温泉由来の計 372 細菌クローンは 35 系統群に分類され、何れの温泉においても  $\gamma$ -Proteobacteria 綱が優占していた。細菌の種多様性が最も高かったのは、温度と総化学成分量が共に相対的に低い Pond-D であり、この温泉では *Ainetobacter junii* に近縁な種が全クローンの 37% を占めていた。Pond-D と同程度の温度ながら総化学成分量が相対的に高い Pond-B では、遺伝的多様性が最も高く、*Acidithiobacillus caldus* の近縁種および  $\delta$ -Proteobacteria 綱に属する未培養細菌が優占していた。温度が相対的に高い Pond-A と C では、*Acinetobacter johnsonii* が全クローンの 57% 以上を占めていた。一方、計 431 古細菌クローンは 26 系統群に分類された。古細菌の遺伝的および種多様性が最も高かったのは Pond-B で、この温泉では Sulfolobales 目に属する古細菌が 52% を占めていた。Pond-D も比較的高い遺伝的および種多様性を示したが、ここで優占していたのは uncultured thermoacidic spring clone group (UTSCG) と呼ばれる未培養古細菌で全体の 58% を占めていた。温度が相対的に高い Pond-A と C における優占種は 2 つの温泉間では大きく異なり、Pond-A では Sulfolobales 目に属する古細菌が 89% を占めていたのに対し、Pond-C では Crenarchaeota 門に属する未培養古細菌が全体の 99% を占めていた。本研究により、霧島地域の温度や化学成分が異なる酸性硫黄泉間における細菌および古細菌の群集構造と生物多様性の具体的な違いが明らかとなった。

キーワード：霧島温泉群、細菌、古細菌、群集構造、多様性、統計学的解析、環境要因

## 1. はじめに

硫気孔を伴うような陸上の火山性温泉や海底の熱水噴出孔周辺のような高温環境は極限環境の一つと位置づけられる。こうした環境はヒトを含む一般的に知られる生物の生存にとって非常に過酷な環境である。現在までにこのような極限環境にも培養法に基づき多様な微生物の存在が確認されているが、土壌、河川、海洋のような常温環境と比較すると微生物の多様性が低いことが知られている。従って、極限環境を調査対象として選択することは、微生物間の相互作用や周辺環境との関係性を明らかにする上で都合がよい。実際、60°C 以上および pH4 未満を示す高温・強酸性温泉は、生物相が化学合成を行う原核生物のみで構成される単純な生態系である (Madigan *et al.*, 2005 ;

Cox *et al.*, 2011). 原核生物とはDNAが核様体として存在する細胞構造が単純な単細胞生物であり、細菌および古細菌の2つの異なる系統の生物群によって構成されている。そのため高温・強酸性温泉に生息する細菌および古細菌を調査対象生物にすることにより、ある一つの生態系を構成する全生物群の多様性評価が可能であると考えられる。また、高温・強酸性温泉では鉱物、金属、ケイ素の溶解が促進されるため、このような生態系において原核生物に最も影響を与える主要な環境要因は、温度および化学成分であると考えられる。以上のことから、ある火山性地熱地帯に分布する温度および化学成分が大きく異なる複数の高温・強酸性温泉を選択することにより、ある生態系における全生物群の多様性と主要環境要因との関係性について明らかにできると考えられた。

本研究では、1) 鹿児島県霧島地熱地域に分布する火山性温泉水の化学的特徴に関する研究 (Sato *et al.*, 2015), 2) 温度および化学成分が大きく異なる4つの強酸性温泉において、16S rRNA 遺伝子クローン解析法に基づいて細菌群集の生物多様性(群集構造、遺伝的多様度、種多様度)の評価・比較に関する研究 (Sato *et al.*, 2013b), 3) 細菌群集調査と同一地点における古細菌群集の生物多様性評価に関する研究 (Sato *et al.*, 2013a), 4) 細菌および古細菌群集の生物多様性と主要環境要因との関連性 (Sato *et al.*, 2013a, b) について紹介する。

## 2. 材料および方法

### 2.1 試料の採取

霧島火山群は、鹿児島・宮崎両県の県境に位置する日本における最も大きな第四紀の火山群の一つである (Fig. 1)。フィリピン海プレートがユーラシアプレートに沈み込むことによって発生した

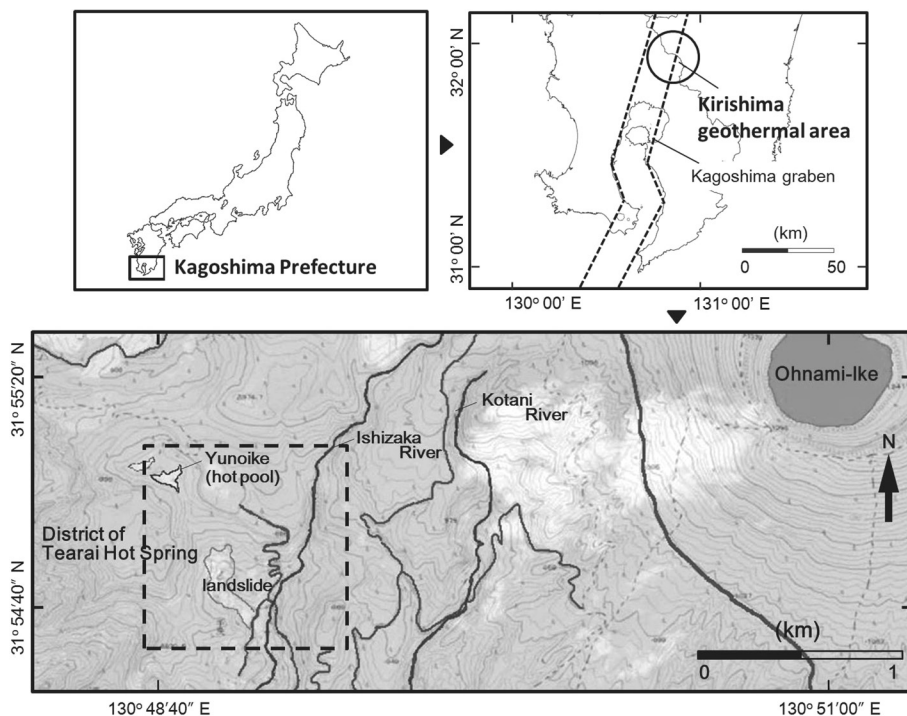


Fig. 1 Map of the sampling site in and near the region of the Tearai hot spring in the Kirishima geothermal area. The dotted box shows the area sampled in this study.

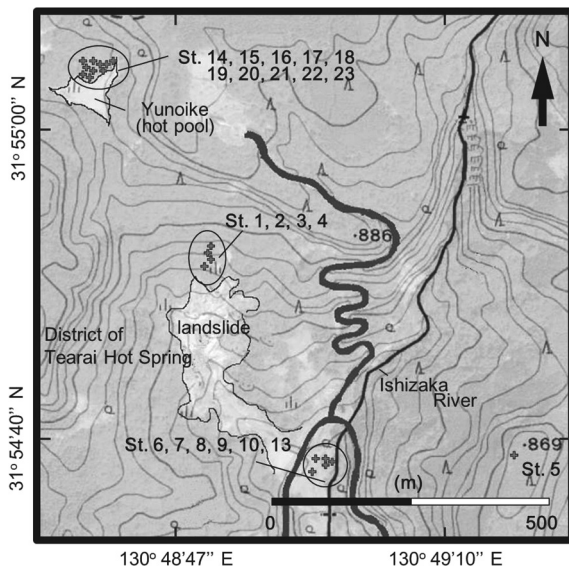


Fig. 2 Location of pond-water sampling stations in the Kirishima geothermal area.

鹿児島地溝の北部に位置しており、20以上の小規模火山で構成される。更新世から現在に至るまで活発な火山活動が続いている。本研究では、2005年7月、2006年2月および6月の計3回にわたり霧島地熱地域内の手洗い温泉地区の1km<sup>2</sup>区画内に分布する21定点の温泉水および底泥試料を無作為に採取した (Fig. 2)。この場所は私有地であるため人の侵入が制限されているとともに上流には民家や農耕地は見当たらないため、人為的活動による汚染の影響は少ないと考えられた。温度およびpHは現場で測定し、試料はガラス試料ビンに入れ実験室に持ち帰った。試料の一部は0.22 μmメンブレンフィルターで濾過し、1% (v/v) 硝酸で酸処理後、化学成分分析を行うまで4°Cで保存した。一方、底泥試料は原核生物の生物多様性解析を行うまで-25°Cで保存した。

## 2.2 温泉水の化学成分分析

21定点の温泉水の溶存元素組成をICP発光分光分析法 (ICP-AES, ICP-7000 Ver. 2, Shimadzu) により測定した。72元素を対象とした定性分析で検出が確認された21種類の元素 (Li, Na, Mg, Al, Si, P, S, K, Ca, Cr, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, As, Rb, Sr, Cd, Cs, and Pb) について定量分析を行った。

## 2.3 16S rRNA 遺伝子クローン解析法に基づく細菌および古細菌の群集構造解析

温度および化学成分が大きく異なる4定点の強酸性温泉を主成分分析により選択し、底泥試料から環境DNAをUltraClean Soil DNA Kit Mega Prep (Mo Bio Laboratories) を用いて抽出・精製した。これを鋳型とし、細菌および古細菌群集各々の16S rRNA遺伝子を増幅した。使用したプライマーは次の通りである。細菌特異的の順方向プライマー: B27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'), 古細菌特異的の順方向プライマー: A21F (5'-TTCCGGTTGATCCYGCCGGA-3'), 細菌および古細菌共通の逆方向プライマー: U1492R (5'-GGYTACCTTGTTACGACTT-3')。16S rRNA遺伝子クローンライブラリを作製後、無作為に選択したクローンの部分塩基配列を決定した。塩基配列の相同性が97%以上を示したクローン同士を同一系統群 (便宜上の同一種) と定義し、細菌および古



細菌の既知の塩基配列に対する相同性検索 (BLASTN ; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) により種の同定を行った。その後、最尤法により進化系統樹を作成し、検出された系統群の系統関係を明らかにするとともに、各温泉における細菌および古細菌群集の種組成を明らかにした。

## 2.4 生物多様性指数の算出および統計学的解析

霧島地熱地域に分布する 21 定点の強酸性温泉水の化学的特徴は、温度および溶存元素を環境変数として主成分分析を行うことで明らかにした。生物多様性を評価する多様度指数として、生物多様性被覆率、種多様度指数 (Shannon-Wiener index)、推定種数 (Chao1 nonparametric richness estimator)、遺伝的多様度指数 (nucleotide diversity) を算出した。さらに、主要環境要因間の関係性ならびに、細菌および古細菌群集の生物多様性と主要環境要因との関係性はピアソンの積率相関係数および正準相関分析により求めた。

## 3. 結果および考察

### 3.1 鹿児島県霧島地熱地域における火山性温泉水の化学的特徴

21 定点の温泉水の温度、pH、総化学成分量の範囲は、各々 63–94°C (平均値: 83°C)、1.8–4.0 (2.5), 3.1–82 mmol L<sup>-1</sup> (26 mmol L<sup>-1</sup>) であったため、霧島地熱地域の手洗い温泉地区内に分布する温泉は強酸性高温泉であった (Sato *et al.*, 2015)。全温泉水に共通する主要元素は S および Si であった。定量分析を行った 21 元素中、検出されたのは 12 元素 (Fe, S, Al, Mg, Si, Ca, P, Na, K, As, Rb, Cs) であった。これらのうちの 7 元素 (Fe, S, Al, Mg, P, Rb, Cs) は総化学成分量と有意水準 1% で強い相関関係を示した。さらに、検出された元素と温度の計 13 の環境変数を用いて主成分分析を行った結果、第一および第二主成分 (PC1 および PC2) が抽出され、両者で主要環境要因における全変動の 56% を説明した (Fig. 3)。PC1 および PC2 に強く影響を与えていたのは、8 元素 (Fe, S,

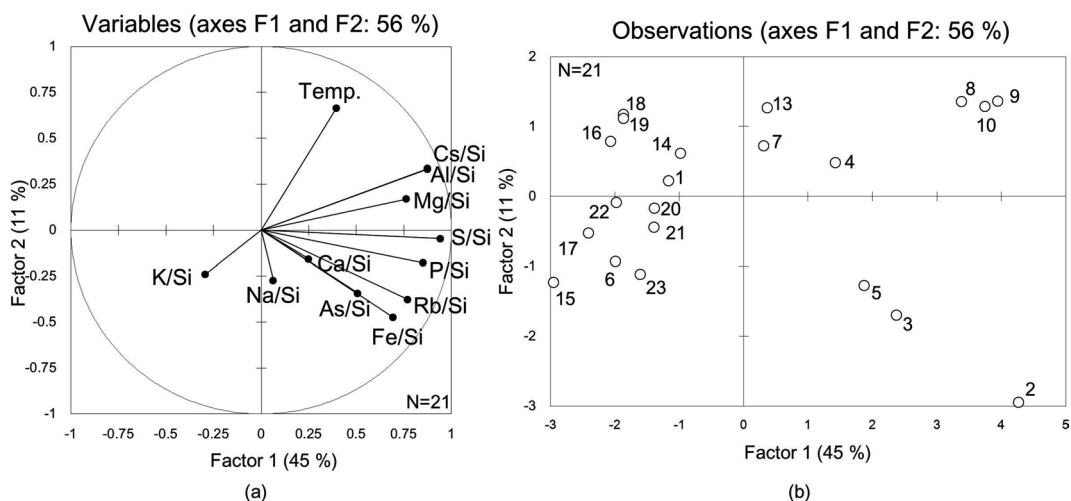


Fig. 3 Principal component analysis showing the environmental variables of the 21 ponds. (a) Factor loadings on principal components 1 and 3. (b) Relationships between the 21 ponds and the principal components. F1 and F3 indicate Factor 1 and Factor 3, respectively. Arabic figures in (b) denote sampling stations.

Table 1 Temperature, pH, and chemical components of water samples from four ponds in the Kirishima geothermal area.

Sample	Temp.	pH	Fe	S	Al	Mg	Si	Ca	P	Na	K	As	Rb	Cs	Total conc.
Pond-A	93	2.6	6.964	20.68	16.07	3.568	1.704	1.367	0.092	N.D.	N.D.	0.014	4.130	3.341	57.93
Pond-B	66	2.0	20.57	21.91	10.67	1.924	1.620	0.271	0.152	N.D.	N.D.	0.015	14.05	2.223	73.41
Pond-C	88	2.4	0.172	1.863	0.540	N.D.	3.700	0.187	0.041	N.D.	N.D.	0.012	0.092	0.118	6.725
Pond-D	67	2.3	0.487	1.930	0.075	1.783	5.285	0.979	0.041	0.367	0.189	0.011	0.288	0.047	11.48

Temperature is expressed in °C. The concentrations of each chemical component are expressed in mmol L<sup>-1</sup>. The detection limits of the elements that were not detected are shown as N.D. Temp. and Total conc. indicate temperature and total concentration of measured chemical components, respectively.

Table 2 Diversity index scores for bacterial and archaeal clone libraries.

Sample	bacteria						archaea					
	$\theta_x$	Shannon	Num. of phylotype	$S_{Chao1}$	Coverage	Num. of clone	$\theta_x$	Shannon	Num. of phylotype	$S_{Chao1}$	Coverage	Num. of clone
Pond-A	88.63	1.38	14	26.3	0.85	95	60.10	0.534	5	6.00	0.95	106
Pond-B	126.4	1.25	11	21.5	0.88	94	105.7	2.058	14	14.2	0.88	112
Pond-C	99.47	1.48	9	10.0	0.90	92	102.9	1.231	6	7.00	0.94	109
Pond-D	113.3	2.04	13	13.3	0.86	91	98.53	1.448	9	9.25	0.91	104

Diversity indices measured were nucleotide diversity ( $\theta_x$ ), Shannon-Wiener index (Shannon), Chao1 nonparametric richness estimator ( $S_{Chao1}$ ), and homologous coverage.

Al, Mg, P, As, Rb, Cs) および温度であった。従って、霧島地熱地域に分布する 21 ヶ所の強酸性高温泉は次に示した通りの 4 種類の化学的特徴を有する温泉群に分類された：PC1 および PC2 が共に相対的に高い温泉群 (Type A)；PC1 が相対的に高く、PC2 が相対的に低い温泉群 (Type B)；PC1 が相対的に低く、PC2 が相対的に高い温泉群 (Type C)；PC1 および PC2 が共に相対的に低い温泉群 (Type D)。

### 3.2 細菌の群集構造解析および生物多様性

4 種類の化学的特徴を有する温泉群から細菌および古細菌の群集構造解析および生物多様性評価のために各々 1 定点ずつ温泉を選択し、Pond-A (=St. 8), Pond-B (=St. 2), Pond-C (=St. 16), Pond-D (=St. 15) とした。これらの温泉は温度および化学成分は大きく異なることが示された (Table 1) (Sato *et al.*, 2013b)。

4 つの温泉由来の計 372 個の細菌クローンは 35 系統群に分類された (Table 2)。これらの系統群は次に示す 10 綱に属していた： $\gamma$ -Proteobacteria,  $\beta$ -Proteobacteria,  $\delta$ -Proteobacteria, Bacilli, Actinobacteria, Flavobacteria, Aquificae, Thermotogae,  $\alpha$ -Proteobacteria, Nitrospirae。各温泉における生物多様性被覆率は 0.85–0.90 を示していたため、十分なクローン数を解析できたと考えられた。また、既知の塩基配列に対する相同性検索を行った結果、全解析クローン数の 23% を占める 16 系統群は、未だ記載されていない新種の未培養細菌であると推定された。本研究では 4 定点の何れの温泉においても  $\gamma$ -Proteobacteria 綱が優占していた (Fig. 4a)。種多様性が最も高かったのは、温度と化学成分が共に相対的に低い Pond-D であり、この温泉では *Acinetobacter junii* に近縁な種が全クローンの 37% を占めていた。Pond-D と同程度の温度ながら化学成分が相対的に高い Pond-B では、遺伝的多様性が最も高く、*Acidithiobacillus caldus* の近縁種および  $\delta$ -Proteobacteria 綱に属する未培養細菌が全クローンの 44% と優占していた。一方、温度が相対的に高い Pond-A と Pond-C では、*Acinetobacter johnsonii* が全クローンの 57% 以上を占めていた。

### 3.3 古細菌の群集構造解析および生物多様性

温度および化学成分が大きく異なる 4 つの温泉由来の計 431 個の古細菌クローンは 26 系統群に分類され (Table 2)、これらは Crenarchaeota 門および Euryarchaeota 門の 2 門に属していた (Sato *et al.*, 2013a)。各温泉における生物多様性被覆率は 0.88–0.95 を示していたため、細菌群集同様、十分

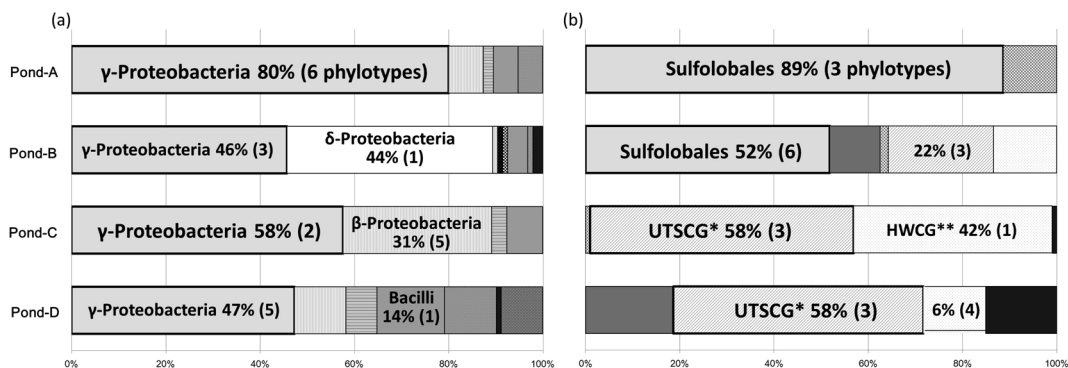


Fig. 4 Prokaryotic phylogenetic distribution in each pond of the Kirishima geothermal area.

(a) Bacterial clonal frequency in the class level. (b) Archaeal clonal frequency in the order level.

\*UTSCG : Uncultured thermoacidic spring clone group, \*\*HWCG...Hot water crenarchaeotic group

なクローン数を解析できたと考えられた。相同性検索の結果、全解析クローン数の 91% を占める 19 系統群が未記載の古細菌であると推定された。4 つの温泉中、古細菌の遺伝的および種多様性が最も高かったのは Pond-B で、この温泉では Sulfolobales 目に属する 6 系統群の古細菌が 52% を占めていた (Fig. 4b)。Pond-D も比較的高い遺伝的および種多様性を示したが、ここで優占していたのは uncultured thermoacidic spring clone group (UTSCG) と呼ばれる未記載の未培養古細菌グループであり、全体の 58% を占めていた。温度が相対的に高い Pond-A と Pond-C における優占種は 2 つの温泉間では大きく異なり、Pond-A では Sulfolobales 目に属する 3 系統群の古細菌が 89% を占めていたのに対し、Pond-C では Crenarchaeota 門の UTSCG および hot water crenarchaeotic group (HWCG) から成る未培養古細菌が全体の 99% を占めていた。

### 3.4 細菌および古細菌群集の生物多様性と主要環境要因との関係性

細菌および古細菌群集の生物多様性指数と主要環境要因との関係性をピアソンの積率相関係数により求めた結果、細菌の遺伝的多様性と温度との間に有意水準 5% で負の強い関係性が認められた (Table 3)。一方、古細菌群集の遺伝的多様性は Ca と強い負の関係性を示していた (Satoh *et al.*, 2013a, 2013b, 2015)。

綱レベルおよび目レベルの分類階級での細菌および古細菌グループと主要環境要因との関係性を正準相関分析によって求めた結果、 $\alpha$ -Proteobacteria 綱、 $\delta$ -Proteobacteria 綱、Nitrospirae 綱に属する細菌グループは Fe および Rb と正の強い関係性を示した。一方、Sulfolobales 目および未培養種のみで構成される UTSCG に属する古細菌は、Al および Mg と強い関係性を示した。霧島地熱地域内には未だ記載されていない細菌および古細菌種が多数存在する可能性があることを前述した。未記載種の中には、培養法による分離が難しい難培養性の種も数多く含まれる。本研究において統計学的手法に基づき、未培養種を含む細菌および古細菌グループと主要環境要因との関係性を明らかにしたことで得られた知見は、今後、培養法に基づく新種の分離を試みる際に役立つことが期待される。

## 4. ま と め

本研究では、鹿児島県霧島地熱地域に分布する 4 定点の高

Table 3 Correlation matrix showing *r* values for Pearson's correlation among factors in the pond waters of the Kirishima geothermal area.

Variables	Temp.	Fe/Si	S/Si	Al/Si	Mg/Si	Ca/Si	P/Si	Na/Si	K/Si	As/Si	Rb/Si	Cs/Si	Total conc./Si
Bacterial $H_k$	<b>-0.95</b>	0.59	0.11	-0.20	-0.28	-0.64	0.40	—	—	0.10	0.62	-0.20	0.24
Bacterial Shannon.	-0.35	-0.68	-0.76	-0.69	-0.52	-0.25	-0.76	—	—	-0.82	-0.67	-0.69	-0.75
Archaeal $H_k$	-0.67	0.13	-0.41	-0.68	-0.79	<b>-0.98</b>	-0.09	—	—	-0.38	0.17	-0.68	-0.29
Archaeal Shannon.	-0.87	0.55	0.04	-0.28	-0.41	-0.76	0.36	0.14	0.14	0.05	0.59	-0.28	0.17

Values in bold are different from 0 with a significance level of  $\alpha=0.05$  ( $r>0.95$ ). Temp., Total conc. and Shannon. denote the temperature, total concentration of measured chemical components and Shannon-Wiener index, respectively. Each chemical component was standardized with respect to silicon (/Si).



温・強酸性泉において、16S rRNA 遺伝子クローン解析法に基づき、細菌および古細菌の群集構造および生物多様性を評価・比較した。4 定点の温泉水は、幅広い温度および化学成分量を示すとともに、主成分分析により温度および化学成分が大きく異なる 4 種類の化学的特徴を有することが示された。4 つの温泉由来の計 803 個の 16S rRNA 遺伝子クローンを解析したところ、61 種の原核生物（細菌 35 種、古細菌 26 種）が検出された。また、生物多様性被覆率より、この環境中に生息する原核生物種の 90% 以上を解析できたことが明らかになった。4 定点何れの温泉においても優占的に検出されたのは、 $\gamma$ -Proteobacteria 綱、 $\beta$ -Proteobacteria 綱、Bacilli 綱に属する細菌グループであった。一方、古細菌に関しては 4 定点の温泉に共通して検出されたグループは認められなかったが、化学成分量が相対的に高い温泉では Sulfolobales 目に属する古細菌が優占していた。化学成分量が相対的に低い温泉では Crenarchaeota 門に属する未記載の古細菌グループが優占しており、棲み分けが見られた。さらに、生物多様性と主要環境要因との関係性を統計的に求めたことにより、細菌の種多様性と温度、古細菌の遺伝的多様性と Ca の間に有意な負の関係性が認められた。また、細菌および古細菌の特定のグループといくつかの化学成分との間にも強い関連性が示された。本研究で明らかとされた知見は、火山性の高温・強酸性温泉という隔離された単純な生態系の生物と環境要因との関係性を理解する上での一助となるであろう。

## 謝 辞

本論文を執筆・投稿する機会を与えて頂きました日本温泉科学会ならびに編集委員会委員長である香川大学 佐々木信行教授に感謝申し上げます。また、本研究を遂行するにあたり、終始ご指導ご鞭撻を賜りました創価大学理工学部 黒沢則夫教授に心より感謝申し上げます。また、論文の作成および試料の採取にあたり適切なご助言を頂きました同大学 山本修一教授、山本英夫教授、渡邊啓子博士研究員に厚く御礼申し上げます。

## 引用文献

- Cox, A., Shock, E.L. and Havig, J.R. (2011) : The transition to microbial photosynthesis in hot spring ecosystems. *Chem. Geol.*, 280, 344-351.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Dunlap, P.V. and Clark, D.P. (2008) : *Brock Biology of Microorganisms*. Pearson Education, Inc., Pearson Benjamin Cummings, 1301 Sansome Street, San Francisco, CA 94111.
- Satoh, T., Watanabe, K., Yamamoto, H., Yamamoto, S. and Kurosawa, N. (2013a) : Archaeal community structures in the solfataric acidic hot springs with different temperatures and elemental compositions. *Archaea*, **2013-723871**, 1-11.
- Satoh, T., Watanabe, K., Yamamoto, H., Yamamoto, S. and Kurosawa, N. (2013b) : Bacterial community structures in the solfataric acidic ponds in the Kirishima geothermal area, Kagoshima Prefecture. *J. Hot Spring Sci.*, **63**, 100-117.
- Satoh, T., Yamamoto, S. and Kurosawa, N. (2015) : Chemical Characteristics of Solfataric-Acidic Pond Waters in the Kirishima Geothermal Area, Kagoshima Prefecture. *J. Hot Spring Sci.*, **65**, 88-103.

(本論文は、Satoh, T., Watanabe, K., Yamamoto, H., Yamamoto, S. and Kurosawa, N. (2013a) : Archaeal community structures in the solfataric acidic hot springs with different temperatures and elemental compositions. *Archaea*, **2013-723871**, 1-11. Satoh, T., Watanabe, K.,

Yamamoto, H., Yamamoto, S. and Kurosawa, N. (2013b) : Bacterial community structures in the solfataric acidic ponds in the Kirishima geothermal area, Kagoshima Prefecture. *J. Hot Spring Sci.*, **63**, 100-117. Satoh, T., Yamamoto, S. and Kurosawa, N. (2015) : Chemical Characteristics of Solfataric-Acidic Pond Waters in the Kirishima Geothermal Area, Kagoshima Prefecture. *J. Hot Spring Sci.*, **65**, 88-103. において報告されているものに加筆および修正を加えたものである。2015年9月11日, 日本温泉科学会第68回大会にて発表).