

Tofua Arc의 열수구환경으로부터 호열성 혐기성 고세균(*Thermococcus*)의 농화배양 및 동정

차인태¹ · 김소정¹ · 김종걸¹ · 박수제¹ · 정만영¹ · 주세종² · 권개경³ · 이성근^{1*}

¹충북대학교 미생물학과, ²한국해양연구원 심해해저자원연구부, ³한국해양연구원 해양바이오연구센터

Identification of Anaerobic Thermophilic *Thermococcus* Dominant in Enrichment Cultures from a Hydrothermal Vent Sediment of Tofua Arc

In-Tae Cha¹, Soo-Je Park¹, Jong-Geol Kim¹, Man-Young Jung¹, So-Jeong Kim¹, Se-Jong Ju²,
Kae Kyoung Kwon³, and Sung-Keun Rhee^{1*}

¹Department of Microbiology, Chungbuk National University, Chungbuk 361-763, Republic of Korea

²Marine Biotechnology Research Center, KORDI, Ansan 425-600, Republic of Korea

³Deep-sea and Marine Georesources Research Department, KORDI, Ansan 425-600, Republic of Korea

(Received November 7, 2011 / Accepted February 29, 2012)

Hydrothermal vents (HTV) provide special environments for evolution of lives independent on solar energy. HTV samples were gained from Tofua arc trench in Tonga, South Pacific. We investigated archaeal diversity enriched using combinations of various electron donors (yeast extract and H₂) and electron acceptors [Iron (III), elemental sulfur (S⁰) and nitrate]. PCR amplification was performed to detect archaeal 16S rRNA genes after the cultures were incubated 65°C and 80°C for 2 weeks. The cultures showing archaeal growth were transferred using the dilution-to-extinction method. 16S rRNA gene PCR-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis was used to identify the enriched *archaea* in the highest dilutions where archaeal growth was observed. Most of cultured archaea belonged to genus of *Thermococcus* (*T. alcaliphilius*, *T. litoralis*, *T. celer*, *T. barossii*, *T. thoreducens*, *T. coalescens*) with 98–99% 16S rRNA gene similarities. Interestingly, archaeal growth was observed in the cultures with Iron (III) and nitrate as an electron acceptor. It was supposed that archaea might use the elemental sulfur generated from oxidation of the reducing agent, sulfide. To cultivate diverse *archaea* excluding *Thermococcus*, it would be required to use other reducing agents instead of sulfide.

Keywords: *Thermococcus*, anaerobic archaea, enrichment culture, extinction dilution culture, hydrothermal vent

열수구는 빛이 없는 환경에서 생명체의 진화가 일어나고 있는 독특한 생태계로서 깊은 바다의 지진대와 화산대를 따라서 주기적으로 발달하거나 혹은 사라진다. 깊은 바다의 높은 수압으로 인하여 열수구로부터 뿜어져 나오는 열수의 온도는 약 300°C 정도이며(Stetter, 1992, 1996) 열수구에서 뿜어져 나오는 것은 열수뿐 아니라 다량의 다양한 무기물을 함유한다. 철, 망간, 마그네슘, 황 등의 환원된 무기물이 열수와 함께 분출되고, 갑작스런 낮은 온도의 바닷물과 만나 열수구 주변으로 침전된다.

열수구는 고온이라는 매우 극한 환경을 이루기 때문에 이러한 환경에 적응해 살아가는 미생물이 많이 존재하는 것으로 보고되었다(Zillig *et al.*, 1990; Huber and Stetter, 1992; Hoki *et*

al., 1993; Stetter, 1996). 열수구로부터 열수가 뿜어져 나오는 ‘굴뚝’을 chimney라고 하는데, chimney 주변으로 생태계가 형성된다. 열수가 나오는 바로 근처의 해수 온도는 약 80°C 이상을 유지하고 있으며, 이 온도에서 극한 미생물들의 물질대사가 활발하게 일어나고 있는 것으로 보고되고 있다(Stetter, 1996). 열수구 주변의 미생물들 중에는 chimney로부터 나온 무기물을 산화 시키거나 혹은 환원시키면서 에너지를 얻어, 생태계의 1차 생산자로 역할을 한다. 광합성 대신 화학합성(chemolithotrophy)을 통하여 유기물을 합성하면 그것을 먹는 소비자가 군집을 이루어 매우 독특한 생태계를 구성하게 된다. 이러한 기능을 하는 극한 미생물 중 대표적인 것으로 고온성 고세균을 들 수 있다.

고온성 고세균 중에는 다양한 전자수용체를 이용하면 혐기성 환경에서 적응하며 살아가고 있다. 황을 환원시키는 *Thermoproteus*, *Desulfurococcus*, *Thermofilum*, *Pyrococcus*, *Acidianus*, *Pyrodictium*,

*For correspondence. E-mail: rhees@chungbuk.ac.kr; Tel.: +82-43-261-2300; Fax: +82-43-264-9600

Table 1. Summary of results of archaeal enrichment cultures. Sequence names in the parenthesis of “P” of PCR detection row indicates the sequences obtained after repeated dilution-to-extinction cultures.

Culture ID	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	
ED	H ₂		YE		H ₂		YE		H ₂		YE		H ₂		YE		H ₂		YE		H ₂		YE		
EA	S ⁰								Nitrate								Iron(III)								
Temp (°C)	65				80				65				80				65				80				
pH	4	7	4	7	4	7	4	7	4	7	4	7	4	7	4	7	4	7	4	7	4	7	4	7	
PCR detection	N	N	P (3a, 3b)	P (4a, 4b, 4c)	N	N	N	P (8a)	N	N	P (11a)	P (12, 12b)	N	N	N	P (16a)	N	N	N	N	N	N	F	F	F

Sthrygiolobus, *Igonococcus*와 *Thermococcus* 속, 황산염(sulfate)를 환원시키는 *Achaealobus* 속, 그리고 질산염(nitrate)을 환원시키는 *Pyrobaculum*과 *Pyrolobus* 속, 산화철[iron(III)]을 환원시키는 *Geoglobus* 속 등이 있다.

대표적인 열수구들은 중앙해령과 환태평양 조산대에 널리 퍼져 있는 것을 알 수 있으나, Tonga의 Tofua arc는 탐사가 미진한 지역이며 광상 개발 등 매우 중요한 지역으로 여겨진다. Tonga의 Tofua arc는 태평양 판과 오스트레일리아판이 만나는 경계지역으로 오스트레일리아판 밑으로 태평양 판이 유입되는 지형을 이루고 있다. 따라서 그 경계를 따라서 vent가 형성되어 있으며, Vent의 주변은 열수구로부터 뿜어져 나온 무기물 중 다량의 황 및 다양한 환원된 유기물이 존재하므로 이를 혐기적으로 환원시키는 고세균들이 상당히 많이 존재할 것으로 추측된다. 따라서, 본 실험에서는 Tofua arc로부터 시료를 채취하고 시료를 다양한 전자수용체로 이용하는 혐기적 환경에서 배양한 후 고세균 성장을 16S rRNA 유전자를 PCR을 통하여 검출하였다. 고세균의 성장이 확인된 배양은 연속희석법(dilution-to-extinction)으로 다시 배양한 후, 16S rRNA 유전자-PCR-DGGE 방법을 통하여 다시 검출한 후 band sequence의 pylogeny 분석을 통하여 동정을 시도하였다. 이를 통하여 시료에서 어떤 고세균들이 농화 배양이 되었는지를 알아보았다.

본 실험에서 사용한 시료는 2010년 3월 남태평양 Tonga의 Tofua arc trench (31°21'03"S, 177°21'03"W) 수심 500 m에서 grab sampler을 이용하여 chimney 및 주변의 침전물을 채취하였다. 채취된 시료는 배양전까지 4°C에서 보관하였다. 혐기성 고세균 배양을 위한 배지로 바닷물을 직접 사용하였다. 바닷물을 0.22 µm filter로 여과한 후, bicarbonate, 2 mM; NH₄Cl, 0.5 mM; KH₂PO₄, 0.1 mM; trace elements 0.1× (Kevbrin *et al.*, 1992); vitamin solution, 0.1× (Wolin *et al.*, 1963) 그리고 resazurin, 1× (1,000× stock solution, 0.5 g/L)를 첨가하여 사용하였다. 전자공여체로는 H₂ (5:5:90=H₂:CO₂:N₂)와 yeast extract, 0.1 g/L를 각각 사용하였다. 배지의 pH는 1 N HCl을 사용하여 pH 4와 7.2로 각각 적정하였고, 최종 전자수용체는 iron(III), 1 g/L; nitrate, 10 mM 그리고 S⁰, 0.1 g/L를 각각 사용하였다. 준비된 배지 10 ml을 20 ml vial tube (Wheaton, USA)에 분주한 후 100% N₂ gas로 10분간 치환하고, 환원제로 Na₂S·9H₂O, 240 mg/L를 첨가하여 혐기적 환경을 조성하였다. 산소의 투과를 막기 위하여 butyl rubber stopper를 사용하여 vial tube의 입구를 막았으며 고온에서

stopper가 열리는 것을 방지하기 위해 aluminum cap (Wheaton)으로 capping하였다. 65°C와 80°C 고온 배양기에서 2주간 배양하였으며, 고세균의 배양 유무는 고세균 16S rRNA 유전자의 증폭을 통하여 확인하였다. 고세균 16S rRNA 유전자를 증폭하기 위하여 사용한 primer는

Archaea-specific 16S rRNA primer 514F

(514F) (5'-GGTGCAGCCGCCGCGRKAHACC-3')와

Archaea-specific 16S rRNA primer 918R

(918R) (5'-TGCYCCCCGYCWATTSCITTA-3')이다(in this study). 증폭 반응을 위해 2× EF *Taq* mixture (Solgent, Korea), 10 µl; 10 pmol primer, 1 µl와 3'DW, 7 µl를 넣고 액체 배양한 시료로부터 추출한 DNA를 주형으로 1 µl를 넣어 총 20 µl의 반응액을 만들었다. 16S rRNA 유전자를 증폭시키기 위해 95°C에서 5분 동안 denaturation 시켰다. 그 다음 95°C에서 30초, 55°C에서 30초, 72°C에서 30초 동안 반응시키고 30회 반복 수행하였다. 마지막으로 72°C에서 7분간 최종 extension 시켰다. 고세균 16S rRNA 유전자는 다음의 조건에서 확인되었다. S⁰가 전자수용체로 사용되고 yeast extract를 전자공여체로 사용하여 65°C에서 배양했을 때와 nitrate가 전자수용체로 사용되고 yeast extract가 전자공여체로 사용되고 65°C와 80°C 배양 되었을 때이다(Table 1). Iron(III)을 전자수용체로 이용한 배양에서는 H₂와 yeast extract가 전자공여체로 사용된 실험군에서 고세균 16S rRNA 유전자가 증폭되었다(Table 1).

고세균 16S rRNA 유전자가 증폭된 배양의 시료는 연속 희석법으로 10⁵에서 10⁹까지 1/10 비율로 희석하였다(dilution-to-extinction 배양법). 희석하여 배양한 후, 고세균의 성장이 검출된 vial tube 중 가장 많이 희석된 곳의 시료를 확보하여 DGGE 분석을 시도하였다. 2주 후, 514F와 918R primer로 16 rRNA 유전자의 증폭 여부를 배양의 여부를 확인하였다. 전자수용체가 iron(III)인 것은 희석배양 후 고세균 16S rRNA 유전자가 더 이상 증폭되지 않았다. 몇몇 시료는 dilution-to-extinction 배양법을 반복하여 1 개 이상의 염기서열을 얻을 수 있었다(Table 1: PCR detection). 액체 배양된 시료로부터 16S rRNA 유전자 DGGE 분석을 위해서 사용한 primer들은

Archaea-specific 16S primer GC-340F

(GC340F) (5'-CGCCCCCGGC GCCCCGCGCCCGCCCCGCGCCCCCGCCCCCGACGGGGYGCASCAG-3')와

Archaea-specific 16S primer 757R

(757R) (5'-GGACTCYSGGGTMTCTRATCC-3')이다(in this study). 16S rRNA 유전자를 증폭시키기 위해서 95°C에서 5분 동안 denaturation시켰다. 그 다음 95°C에서 30초, 55°C에서 30초, 72°C에서 60초 동안 반응시키고 30회 반복 수행하였다. 마지막으로 72°C에서 10분간 최종 extension 시켰다. 그러나 GC clamp로 인해 PCR이 되지 않으면, GC clamp가 없는 Archaea-specific 16S Non GC-primer 340F (NonGC340F) (5'-CCCTACGGGG YGCASCAG-3')와 757R로 30회 증폭한 후, GC340F와 757R로 25회 재증폭하였다.

DGGE 분석을 위한 조건은 다음과 같다. PCR 산물은 8% polyacrylamid gel (acrylamide-N,N'-methylenebisacrylamide 37:1)에 urea가 30-60%로 들어간 gel을 이용하여 분석하였다. 50 ml conical tube에 acrylamide, 4 ml; urea, 2.52 g (30%)와 5.04 g (60%); formamide, 2.4 ml (30%)과 4.8 ml (60%) 그리고 50× TAE, 0.4 ml을 tube에 각각 넣은 후, 증류수로 20 ml까지 맞추었다. 수용액 상태의 gel에 10% Ammonium persulfate (for electrophoresis, Sigma), 140 µl과 TEMED (N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylenediamine), 10 µl를 각각 넣고 유리판 (20×18 cm, 20×16 cm, Bio-Rad, USA)에 30-60%까지 gradient가 되도록 넣고 30분간 굳혔다. 전기영동은 80 V로 12시간 동안 60°C에서 로딩하였다. 로딩이 끝난 gel은 1× SYBR-GREEN (Sigma-Aldrich, USA)이 들어있는 1× TAE에서 45분간 염색하고 DW로 15분간 탈색한 후 Gel Doc apparatus (Bio-Rad, Italy)의 UV transilluminator 상에서 디지털 카메라로 촬영하였다.

염색된 밴드들은 500 µl tube에 잘라 넣고 DW, 100 µl를 넣어 4°C에서 over night 하였다. 잘라낸 밴드의 서열을 분석하기 위해서, over night된 시료를 주형으로 1 µl씩 사용하고 primer는

NonGC340F와 757R를 사용하였다. DGGE 밴드의 DNA를 증폭시키기 위해 95°C에서 5분 동안 denaturation 시켰다. 그 다음 95°C에서 30초, 55°C에서 30초, 72°C에서 60초 동안 반응시키고 30회 반복 수행하였다. 마지막으로 72°C에서 10분간 최종 extension 시켰다. 증폭된 16S rRNA 유전자 PCR 산물은 CosmogeneTech 사(Koera)에 의뢰하여 PCR에 사용된 동일한 primer (NonGC340F)를 이용하여 서열 분석하였다. 16S rRNA 유전자 염기서열의 계통분석을 위해서 관련된 염기서열은 GenBank 데이터베이스로부터 획득하였으며, 그 염기서열들은 CLUSTAL_X program을 이용하여 alignment를 수행하였다 (Thompson et al., 1997). 유전자의 사이에 있는 갭들은 BioEdit program을 이용하여 편집하였다(Hall, 1999). 16S rRNA 유전자 염기서열의 유전적 진화 거리는 Kimura two-parameter 모델을 이용하여 계산하였다(Kimura, 1983). 계통도는 MEGA 4 프로그램(Takai and Nakamura, 2011)에서 neighbor-joining (Saitou and Nei, 1987)과 maximum parsimony (Fitch, 1971)를 사용하여 작성하였다. Branch의 신뢰도(bootstrap 값)는 1,000회의 재구성된 자료로부터 새로운 tree를 작성하여 계산하였다 (Felsenstein, 1985).

위와 같은 방법을 통하여 고세균이 배양된 시료들(Table 1)에서 DNA를 추출하여 16S rRNA 유전자-PCR-DGGE를 수행한 결과 10개의 밴드를 얻었다(Fig. 1). DGGE 밴드가 모두 같은 위치에 있는 이유는 *Thermococcus* 속에 속하는 종들의 16S rRNA 유전자 서열이 거의 비슷하므로 같은 위치에 나타난 것으로 보이며 계통도에서 보는 대로 종들 간의 거리가 매우 가깝게 나타나는 것으로 이를 추정할 수 있었다(Fig. 2). 이를 확인하기 위하여 얻은 밴드를 다시 재증폭하여 서열을 분석한 결과 모두

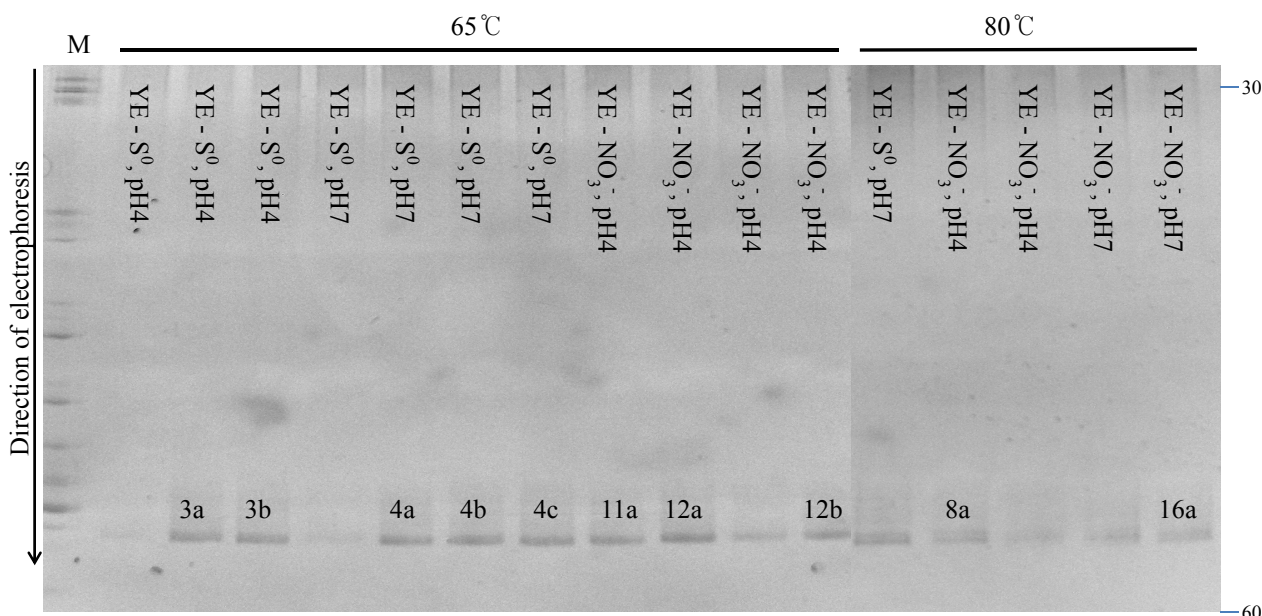


Fig. 1. PCR-DGGE analysis of 16S rRNA gene. 16S rRNA gene was amplified with the primer set GC340F and 757R. Lanes: M, 1 kb marker; EA, Electron acceptor. Electron donor used was yeast extract. Band was marked following the name based on the Table 1.

Thermococcus 속에 속하는 것을 알 수 있었다. 3a, 3b, 4a, 4b, 4c와 12b는 *T. alcaliphilus*나 *T. litoralis*와 99% 이상의 근연도를 나타내었으며 11a, 12a, 8a와 16a는 *T. celer*나 *T. barossii*와 99% 이상의 근연도를 나타내었다(Fig. 2) 대부분의 *Thermococcus* 속에 속하는 종들은 16S rRNA 유전자 계통도에서 종들 간에 99% 이상의 근연도를 나타내므로 DNA-DNA hybridization을 이용하여 종들을 구분하기 때문에 염기서열만으로 종 수준의 동정은 어려울 것으로 추정된다(Arab *et al.*, 2000; Kuwabara *et al.*, 2005)

S⁰를 전자 수용체로 사용하는 고세균들은 *Thermoproteus*, *Desulfurococcus*, *Thermofilum*, *Pyrococcus*, *Acidianus*, *Pyrodictium*, *Sthiygiolobus*, *Thermodiscus* 그리고 *Igonococcus* (Huber *et al.*, 2000) 속에 속하는 종들이 잘 알려졌으나, 본 실험에서는 S⁰를 전자수용체로 사용하는 *Thermococcus* 속의 종들만 발견되었다. 이것은 열수구에 존재하는 고세균 중 가장 우점하는 종류가 *Thermococcus*이기 때문으로 추정된다(Takai and Nakamura, 2011).

Thermococcus 속에 속하는 종들의 성장 온도는 약 55-110°C의 범위에서 생장이 가능하고(Stetter, 1996; Godfroy *et al.*, 1997; Kuwabara *et al.*, 2005), 최적의 온도는 약 80-90°C이다(Zillig *et al.*, 1983; Kobayashi *et al.*, 1994; González *et al.*, 1995; Dirmeier *et al.*, 1998) *Thermococcus* 속의 종들은 S⁰를 최종 전자수용체로 하여 살아가며, sulfate, thiosulfate, nitrate 등은 사용할 수 없는 것으로 알려져 있다(Zillig *et al.*, 1983). 따라서, 본 배양조건에서는 전자 수용체로 충분한 S⁰가 공급된 실험군의 경우 *Thermococcus*가 검출된 것은 놀라운 사실이 아니다. 그러

나 실험 과정에서 nitrate가 최종 전자수용체로 사용된 배양에서도 *Thermococcus*의 16S rRNA 유전자가 증폭되었다. 최종 전자수용체로 nitrate가 들어간 실험군에서도 *Thermococcus*가 자랄 수 있었던 이유는 배지를 혐기적으로 만들기 위해 첨가한 Na₂S가 S⁰로 전환되어 *Thermococcus*의 성장을 촉진하였을 것으로 추정된다. 실제로 *Thermococcus* 속에 속하는 종들이 S⁰를 최종 전자수용체로 사용하지 않고 성장 자극 요소로 사용한다는 보고가 있다(Arab *et al.*, 2000).

Thermococcus 속에 속하는 고세균들은 종에 따라 비교적 넓은 pH의 범위에서 생장이 가능하다. 바닷물의 pH는 7.2-8.0인데 비해 열수구로부터 나오는 열수는 pH가 낮기 때문에 *Thermococcus* 속에 속하는 종들 중 일부는 넓은 pH의 범위를 갖는 것으로 보이는데 그 예로 *T. barossii* (pH 3-9) (Duffaud *et al.*, 1998)와 *T. peptophilus* (pH 4-8) (González *et al.*, 1995)는 pH가 4 이하에서도 생장이 가능하다. 그러나 대부분의 *Thermococcus* 속에 속하는 종들은 pH 6-7이 최적의 조건이다. 본 실험에서는 pH 4에서 *Thermococcus* 속의 종이 배양 되는지 알아보기 위해 실험을 하였고, 특이하게도 *T. alcaliphilus*가 pH 4에서 확인되었는데, *T. alcaliphilus*의 pH 범위는 6.5-10.5이며 최적 pH는 9이다. 그러나 pH 4에서 *T. alcaliphilus* 16S rRNA 유전자 증폭이 확인된 것은 1) *T. alcaliphilus*가 기존의 범위보다 넓은 성장 pH 범위를 가지거나, 2) 아마도 종들간의 16S rRNA 유전자의 근연도가 가깝기 때문에 짧은 유전자 염기서열(약 400 bp)만으로 정확한 분석이 어려워 *Thermococcus* 속의 다른 유사종이나 새로운 종의 유전자가 증폭되었을 수도 있을 것이다(Keller *et al.*, 1995).

본 실험을 통하여, Tonga 열수구로부터 얻은 시료로부터 16S

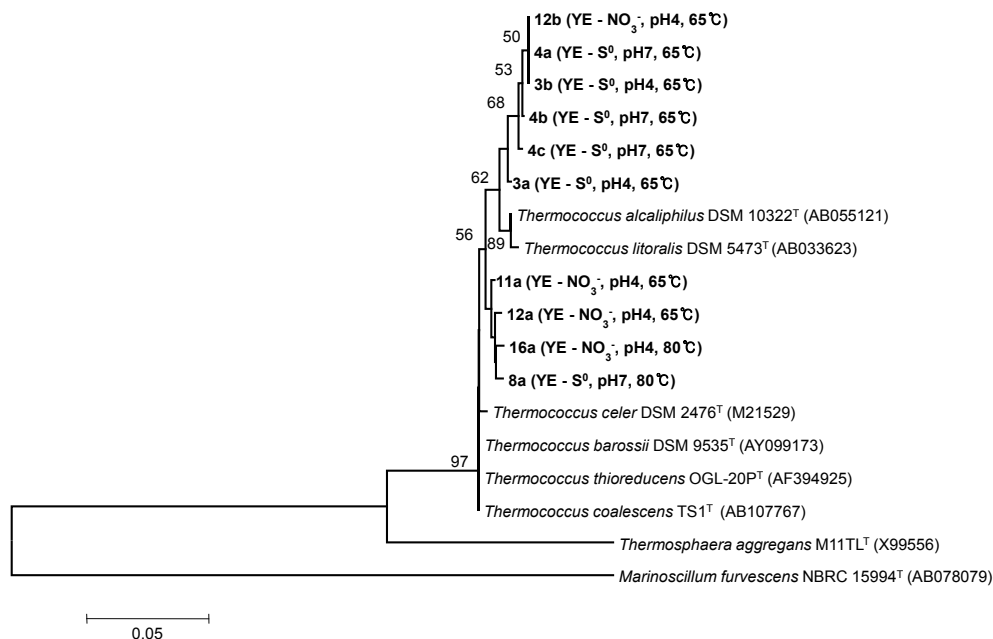


Fig. 2. Phylogenetic tree show the relationship between enriched archaea and reference sequences. Bands from DGGE analysis (see Fig. 1) were used for sequencing and neighbor-joining algorithm was used for construction of the phylogenetic tree. Numbers at the nodes are bootstrap values obtained from 1,000 replicates. Nucleotide sequence accession numbers are shown in parentheses. Scale bar indicates 50 inferred nucleotide substitutions per 1,000 nt.

rRNA 유전자의 PCR과 DGGE 기법을 이용하여 어떤 고세균이 존재하는지 알아보고자 하였다. PCR과 DGGE 기법으로 얻은 자료로부터 Tonga 열수구에서 발견한 고세균들은 대부분 *Thermococcus* 속에 속하지만, *Thermodiscus* 속에 속하는 종도 확인이 되므로 다양한 고세균들이 있을 것으로 예상된다(자료 미제시). Na₂S 대신 다른 환원제를 이용하여 배지에서 S⁰의 제거하는 등 새로운 배양조건을 시도한다면 *Thermococcus* 속을 제외한 다른 고세균의 배양도 가능할 것으로 여겨진다.

적요

열수구(Hydrothermal vent)는 빛이 없는 환경에서 생명체의 진화가 일어나는 독특한 환경을 유지하고 있다. 남태평양 Tonga의 Tofua arc의 열수구로부터 퇴적물을 채취하여 산화철 [iron(III)], 황(elemental sulfur, S⁰) 그리고 질산염을 전자수용체로 사용하고, 수소(H₂), yeast extract를 전자공여체로 사용하여 배양에 의한 미생물의 다양성을 연구하였다. 배양 온도는 각각 65°C와 80°C였으며, 연속희석배양법과 16S rRNA 유전자의 PCR-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis를 분석하고, 검출된 염기서열의 정보분석을 통하여 고세균을 동정하였다. 16S rRNA 유전자의 계통분류학적 분석 결과 배양된 대부분의 고세균은 *Thermococcus* 속(*T. alcaliphilus*, *T. litoralis*, *T. celer*, *T. barossii*, *T. thoreducens*, *T. coalescens*)에 속하며 그들과 98-99%의 상동성을 가지고 있었다. *Thermococcus* 속의 미생물들이 일반적으로 이용할 수 없는 질산염과 산화철을 전자수용체로 첨가한 배양에서 관찰되었으나, 이는 환원제로 첨가한 Na₂S의 산화물을 이용하여 성장한 것으로 추정된다. *Thermococcus* 속에 속하는 고세균 외의 다양한 고세균의 배양을 위해서는 Na₂S 대신 다른 환원제를 사용하는 배양조건이 이용이 요구된다.

감사의 말

본 연구는 2010년도 충북대학교 교내 연구비에 의해 지원되었습니다. 본 연구에 사용된 열수구 시료는 국토해양부 '통가해저열수광상개발사업'을 통하여 채취하였으며 이에 감사합니다.

참고문헌

- Arab, H., Volker, H., and Thomm, M. 2000. *Thermococcus aegaeicus* sp. nov. and *Staphylothermus hellenicus* sp. nov., two novel hyperthermophilic archaea isolated from geothermally heated vents off Palaeochori Bay, Milos, Greece. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **50**, 2101-2108.
- Dirmeier, R., Keller, M., Hafenbradl, D., Braun, F.J., Rachel, R., Burggraf, S., and Stetter, K.O. 1998. *Thermococcus acidaminovorans* sp. nov., a new hyperthermophilic alkaliphilic archaeon growing on amino acids. *Extremophiles* **2**, 109-114.
- Duffaud, G.D., d'Hennezel, O.B., Peek, A.S., Reysenbach, A.-L., and Kelly, R.M. 1998. Isolation and characterization of *Thermococcus barossii*, sp. nov., a hyperthermophilic archaeon isolated from a hydrothermal vent flange formation. *Syst. Appl. Microbiol.* **21**, 40-49.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* **39**, 783-791.
- Fitch, W.M. 1971. Toward defining the course of evolution: minimum change for a specific tree topology. *Syst. Zool.* **20**, 406-416.
- Godfroy, A., Lesongeur, F., Raguénès, G., Quérellou, J., Antoine, E., Meunier, J.-R., Guézennec, J., and Barbier, G. 1997. *Thermococcus hydrothermalis* sp. nov., a new hyperthermophilic archaeon isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **47**, 622-626.
- González, J.M., Kato, C., and Horikoshi, K. 1995. *Thermococcus peptonophilus* sp. nov., a fast-growing, extremely thermophilic archaeobacterium isolated from deep-sea hydrothermal vents. *Arch. Microbiol.* **164**, 159-164.
- Hall, T.A. 1999. bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* **41**, 95-98.
- Hoki, T., Nishijima, M., Miyashita, H., and Maruyama, T. 1995. Dense community of hyperthermophilic sulfur-dependent heterotrophs in a geothermally heated shallow submarine biotope near Kodakara Jima Island, Kagoshima, Japan. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 1931-1937.
- Huber, H., Burggraf, S., Mayer, T., Wyszchony, I., Rachel, R., and Stetter, K.O. 2000. *Ignococcus* gen. nov., a novel genus of hyperthermophilic, chemolithoautotrophic Archaea, represented by two new species, *Ignicoccus islandicus* sp. nov. and *Ignicoccus pacificus* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **50**, 2093-2100.
- Huber, R. and Stetter, K.O. 1992. The order Termophoteales, pp. 677-683. In Balows, A., Trüper, H.G., Dworkin, M., Harder, W., and Schleifer, K.H. (eds) The prokaryotes. Springer Berlin Meidelberg New York, N.Y., USA.
- Keller, M., Braun, F.J., Dirmeier, R., Hafenbradl, D., Burggraf, S., Rachel, R., and Stetter, K.O. 1995. *Thermococcus alcaliphilus* sp. nov., a new hyperthermophilic archaeum growing on polysulfide at alkaline pH. *Arch. Microbiol.* **164**, 390-395.
- Kevbrin, V.V. and Zavarzin, G.A. 1992. The influence of sulfur compounds on the growth of halophilic homoacetic bacterium *Acetohalobium arabaticum*. *Microbiology* [English Translation of Mikrobiologiya] **61**, 563-571.
- Kimura, M. 1983. The neutral theory of molecular evolution. Cambridge: Cambridge University, USA.
- Kobayashi, T., Kwak, Y.S., Akiba, T., Kudo, T., and Horikoshi, K. 1994. *Thermococcus profundus* sp. nov., a new hyperthermophilic archaeon isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *Syst. Appl. Microbiol.* **17**, 232-236.
- Kuwabara, T., Minaba, M., Iwayama, Y., Inouye, I., Nakashima, M., Marumo, K., Maruyama, A., Sugai, A., Itoh, T., Ishibashi, J., and et al. 2005. *Thermococcus coalescens* sp. nov., a cell-fusing hyperthermophilic archaeon from Suiyo Seamount. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **55**, 2507-2514.
- Saitou, N. and Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**, 406-425.
- Stetter, K.O. 1992. Life at the upper temperature border, pp. 195-219. In Tran, T.V.J., Tran, T.V.K., Moundolou, J.C., Schneider, J., and McKay, C. (eds.) Frontiers of life. Editions Frontiers, Gif-sur-Yvette.
- Stetter, K.O. 1996. Hyperthermophilic prokaryotes. *FEMS Microbiol. Rev.* **18**, 149-158.

- Takai, K. and Nakamura, K.** 2011. Archaeal diversity and community development in deep-sea hydrothermal vents. *Curr. Opin. Microbiol.* **14**, 1-10.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., and Kumar, S.** 2007. MEGA4: Molecular evolution genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* **24**, 1596-1599.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., and Higgins, D.G.** 1997. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* **25**, 4876-4882.
- Wolin, E.A., Wolin, M.J., and Wolfe, R.S.** 1963. Formation of methane by bacterial extracts. *J. Biol. Chem.* **238**, 2882-2888.
- Zillig, W., Holz, I., Janekovic, D., Kelenk, H.P., Jmsel, E., Trent, J., Wunderl, S., Fortjatz, V.H., Coutinho, R., and Ferreira, T.** 1990. *Hyperthermus butylicus*, a hyperthermophilic sulfur-reducing archaeobacterium that ferments peptides. *J. Bacteriol.* **172**, 3959-3965.
- Zillig, W., Holz, I., Janekovic, D., Schäfer, W., and Reiter, W.D.** 1983. The Archeobacterium *Thermococcus celer* represents a novel genus within the thermophilic branch of the archaeobacteria. *Syst. Appl. Microbiol.* **4**, 88-94.