



原 著

草津温泉湯畑に生息する微生物の集積培養と 新規好酸性細菌の分離

梶原鈴加¹⁾, 黒沢則夫^{1)2)*}

(平成30年10月14日受付, 平成31年1月7日受理)

Enrichment Culture of Microorganisms and Isolation of Novel Acidophilic Bacterium from Yubatake, Kusatsu Hot Springs

Suzuka KAJIWARA¹⁾ and Norio KUROSAWA^{1)2)*}

Abstract

In order to reveal the biodiversity of acidic and thermophilic microorganisms habiting in Yubatake, Kusatsu Hot Springs, where the water temperature is 50-55°C and pH is around 2.0, the spring water was applied to enrichment cultivation and identification of microorganisms. In the series of enrichment cultures, total five species belonging to the class *alpha-Proteobacteria*, *Actinobacteria* and *Bacilli* were detected. Based on the 16S rRNA gene sequence similarities, three species of them were assumed to be novel bacteria. One of three novel bacteria, which showed highest novelty, was successfully isolated by single colony isolation method and was named strain KY-1. Morphological properties and molecular phylogenetic analysis of strain KY-1 indicated that this strain belongs to a novel genus of the family *Alicyclobacillaceae*. These results suggested that the spring water and sediments of Kusatsu Hot Springs are valuable resources of novel microorganisms.

Key words : Kusatsu Hot Springs, Yubatake, Enrichment Culture, Acidophilic Bacterium, *Alicyclobacillaceae*

要 旨

草津温泉の中心部に位置する湯畑に湧出する温泉は、泉温が50～55°C、pHが2程度の酸性・

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, Hatiouji, Tokyo 192-8577, Japan.

²⁾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. ²⁾Research Center for Natural Environment, Soka University, 1-236 Tangi-machi, Hatiouji, Tokyo 192-8577, Japan. *Corresponding author : E-mail kurosawa@soka.ac.jp, TEL & FAX : 042-691-8175.

含硫黄—アルミニウム—硫酸塩・塩化物温泉である。このような温泉には、一般に好酸性の中等度好熱細菌が生息している。本研究では、草津温泉湯畑に生息する好酸性菌や好熱菌に関する詳しい知見を得ることを目的として、ENFE 法による微生物の集積培養と種レベルでの同定ならびに新種細菌の分離を行った。草津温泉湯畑上流の 2 カ所から温泉水を採取し、温度 (50°C, 65°C, 80°C), pH (1.5, 2.0, 3.0), 栄養条件 (独立, 従属栄養) を組み合わせた計 36 条件で集積培養を行った。微生物の増殖が認められた 3 条件の集積培養液について、16S rRNA 遺伝子クローン解析法により微生物群集構造を調べた結果、合計 5 種の細菌が検出された。これらのうち 2 種は記載種と同定されたが、3 種は記載種との 16S rRNA 遺伝子の部分塩基配列の相同性がいずれも 98.6% 以下であったことから新種細菌であると推定された。この 3 種の中で最も新規性が高かった種を、シングルコロニーアイソレーション法により単離し KY-1 株と名付けた。16S rRNA 遺伝子のほぼ全長の塩基配列を用いた進化系統解析の結果、KY-1 株は *Alicyclobacillaceae* 科の新属新種であることが示唆された。西の河原を含め、草津温泉にはまだ多くの新規な好酸性菌が生息していると推定され、それらは温泉微生物の分類学的研究における貴重なリソースであると考えられる。

キーワード：草津温泉，湯畑，集積培養，好酸性細菌，*Alicyclobacillaceae* 科

1. 序 論

陸上温泉には軟体動物の貝類やユスリカ、オンセンアブなどの昆虫類が分布することが知られているが、それらは比較的低い温度の温泉に限られ、高温の温泉ではほとんど微生物しか生息できない (長島, 2005)。加えて、陸上温泉は温泉以外にも強酸性、強塩基性、また重金属類や硫化水素などのガス成分を含むなど性質が多様で、蘚苔類、地衣類、珪藻類、紅藻類などの真核生物、シアノバクテリア、化学合成細菌、ならびにアーキアなどの様々な微生物が生息している (井上ら, 2009; 杉森, 2010)。そのため、これまで様々な温泉から好熱性の微生物が分離・記載されている。群馬県の草津温泉は日本を代表する酸性温泉のひとつで、群馬県の草津白根山麓の標高 1,200 m に位置する (井上ら, 2009)。草津温泉の源泉は温泉街の中心に位置する湯畑をはじめ、西の河原、万代鉾、煮川、白旗、地蔵などがある。いずれも比較的泉温が高く、酸性で、硫黄・アルミニウム・硫酸塩・塩化物を含む温泉である (長島, 2008)。一般にこのような高温かつ酸性の環境には、好酸性かつ好熱性の微生物が生育しているが、実際に西の河原からは、好熱性細菌の *Thiobacillus intermedius* (杉森ら, 1984) の他、*Bacillus* 属の好酸性細菌 (高柳ら, 1986) の分離報告がある。なお、*Thiobacillus intermedius* は、再分類により現在は *Thiomonas intermedia* と改名されている (Moreira and Amils, 1997)。また、草津温泉より上部に位置する白根山の湯釜周辺には、*Acidithiobacillus ferrooxidans* (Takano *et al.*, 1997) が、湯釜には *Acidithiobacillus thiooxidans* (杉森, 2010) が生育しているという報告がある。意外なことに、草津温泉の中心部に位置する湯畑からは、好熱性細菌や好酸性細菌が分離されたという報告が無く、いったいどのような細菌が生育しているのか興味を持たれた。本研究では、草津温泉の湯畑から採取した試料を用いて、さまざまな条件で微生物の集積培養を行い、ENFE 法 (Sakai and Kurosawa, 2016) による新規好酸性菌の探索と分離を試みた。

2. 材料と方法

2.1 試料

2016 年 4 月 15 日に、群馬県吾妻郡草津町の湯畑内南側の湧水場所の 2 か所 (温泉 A, B) から、表層の沈殿物または砂礫を含む温泉水を採取した (Fig. 2)。温度は現場で測定し、pH は室温 25°C で pH 計 MP225 pH Meter, METTLER TOLEDO を用いて測定した。温泉 A の泉温は 51°C, pH

は 1.9 で、温泉 B の泉温は 54℃、pH は 1.8 であった。温泉 A から採取した試料は、採取場所の湯の花様の沈殿物により薄黄色に白濁しており、硫化水素臭があった。温泉 B から採取した試料は無色透明で、硫化水素臭はほとんど無かった。これらの試料は保温などの温度コントロール無しに実験室に持ち帰り、以後の実験に用いた。

2.2 集積培養

従属栄養培養条件として 0.1% Yeast Extract を、独立栄養培養条件として 0.25% NaHCO₃ をそれぞれ加えた MBS 培地 (Kurosawa *et al.*, 1998) を作製した。いずれの培地も、50% 硫酸で pH 1.5, 2.0, 3.0 に調整したものを用意した (計 6 種類)。これらの培地 10 mL に、温泉 A と B から採取した試料 0.1 mL を植菌し、50℃、65℃、80℃ 下、好氣的条件で静置集積培養を行った (計 36 系列)。微生物の増殖が確認された培養液 0.1 mL を新しい培地に植え継いだ。この系代培養を、最初の培養を 1 代目として 5 代目まで行い集積培養液を得た。ENFE 法 (Exploring Novel microorganisms in Frozen Enrichment cultures strategy) は、微生物の増殖が見られた全ての集積培養液を一旦凍結保存し、16S rRNA 遺伝子クローン解析法を用いて各集積培養液の微生物群集構造を明らかにした後、新規微生物が検出された凍結集積培養液からのみ分離培養を試みる効率的な手法である (Sakai and Kurosawa, 2016)。ENFE 法に用いるため、集積培養液は 2 つに分けて一方を分離培養用、他方を微生物群集構造解析用とした。分離培養用には、集積培養液 0.8 mL を 1.5 mL 遠沈管にとり、50% グリセロール 0.2 mL を加え -80℃ で保存した。微生物群集構造解析用には、集積培養液 1.0 mL を 1.5 mL 遠沈管にとり、遠心分離 (21,880 g, 25℃, 5 分) した後、上澄み液を除いた湿菌体を -25℃ で保存した。

2.3 集積培養液中の微生物群集構造解析 (16S rRNA 遺伝子クローン解析法)

微生物群集構造解析用として保存した湿菌体を TE バッファー (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) 100 μL に再懸濁し、市販の DNA 抽出キット (Extrap Soil DNA Kit Plus ver. 2, 日鉄住金環境株式会社製) を用いて全 DNA を抽出した。この DNA を鋳型として、PCR 法によりバクテリアおよびアーキアの 16S rRNA 遺伝子のほぼ全長を増幅した。PCR プライマーとして、バクテリアの 16S rRNA 遺伝子の増幅には B27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) と U1492R (5'-GGYTACCTTGTTACGACTT) を、アーキアの 16S rRNA 遺伝子の増幅には A21F (5'-TTCCGGTTGATCCYGCCGGA) と U1492R (5'-GGYTACCTTGTTACGACTT) を用いた。PCR サイクリングは、アーキアの 16S rRNA 遺伝子の場合 94℃ ; 30 秒, 55℃ ; 30 秒, 72℃ ; 1 分 40 秒を 30 サイクル、バクテリアの場合 94℃ ; 30 秒, 60℃ ; 30 秒, 72℃ ; 1 分 40 秒を 30 サイクルとした。いずれの場合も、最初に初期変性 (94℃, 3 分) を、最後に最終伸長 (72℃, 5 分) を付した。得られた PCR 産物を、市販の DNA 精製キット (NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Kit, タカラバイオ株式会社製) 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。これを用いて、Sakai and Kurosawa (2016) に従い各集積培養液中の微生物群集構造解析を行った。

2.4 新種細菌の純粋培養

新種細菌が検出された集積培養液と同じ成分および pH の固形培地 (プレート) を作製した。固化剤としてゲランガム (0.66%) を用いた。このプレートに、集積培養液の 10 倍希釈系列試料 0.1 mL を塗抹し、集積培養時と同じ温度で培養した。プレート上に出現したシングルコロニーを、新しいプレートに再度画線法により植菌した (シングルコロニーアイソレーション法)。シングルコロニーアイソレーションを計 3 回繰り返すことにより純粋培養株を得た。

2.5 進化系統解析

純粋培養液 100 μ L を遠心分離 (21,880 g, 25 $^{\circ}$ C, 5 分) し、沈殿した湿菌体を TE 100 μ L に再懸濁した。この懸濁液 1 μ L を鋳型として、前述の PCR 条件を用いて 16S rRNA 遺伝子を増幅した。この PCR 産物を鋳型として、シークエンスプライマー B27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG), B515R (5'-TTACCGCGGCTGCTGGCAC), U907F (5'-AAACTCAAAGKAATTGACGG), U1492R (5'-GGYTACCTTGTTACGACTT) を用いてサンガー法により塩基配列を決定し、得られた配列データを連結することにより 16S rRNA 遺伝子ほぼ全長の塩基配列を明らかにした。この塩基配列と *Alicyclobacillaceae* 科 4 属の代表種の 16S rRNA 遺伝子の塩基配列データを用いて、MEGA7 ソフトウェア (Tamura *et al.*, 2011) 上で近隣接合法 (Saitou and Nei, 1987) により進化系統樹を作成した。

3. 結果および考察

3.1 集積培養

草津温泉湯畑の 2 カ所 (A, B) の温泉試料を用いて、培地成分 2 種類、pH は 3 点、培養温度 3 点の計 36 系列で微生物の集積培養を行った (Fig. 1, Fig. 2)。その結果、温泉 A 由来の試料では、培養温度 50 $^{\circ}$ C、pH 2.0 の独立栄養条件 (A50-2-A) と pH 3.0 の従属栄養条件 (A50-3-H) の 2 系列で微生物の増殖が認められた。温泉 B 由来の試料では、培養温度 50 $^{\circ}$ C、pH 2.0 の独立栄養条件 (B50-2-A) のみで微生物の増殖が確認された。培養温度が 65 $^{\circ}$ C と 80 $^{\circ}$ C の場合は、いずれの条件においても微生物の増殖は確認されなかった。これらの結果から、草津温泉湯畑においては、従属栄養微生物と独立栄養微生物のいずれも生育しているが、それらの生育上限温度は 65 $^{\circ}$ C 未満であり、生育下限 pH は 1.5 よりも大きいことが推定された。

3.2 集積培養液中の微生物種組成

微生物の増殖が確認された 3 つの集積培養系列 A50-2-A, A50-3-H, B50-2-A について、16S rRNA 遺伝子クローン解析法による群集構造解析を行った結果を Table 1 に示す。検出された微生物は全てバクテリアであり、アーキアは検出されなかった。集積培養系列 A50-2-A 由来の 27 クローンは 5 種に分類された。このうち最も高頻度で検出されたクローン 1D は、好酸性中等度好熱性細菌の *α -Proteobacteria* 綱に属する *Acidicaldus organivorans* の 16S rRNA 遺伝子の塩基配列と最も高い相同性を示したが、その値は 97.8% で、別種の閾値とされる 98.6% (Kim *et al.*, 2014) を下回ったことから *Acidicaldus* 属の新種細菌に由来すると推定された。次に高頻度で検出されたクローン 1B は、*Actinobacteria* 綱に属する *Acidimicrobium ferrooxidans* の 16S rRNA 遺伝子であると推定された。*Acidimicrobium ferrooxidans* は、アイスランドの酸性温泉から最初に分離された好酸性細菌である。クローン 1C は、*Acidithiobacillia* 綱に属する *Acidithiobacillus caldus* の 16S rRNA 遺伝子であると推定された。*Acidithiobacillus caldus* は、イギリスの炭鉱から最初に分離された好酸性細菌であり、Kelly and Wood (2000) により再分類されるまでは、*Thiobacillus caldus* と呼ばれていた。これらのクローン 1B および 1C は、温泉 B の集積培養系列 B50-2-A から検出された。クローン 2D は、クローン 1C と同じく *Acidithiobacillus caldus* の 16S rRNA 遺伝子と最も高い相同性を示したが、その値は 96.6% であったことから、*Acidithiobacillus* 属の新種細菌に由来すると推定された。一方、本群集構造解析において最も特筆すべき結果は、温泉 A 由来のクローン 1A および 5A の帰属である。両クローンの塩基配列は 100% 一致しており同一の種に由来すると考えられたが、最大でも *Alicyclobacillaceae* 科の種と 90% 程度の相同性を示すにとどまったことから、

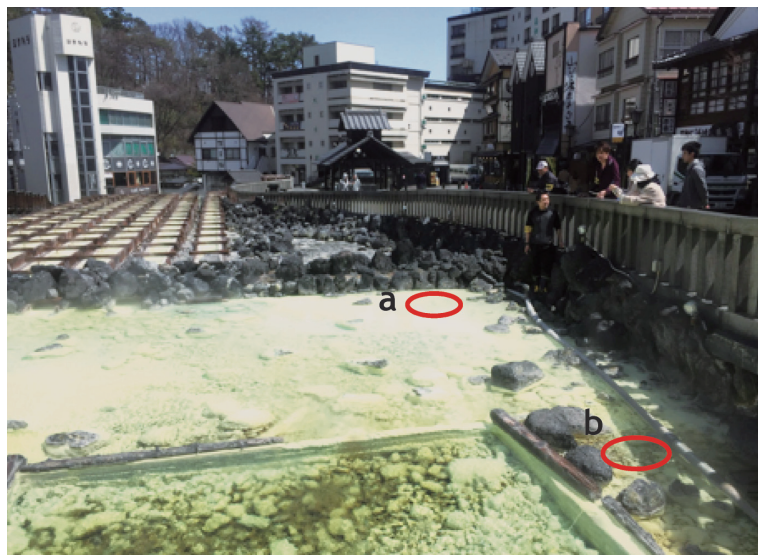


Fig. 1 Sampling points in Yubatake, Kusatsu Hot Springs. a) Hot spring A, b) Hot spring B.

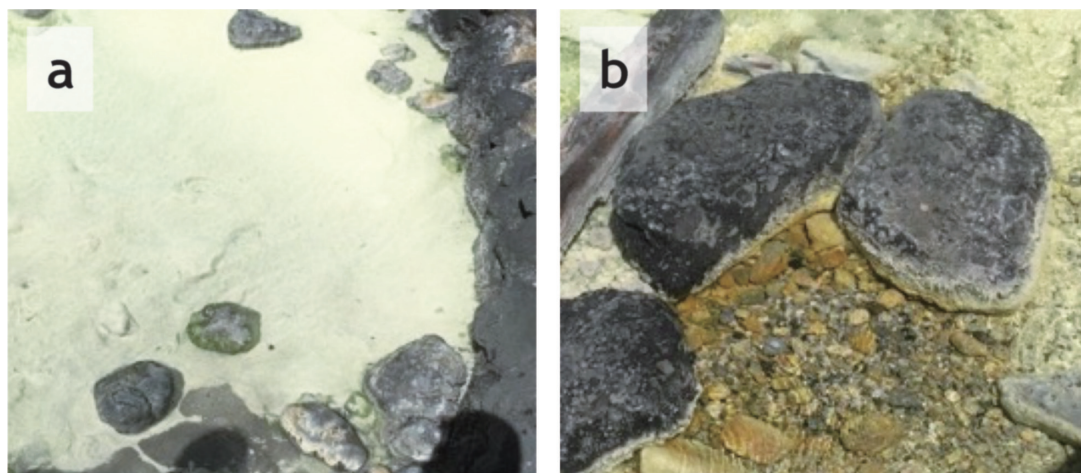


Fig. 2 Sampling points in Yubatake, Kusatsu Hot Springs. a) Hot spring A, b) Hot spring B.

Bacilli 綱 *Bacillales* 目 *Alicyclobacillaceae* 科の新属細菌に由来すると推定された。

一方、先行研究において西の河原で発見された *Thiobacillus intermedia* (杉森ら, 1984) は現在 *Thiomonas* 属に再分類されているが (Moreira and Amils, 1997), 今回の研究では検出されなかった。同じく西の河原から高柳ら (1986) が分離した *Bacillus* 属は、分離株 15 株のうち 12 株が種レベルで同定されていない *Bacillus* sp. であり、残り 3 株は *Bacillus sphaericus*, *Bacillus circulans*, *Bacillus cereus* であると同定されている。なお *Bacillus sphaericus* は現在 *Lysinibacillus sphaericus* に再分類されている (Ahmed *et al.*, 2007)。これらの 3 種はいずれも湯畑からは検出されず、生育 pH が中性であるという点でも本研究で検出された 5 種とは異なっていた。しかしながら、種レベルま

Table 1 Identified bacterial species in the enrichment cultures

Enrichment culture	Name of representative clone	Closest species	16S rRNA gene similarity (%)	Number of clones
A50-2-A	1D	<i>Acidicaldus organivorans</i>	97.8	12
	1B (=3C)	<i>Acidimicrobium ferrooxidans</i>	99.9	8
	1C (=3A)	<i>Acidithiobacillus caldus</i>	98.7	4
	1A (=5A)	<i>Alicyclobacillus pomorum</i>	90.1	2
	2D	<i>Acidithiobacillus caldus</i>	96.6	1
A50-3-H	5A (=1A)	<i>Alicyclobacillus pomorum</i>	90.1	15
B50-2-A	3A (=1C)	<i>Acidithiobacillus caldus</i>	98.7	8
	3C (=1B)	<i>Acidimicrobium ferrooxidans</i>	99.6	6

A50-2-A : Hot spring A, 50°C, pH 2.0, autotrophic ; A50-3-H : Hot spring A, 50°C, pH 3.0, heterotrophic ; B50-2-A : Hot spring B, 50°C, pH 2.0, autotrophic.

では同定されていない *Bacillus* sp. 12 株については、今回検出された *Acidithiobacillus caldus* と、細胞の大きさや形状、好酸性好熱性のグラム陰性菌であること、内生孢子を形成すること、運動性および鞭毛を有すること、偏性好気性であることなど多くの特徴が一致していた。したがって高柳ら (1986) が西の河原から分離した *Bacillus* sp. は *A. caldus* である可能性がある。

以上の結果から、草津温泉湯畑の試料を用いた集積培養液中には少なくとも 5 種の細菌が存在し、そのうち 3 種はそれぞれ *Acidicaldus* 属の新種、*Acidithiobacillus* 属の新種、そして *Alicyclobacillaceae* 科の新属新種の細菌であると推定された。また興味深いことに、今回検出された 5 種の細菌のうち、温泉 B の集積培養液に見いだされた細菌は 2 種類とも温泉 A の集積培養液中にも存在したが、その他の 3 種は温泉 A の集積培養液のみから検出された。2 つの温泉の温度や pH はほぼ同じであることから、堆積物の形態および硫化水素濃度のいずれかまたは両方が、そこに生育する細菌の多様性に影響を与えていると考えられた。

3.3 純粋培養および純粋培養株の進化系統学的解析

シングルコロニーアイソレーション法により、*Alicyclobacillaceae* 科の新属新種であると推定された細菌の分離を試みた結果、クローン 1A および 5A と 100% 一致する塩基配列を持つ株の分離に成功し、KY-1 株と名付けた。KY-1 株のコロニーは白色で光沢があり、比較的平らで直径は約 3mm であった。*Alicyclobacillaceae* 科には現在 4 つの属、*Alicyclobacillus* 属、*Tumebacillus* 属、

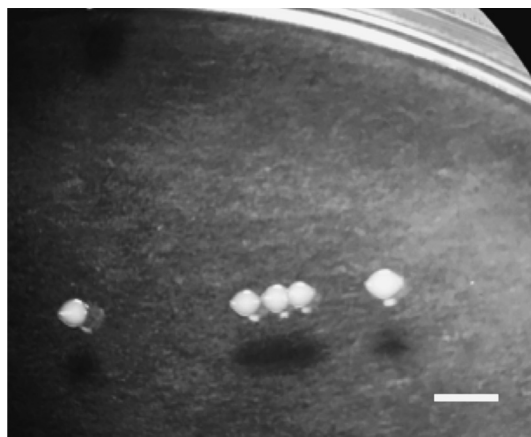


Fig. 3 Colonies of strain KY-1. Bar : 5 mm

Effusibacillus 属, *Kyrpidia* 属が存在し, それらはすべて好酸性中温菌または好酸性中等度好熱菌である. 細胞は桿状で, 末端に内生孢子を形成する. ほとんどが偏性好気性の従属栄養細菌である (Costa and Rainey, 2010; Klenk *et al.*, 2011). Figure 4 は KY-1 株の位相差顕微鏡写真である. 短径 0.2 μm , 長径 5~8 μm の桿菌で, 末端に内生孢子を持つ細胞も観察された. これらは *Alicyclobacillaceae* 科の一般的特徴とよく一致する. 進化系統学的位置づけを明確にするために, KY-1 株の 16S rRNA 遺伝子のほぼ全長の塩基配列を決定し記載種の塩基配列と比較した結果, *Alicyclobacillaceae* 科に属する好酸性細菌の 16S rRNA 遺伝子と 86.6~90.1% の相同性を示した. これらの遺伝子情報に基づいて作製した進化系統樹上でも KY-1 株は *Alicyclobacillaceae* 科内に位置づけられた (Fig. 5). この系統樹上で, KY-1 株は *Alicyclobacillus* 属細菌と最初にクラスタリングするが, 進化距離が近い記載種は一つも存在せず, 属レベルで独立した系統を示した. 以上の形態学的ならびに進化系統学的解析結果から, KY-1 株は *Alicyclobacillaceae* 科の新属新種の細菌とするのが妥当であると結論付けた.

4. ま と め

草津温泉湯畑の 2 カ所から採取した試料を用いて, 複数の条件で集積培養を行った結果, 計 5 種の細菌の生育が確認された. これら 5 種は, 16S rRNA 遺伝子に基づき,

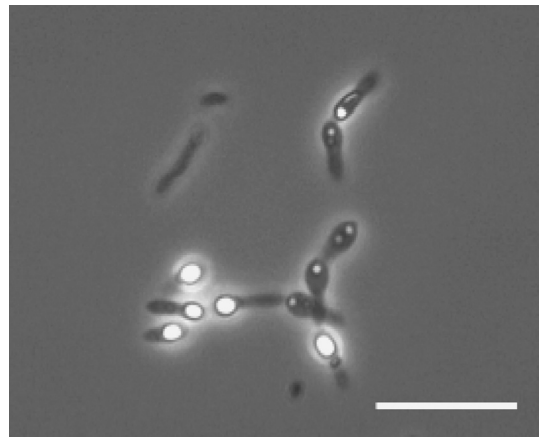


Fig. 4 Phase-contrast micrograph of vegetative cells and spores of strain KY-1. Bar : 10 μm .

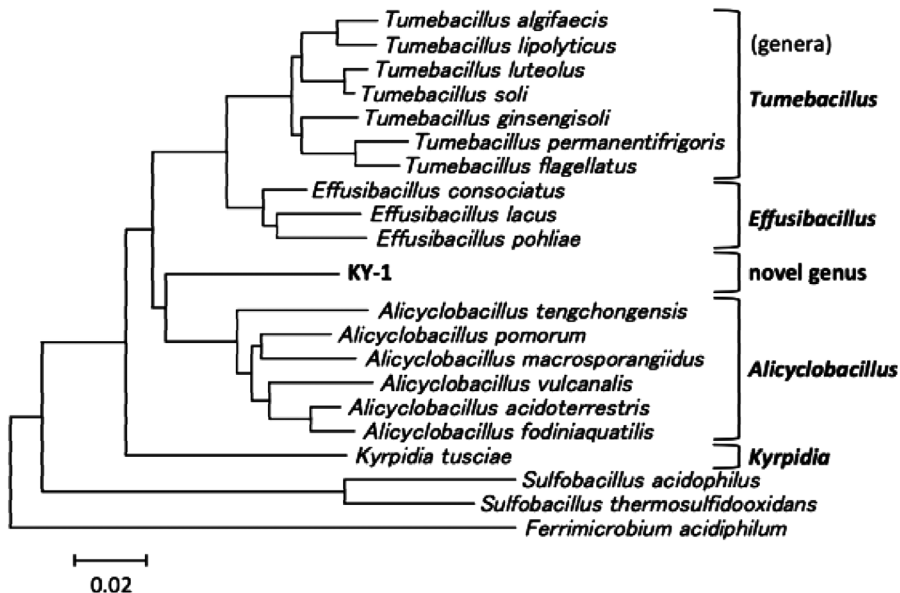


Fig. 5 Phylogenetic tree of strain KY-1 representative species of family *Alicyclobacillaceae* based on the 16S rRNA gene sequences.

Proteobacteria 門, *Actinobacteria* 門, *Firmicutes* 門の 3 門および, α -*Proteobacteria* 綱, *Acidithiobacillia* 綱, *Acidimicrobiia* 綱, *Bacilli* 綱の 4 綱に分類されたことから, 草津温泉湯畑には分類学的に多様な細菌が生息している事が確認された。またこれら 5 種のうち 3 種は新種であり, そのうち 1 種は *Alicyclobacillaceae* 科の新属新種であると推定された。この細菌については, 集積培養液からの単離にも成功し KY-1 株と名付けた。詳細な進化系統学的解析の結果も, KY-1 株が *Alicyclobacillaceae* 科の新属新種であることを支持したことから, 今後は本株の生理学, 生化学, 化学分類学的解析を行い, それらの結果に基づき適切な学名を与え, 正式に記載したい。

謝 辞

試料採取を快くお認めいただいた群馬県吾妻郡草津町役場温泉課の中澤好一課長, ならびにわれわれの試料採取作業に終始付き添いサポートしてくださった同課の小寺利典氏に深く感謝いたします。

引用文献

- Ahmed, I., Yokota, A., Yamazoe, A., and Fujiwara, T. (2007) : Proposal of *Lysinibacillus boronitolerans* gen. nov., sp. nov., and transfer of *Bacillus fusiformis* to *Lysinibacillus fusiformis* comb. nov. and *Bacillus sphaericus* to *Lysinibacillus sphaericus* comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **57**, 1117-1125.
- Costa, da, M.S. and Rainey, F.A. (2010) : Family II. Alicyclobacillaceae fam. nov., *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (eds. De Vos, P., Garrity, G., Jones, D., Krieg, N.R., Ludwig, W., Rainey, F.A., Schleifer, K.H. and Whitman, W.B.), Second Edition, Volume 3, pp. 229-243., Springer, Dordrecht.
- 井上源喜, 佐藤隆行, 長島秀行, 杉森賢司, 竹村哲雄 (2009) : 熱水環境中の有機成分の環境地球化学的特徴と起源に関する研究—1. 草津温泉源泉堆積物および温泉津温泉源泉沈殿物—. *温泉科学*, **58**, 217-240.
- Kelly DP and Wood AP. (2000) : Reclassification of some species of *Thiobacillus* to the newly designated genera *Acidithiobacillus* gen. nov., *Halothiobacillus* gen. nov. and *Thermithiobacillus* gen. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **50**, 511-516.
- Kim, M., Oh, H.S., Park, S.C., Chun, J. (2014) : Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **64**, 346-351.
- Klenk, H.P., Lapidus, A., Chertkov, O., Copeland, A., Del Rio, T.G., Nolan, M., Lucas, S., Chen, F., Tice, H. and other authors (2011) : Complete genome sequence of the thermophilic, hydrogen-oxidizing *Bacillus tusciae* type strain (T2) and reclassification in the new genus, *Kyrpidia* gen. nov. as *Kyrpidia tusciae* comb. nov. and emendation of the family *Alicyclobacillaceae* da Costa and Rainey, 2010. *Stand Genomic Sci.*, **5**, 121-134.
- Kurosawa, N., Itoh, Y.H., Iwai, T., Sugai, A., Uda, I., Kimura, N., Horiuchi, T. & 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.
- Moreira, D. and Amils, R. (1997) : Phylogeny of *Thiobacillus cuprinus* and Other Mixotrophic Thiobacilli : Proposal for *Thiomonas* gen. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **147**, 522-528.
- 長島秀行 (2005) : 温泉に生きる微生物, ウェブサイト・NPO 法人健康と温泉フォーラム。

- 長島秀行 (2008) : 草津温泉の微生物, 草津温泉—温泉を科学する—, p. 71-87. 上毛新聞社, 前橋市.
- Sakai, H.D., Kurosawa, N. (2016) : Exploration and isolation of novel thermophiles in frozen enrichment cultures derived from a terrestrial acidic hot spring. *Extremophiles*, **20**, 207-214.
- Saitou, N., Nei, M. (1987) : The neighbor-joining method : a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.*, **4**, 406-425.
- 杉森賢司, 高柳進之輔, 千頭道子, 相川嘉正 (1984) : 硫黄泉に生息する *Thiobacillus* の簡便な分離・同定. 東邦大学教養紀要, **16**, 49-63.
- 杉森賢司 (2010) : 温泉・熱水・噴気と生命. 温泉科学, **60**, 177-194.
- Takano, B., Koshida, M., Fujiwara, Y., Sugimori, K. and Takayanagi, S. (1997) : Influence of sulfur-oxidizing bacteria on the budget of sulfate in Yugama crater lake. Kusatsu-Shirane volcano, Japan. *Biogeochemistry*, **38**, 227-253.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. & Kumar, S. (2011) : MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.*, **28**, 2731-2739.
- 高柳進之輔, 杉森賢司, 千頭道子 (1986) : 酸性泉に生息する微生物の同定と分布. 東邦大学教養紀要, **18**, 33-43.