

Nýsköpun & neytendur
Innovation & Consumers

Vinnsla, virðisauki & eldi
Value Chain, Processing
& Aquaculture

Mælingar & miðlun
Analysis & Consulting

Líftækni & lífefni
Biotechnology & Biomolecules

Öryggi, umhverfi & erfðir
Food Safety, Environment
& Genetics



Lífríki í hverum á háhitasvæðum á Íslandi.

Heildarsamantekt unnin vegna
Rammaáætlunar. Lokaskýrsla.

Sólveig K. Pétursdóttir
Snædís H. Björnsdóttir
Guðmundur Óli Hreggviðsson
Sólveig Ólafsdóttir

Líftækni og lífefni

Skýrsla Matís 42-10
Desember 2010

ISSN 1670-7192

Titill / Title		Lífriki í hverum á háhitasvæðum á Íslandi. Heildarsamantekt unnin vegna Rammaáætlunar. Lokaskýrsla.	
Höfundar / Authors		Sólveig K. Pétursdóttir, Snædís H. Björnsdóttir, Guðmundur Óli Hreggviðsson, Sólveig Ólafsdóttir	
Skýrsla / Report no.	42-10	Útgáfudagur / Date:	Desember 2010
Verknr. / project no.	1016		
Styrktaraðilar / funding:			
Ágrip á íslensku:		Rannsóknir voru gerðar á lífríki í hverum á fimm háhitasvæðum á Íslandi á vegum Rammaáætlunar árin 2004-2009. Markmiðið var að svara spurningum um hve mikill og hvers eðlis breytileikinn er í örveruflóru milli háhitasvæða á Íslandi sem rannsökuð voru einkum m.t.t. fjölbreytni og fágætra hópa. Í þessari skýrslu eru dregnar saman niðurstöður sem fengust úr ofangreindum rannsóknum. Svæðin sem voru til skoðunar voru Hengilssvæði, Torfajökulssvæði, Krafla / Námafjall, Krísuvík og Vonarskarð. Ennfremur voru niðurstöður úr sambærilegri rannsókn sem gerð var vegna umhverfismats á jarðhitasvæðunum á Þeistareykjum og í Gjástykki höfð með í þessari samantekt. Alls voru tekin 115 sýni á svæðunum sex og tókst að greina tegundasamsetningu í 80 þeirra. Tegundagreinandi gen baktería og fornbaktería í DNA úr sýnunum voru mögnuð upp og raðgreind. Raðirnar voru flokkaðar eftir skyldleika og greindar til tegunda eða ættkvísla með samanburði við sambærilegar raðir í Genbank. Alls tókst að greina 4424 bakteríuraðir og 1006 fornbakteríuraðir úr sýnunum. Dreifing baktería og fornbaktería í sýnunum var könnuð og kom í ljós að 16 bakteríufylkingar fundust á allflestum svæðunum og voru tegundir af fylkingu <i>Aquificae</i> algengastar, enda oft frumframleiðendur í hverum. Tegundir af fylkingum <i>β</i>- og <i>γ</i>-proteobaktería og <i>Deinococcus – Thermus</i> fundust einnig í umtalsverðum mæli á öllum svæðum nema í Krísuvík. Ennfremur fundust nokkrar aðrar fylkingar á stökum svæðum. Innan fornbaktería fundust <i>Crenarcheota</i> tegundir á öllum svæðunum, <i>Euryarchaeota</i> tegundir fundust í Vonarskarði og á Þeistareykjum, <i>Thaumarchaeota</i> fannst í Vonarskarði og í Kröflu / Námafjalli og <i>Nanoarchaeota</i> á Torfajökulssvæðinu. Útreikningar á líffræðilegum fjölbreytileika (H) örvera á svæðunum sex sýndu að Kröflusvæðið væri fjölbreyttast, þá Torfajökull, síðan Vonarskarð, Þeistareykir, Hengill og að lokum Krísuvík. Mat á líffræðilegum fjölbreytileika með útreikningi á söfnunarkúrfum studdi þessa niðurstöðu í meginatriðum. Líffræðileg sérstaða var metin á grundvelli fágætra tegunda m.v. ≤96% samsvörun við nánasta ættingja í Genbank. Alls fundust 74 fágætar tegundir eða ættkvíslir í sýnunum og virtust þær að langmestu leyti svæðisbundnar og ekki ólíklegt að einhverjar þeirra séu einlendar. Flestar nýjar tegundir eða ættkvíslir fundust á Torfajökulssvæðinu. Vonarskarð, Krafla / Námafjall og Þeistareykir voru með nokkru færri fágætar tegundir eða ættkvíslir. Nýjar ættkvíslir fundust einnig á Hengilssvæðinu, en ekki í sama mæli og í hinum fyrrnefndu.	
Lykilorð á íslensku:		Háhitasvæði, tegundasamsetning, dreifing, líffræðilegur fjölbreytileiki, fágætar tegundir	

Summary in English:

Culture independent methods were used to study the microbial composition of hot springs in five geothermal areas in Iceland in 2004-2009. The aim was to answer questions on the degree of biodiversity and to what extent the species found were unique to the sites investigated.

In this report the site specific research results were combined and compared. The geothermal sites investigated were the Hengill area, the Torfajökull area, the Krafla / Námafjall area, Krísuvík and Vonarskarð. Results from a similar research from an environmental assessment of the geothermal areas of Þeistareykir and Gjástykki were also used.

A total of 115 samples were collected from the six geothermal areas and the microbial species composition was estimated in 80 of them. The 16S rRNA genes were amplified from DNA from the samples and partially sequenced. The obtained sequences were classified and identified to the species or genus level by comparison to similar sequences in Genbank. The total of 4424 bacterial sequences and 1006 archaeal sequences were analysed.

The distribution of bacterial and archaeal phyla of the samples was investigated and revealed that 16 bacterial phyla were represented in all areas. Also, that the phylum of the primary producers of hot springs - Aquificae - was dominating. Species belonging to *β- and γ-proteobacteria* and *Deinococcus – Thermus* were also found in considerable amounts in all areas except Krísuvík. Several bacterial phyla were only found at one or two geothermal areas.

Species belonging to Crenarchaeota were found in all six areas, Euryarchaeota were found in Vonarskarð and Þeistareykir, Thaumarchaeota was found in Vonarskarð as well as in the Krafla /Námafjall area and Nanoarchaeota in the Torfajökull area.

Calculation of the biodiversity index (H) of microbial species of the six geothermal areas revealed that the index for the Krafla / Námafjall area was highest, then Torfajökull, Vonarskarð, Þeistareykir, Hengill and finally Krísuvík. The estimate of biodiversity based on Rarefaction curves confirmed the results.

The estimation of uniqueness of the areas was based on the number of novel species found using ≤96% similarity to closest relative in Genbank as the cutoff value. The total of 74 novel species or genera were found in the samples most of which were only found in one or at most two areas. Most of these were from the Torfajökull area. A considerable number of novel species were also found in Vonarskarð, Námafjall and Þeistareykir. Novel species or genera were also found in the Hengill geothermal area.

English keywords:

Geothermal areas, species composition, distribution, biodiversity, novel species.

Efnisyfirlit

Bakgrunnur	1
1. Inngangur	2
2. Sýnataka og sýnatökustaðir	7
3. Erfðagreiningar	14
3.1 Dreifing bakteríufylkinga.....	15
3.2 Dreifing fornbakteríufylkinga	17
4. Líffræðilegur fjölbreytileiki	18
4.1 Líffræðilegur fjölbreytileiki - Shannon	19
5. Líffræðileg sérstaða	21
5.1 Fágætar tegundir á hverasvæðunum sex.....	21
5.2 Dreifing fágætra tegunda	28
5.2.1 <i>Actinobacteria</i>	28
5.2.2. <i>Bacteroidetes / Chlorobi</i>	30
5.2.3 <i>Chloroflexi - Firmicutes</i>	31
5.2.4 <i>Crenarchaeota</i> og <i>Thaumarchaeota</i>	33
5.2.5 <i>Euryarchaeota</i>	34
5.2.6 <i>Acidobacteria</i>	35
5.2.7 <i>Deinococcus - Thermus</i>	36
6. Samantekt	37
Þakkir	39
HEIMILDIR.....	40

Bakgrunnur

Á Íslandi hefur verið unnið að rannsóknum á lífríki hvera á Íslandi, hitakærum bakteríum og ensímum þeirra allt frá árinu 1980. Fyrst á Líftæknideild Iðntæknistofnunar undir stjórn Dr. Jakobs K. Kristjánssonar allt til ársins 1998, síðan á vegum fyrirtækisins Prokaria ehf fram til ársins 2006 og nú síðustu árin á sviði Líftækni og lífefna hjá Matís ohf. Mikil sérfræðilekking á sviði hveralíffræði hefur byggst upp innan rannsóknarhópsins sem er að nokkru leyti sá sami og í upphafi.

Rammaáætlun ríkisstjórnarinnar um nýtingu jarðvarma á háhitasvæðum á Íslandi var hleypt af stokkunum fyrir nokkrum árum síðan í því skyni að raða háhitasvæðum m.t.t. til væntanlegrar nýtingar. Röðunin byggist þá á niðurstöðum rannsókna innan mismunandi sérgreina á sviðum jarðfræði, jarðefnafræði, örverufræði o.fl. Rannsóknir á lífríki í hverum voru liður í þessari áætlun og var Prokaria ehf falið á sínum tíma að annast þær. Verkefnið fluttist svo með Prokaria ehf til Matís í ársbyrjun 2007.

Nútímaleg aðferðafræði sameindalíffræðinnar var nýtt til verksins, enda hefur Matís yfir að ráða besta tækjabúnaði sem völ er á til þess arna. Efnagreiningar hafa ennfremur verið gerðar í síauknum mæli í tengslum við verkefnið, enda vægi áhrifa efnasamsetningar á örveruflórana óumdeildar.

Fimm háhitasvæði voru könnuð árin 2004-2009 og skýrslum skilað þar um. Svæðin sem voru könnuð voru valin í samráði við Hákon Aðalsteinsson, fulltrúa Rammaáætlunar innan Orkustofnunar. Þessi svæði eru Hengilssvæðið, Torfajökulssvæðið, Krísuvík, Krafla / Námafjall og Vonarskarð. Ennfremur var gerð sambærileg umhverfisúttekt á jarðhitasvæðinu að Þeistareykjum og í Gjástykki og voru niðurstöðurnar hafðar með í þessari skýrslu.

1. Inngangur

Jarðhitasvæði eru afar breytileg bæði jarðfræðilega og efnafræðilega. Þó má í grófum dráttum flokka þau í tvennt þ.e. háhitasvæði og lághitasvæði. Þau fyrrnefndu einkennast af súrum jarðvegi, brennisteinsútfellingum, leirhverum og gufuaugum en hin síðarnefndu einkennast af vatnshverum og goshverum þar sem sýrustigið er hlutlaust eða basískt. Munur þessara tveggja aðalflokka byggist einkum á jarðfræðilegum uppruna hitauppsprettunnar.

Háhitasvæðin eru skilgreind þannig að hitastig á 1000 m dýpi sé $>200^{\circ}\text{C}$. Gastegundir eru einkum N_2 og CO_2 , en H_2S og H_2 geta verið allt að 10% af heildargasi. Ammonía, metan og kolmónoxíð finnast einnig. Sýrustig á gufunni undir yfirborði er um pH 7 vegna veikur sýranna CO_2 ($\text{pK} = 6.3$) og H_2S ($\text{pK} = 7.2$). Nær yfirborði er súlfíð (H_2S) gufunnar oxað efnafræðilega og líffræðilega yfir í brennistein og jafnvel yfir í brennisteinssýru sem veldur því að sýrustigið lækkar til muna á yfirborði auk þess sem sýran veldur ummyndun á jarðvegi. Þar sem hitastigið er hátt kemst lítið vatn upp á yfirborðið og hverirnir verða aðallega leirpottar eða gufuaugu en hvort verður er háð vatnsstöðu. Þessi svæði eru venjulega mjög óstöðug og birtast og hverfa tiltölulega hratt. Þar sem ekkert afrennsli er frá þessum hverum mettast vatnið smám saman af gösum (Guðmundur Pálmason 2005). Yfirborð á háhitasvæðum getur verið mjög litríkt (mynd 1) en mismunandi litir stafa af uppleystum steinefnum og efnum í vatni og gufu úr iðrum jarðar sem hvarfast við súrefni sem er uppleyst í jarðvatninu nær yfirborði. Brennisteinn og brennisteinssambönd eru dæmigerð fyrir háhitasvæðin og mynda oft gular skellur á yfirborði. Rauði liturinn er hematít (Fe_2O_3) og dökkgrár leirinn er samband járns og brennisteins (FeS). Hvítur leir hefur hátt kaolínit innihald, en dökkur leir hefur oftast hátt smektít innihald. Þungmálmar eru yfirleitt í tiltölulega háum styrk á súrum svæðum (Guðmundur Pálmason 2005).



Mynd 1. Litríkt yfirborð á jarðhitasvæðinu á Þeistareykjum.

Lághitasvæðin eru hinsvegar skilgreind þannig að hitastig sé $<150^{\circ}\text{C}$ á 1000 m dýpi. Þau finnast oft við jaðra háhitasvæðanna. Þau eru hituð af hraunstraumum neðanjarðar eða deyjandi kvikuhólfum. Jarðvatn flæðir eða seytla um slík fyrirbæri, hitnar og leitar yfirborðs og inniheldur þá uppleyst steinefni eins og kísil og einnig gastegundir, einkum koldíoxíð. Styrkur súlfíðs í vatninu er lágur. Sýrustig undir yfirborði er nánast hlutlaust og helst hlutlaust eða létt basískt á yfirborð. Þar er ekkert H_2S til að oxast í sýru; CO_2 rýkur burt og kísillinn fellur út sem veldur hærra sýrustigi. Á yfirborði sjást volgir eða heitir vatnshverir. Þessi svæði eru tiltölulega stöðug þar sem þau liggja utan virkra eldfjallasvæða. Þau get samt horfið og ný myndast við jarðskjálfta.

Allt jarðhitavatn inniheldur kísil (SiO_2). Magn af uppleystum kísil í vatninu er háð hitastigi. Eftir því sem hitastig lækkar því meira fellur út og hið dæmigerða kísilhrúður verður til. Þessu er öfugt farið með kalsíumkarbonat (CaCO_3) sem fellur út við hærra hitastig og myndar kalkhrúður. Stundum myndast útfellingar af magnesíum silicati en þær eru fremur sjaldgæfar (Guðmundur Pálmason, 2005).

Hverasvæði eru afar sérstök búsvæði örvera. Þau eru sjaldgæf á heimsvísu og landfræðilega afmörkuð og eru því eins konar eyjar í vistfræðilegum skilningi. Umhverfispættir s.s. hitastig, sýrustig, vatnsstaða og efnasamsamsetning ráða mestu um það hvaða bakteríu- og fornbakteríutegundir geta þrífist á hverjum stað. Það má því segja að örveruflóra hveranna endurspegli hveragerðina. Þegar breytingar verða á umhverfispáttum af náttúrulegum völdum eða manna völdum má því vænta breytinga á samsetningu örveruflórunnar. Enn eitt atriði sem ber að hafa í huga eru áhrif einnar tegundar á aðra. Þannig er mögulegt að ein bakteríutegund hindri eða örvi vöxt annarrar.

Umhverfispættir á hverasvæðum geta verið mjög breytilegir. Þetta á t.d. við um sýrustig sem er mjög lágt (pH 2-3) í súrum leirhverum, en hátt (pH 9-10) í basískum hverum. Sýrustig getur einnig verið um pH 7 í hlutlausum vatnshverum og pH 5-6 í sérstökum súlfíðríkum hverum. Aðrir umhverfispættir geta einnig verið mjög breytilegir s.s. efnasamsetning vatns jafnvel milli nálægra hvera. Ennfremur má nefna gastegundir (H_2S , S, CH_4 , CO_2) sem streyma upp um

hverina og eru uppspretta efnaorku og leiða oft til myndunar afar sérstakra örverusamfélaga sem mynda litríkar örveruþekjur í hverunum (mynd 2a-c).



Mynd 2a-c. Litríkar örveruþekjur. a) Úr afrennsli úr vatnshver í Grændal (mynd M.Schmid). b) Úr súlfíðríkum leirhver í Seltúni í Krísuvík (mynd Guðmundur Óli Hreggviðsson). c) Úr Vonarskarði (mynd SP).

Af ofangreindu má ljóst vera að ótal þættir hafa áhrif á vöxt og viðgang örvera á jarðhitasvæðum. Á vettvangi getur því oft reynst erfitt að meta hvar á að taka sýnið. Hvaða staður er dæmigerður fyrir svæðið og hvaða staðir eru sérstakir? Tveir sýnatökustaðir með fárra cm millibili geta verið gjörólíkir hvað tegundasamsetningu varðar. Oft er þetta vel sýnilegt í mislitum örveruþekjum. E.t.v. er örlítið gasuppstreymi sem leiðir til myndunar annarrar örveruflóru en ella. Hitastigsfallandi hefur einnig mikil áhrif á gerð og samsetningu örveruþekja.

Hverir flokkast til jaðarumhverfis m.t.t. hitastigs og oft einnig sýrustigs. Aðrar gerðir jaðarumhverfis geta verið ofursölt vötn, hár þrýstingur á hafsbotni o.fl. Örveruflóra jaðarvistkerfa einkennist oft af einni ríkjandi tegund sem er vel aðlöguð ríkjandi jaðaraðstæðum og fjölmörgum tegundum sem finnast aðeins í mjög lágu hlutfalli. Eftir því sem umhverfisálagið minnkar, hitastigið er lægra og sýrustigið nær hlutlausu pH fjölgar almennt þeim tegundum sem fá þrífist og hlutfall ríkjandi tegundar verður ekki alveg eins afgerandi.

Þegar greina á tegundasamsetningu örverusamfélaga eru aðferðir erfðatækninnar einkum nýttar, svonefndar erfðagreiningar. Þær gera kleift að greina tegundasamsetningu í sýni án þess að ræktun einstakra baktería sé skilyrði. Þær ná til mun fleiri tegunda en ella hefði verið hægt að ná með ræktunum, enda almennt viðurkennt að einungis er hægt að ná í brot af raunverulegum tegundafjölda í sýni með því að rækta. Ástæðan er einkum sú að erfitt eða

ógjörningur er að skapa aðstæður í ræktunum sem eru nauðsynlegar fyrir flestar tegundir til að vaxa. Með erfðagreiningum hefur því tekist að nálgast mun betur raunverulega tegundasamsetningu í fjölbreyttum örverusamfélögum, dreifingu einstakra tegunda og tengsl þeirra við umhverfispætti. Í stuttu máli felst erfðagreining í að einangra heildar DNA beint upp úr sýni (vatnssýni, lífmassasýni eða jarðvegssýni). Tegundagreinandi 16S rRNA gen baktería er síðan magnað upp (PCR) úr heildar DNA, það klónað, og klónarnir sem nú innihalda eitt eintak af geninu síðan raðgreindir. Raðirnar eru síðan flokkaðar og bornar saman við sambærilegar raðir í genabönkum á veraldarvefnum. Þannig næst í flestum tilvikum að ákvarða tegundina, ættkvíslina, eða ættina sem röðin kom úr. Almennt er talið að 50-100 klónar nægi til að lýsa tegundasamsetningu í einu sýni, þetta er þó mismunandi og fer eftir gerð og uppruna sýnisins.

Eftir að Pace og félagar (Pace o.fl. 1985) lögðu grunninn að greiningum á örverusamfélögum með raðgreiningum á 16S rRNA geninu - óháð ræktunum - hefur mikið vatn runnið til sjávar. Nú eru yfir 10^6 rRNA raðir í opinberum gagnaveitum eins og Genbank og fjöldi raða heldur áfram að tvöfaldast á 15-18 mánaða fresti. Ör þróun í aðferðafræði og tækjabúnaði á allra síðustu árum hefur leitt af sér aukna afkastagetu þannig að í stað 10-100 greininga áður skipta þær nú tugum og jafnvel hundruðum þúsunda. Það gefur því auga leið að innistæður í Genbank og öðrum sambærilegum stofnunum vaxa afar hratt þessi misserin.

Töluvert gagnamagn hefur safnast úr rannsóknum á lífríki hvera vegna Rammaáætlunar, sérstaklega á formi tegundagreinandi genaraða (16S rRNA) úr hverabakteríum og fornbakteríum. Er nú búið að koma þessum gögnum fyrir í gagnagrunni (BIOEDIT) sem hýsir sambærileg gögn úr öðrum rannsóknum á hverasvæðum á Íslandi. Þetta gerir kleift að skoða og bera saman tegundasamsetningu í einstökum hverum og hverasvæðum víðs vegar um land m.t.t. umhverfispáttu o.fl. á skilvirkari hátt en ella. Enn er þó unnið að því að merkja gögn úr eldri rannsóknum annars staðar frá og vista þau í grunninum þannig að hægt sé að nýta þau á skilvirkari hátt. Sum þessara gagna eru komin nokkuð til ára sinna þar sem annað merkingakerfi var í notkun en nú er. Hér er því ekki endanleg útgáfa að gagnagrunni, en þó eru allar upplýsingar úr rannsóknum á háhitasvæðum á vegum Rammaáætlunar komnar inn og telst því gerð grunnsins lokið að því leytinu til.

Viðfangsefni þessarar samantektar og aðalmarkmið var að raða háhitasvæðunum sem rannsökuð voru innan Rammaáætlunar, þ.e. Hengilssvæði, Torfajökulssvæði, Krísuvík, Kröflu / Námafjalli og Vonarskarði eftir líffræðilegum fjölbreytileika og líffræðilegri sérstöðu eða fágæti þeirra. Sambærileg gögn úr rannsókn vegna umhverfismats á hverasvæðunum að þeistareykjum og í Gjástykki eru höfð með í samantektinni (Sólveig Pétursdóttir o.fl. 2008).

Skýrsludrögum heildarsamantektar var skilað snemma árs 2010 og voru þau að nokkru leyti unnin í samstarfi við Dr. Þóru Ellen Þórðardóttur o.fl. sem sátu í viðkomandi nefnd. Þessi lokaskýrsla er unnin upp úr fyrrnefndum drögum, en farið nokkru ítarlegar í einstök atriði. Skýrslan inniheldur heildaryfirlit um tegundagreiningar sem unnar voru á sýnunum ásamt tölfræðilegri úrvinnslu. Sá hluti skýrslunnar sem lýtur að fjölbreytileika var einkum unninn upp úr tegundagreiningum úr ríki baktería, þar sem niðurstöður úr þeim hluta voru þéttari, heillegri og samanburðarhæfari en tegundagreiningar úr ríki fornbaktería. Sá hluti skýrslunnar sem snýr að mati á sérstöðu eða fágæti var unninn aftur að mestu leyti. Þannig þótti ensynt að bera þyrfti einstakar raðir eða tegundir aftur saman við sambærilegar tegundagreiningar sem hýstar eru í Genbank. Genabanki sá er síbreytilegt fyrirbæri þar sem stöðugt bætast við nýjar greiningar víðs vegar að úr heiminum og er innistæðan eða viðmiðunin því síbreytileg.

Upplýsingar um aðferðafræði tegundagreininga, einstök svæði og greiningar einstakra sýna er að finna í sérstökum skýrslum sem unnar voru jafnóðum upp úr rannsóknunum og skilað á árunum 2004 – 2009 (Viggó Þór Marteinsson o.fl. 2004; Sólveig K. Pétursdóttir o.fl. 2006-2009).

Niðurstöður úr rannsóknum á lífríki í hverum á háhitasvæðum á Íslandi voru kynntar á stórri alþjóðlegri ráðstefnu um örveruvistfræði ISME-13 (International Symposium of Microbial Ecology) sem haldin var í Seattle í ágúst 2010 (S. Pétursdóttir o.fl. 2010).

Grein um *Thermus islandicus* sem er einlend hitakær bakteríutegund og á Íslandi og fannst í verkefninu var birt í alþjóðlegu vísindariti árið 2009 (S. Björnsdóttir o.fl. 2009). Unnið er að ritun greinar um niðurstöðurnar í heild sinni með það að markmiði að birta í alþjóðlega vísindaritinu Extremophiles.

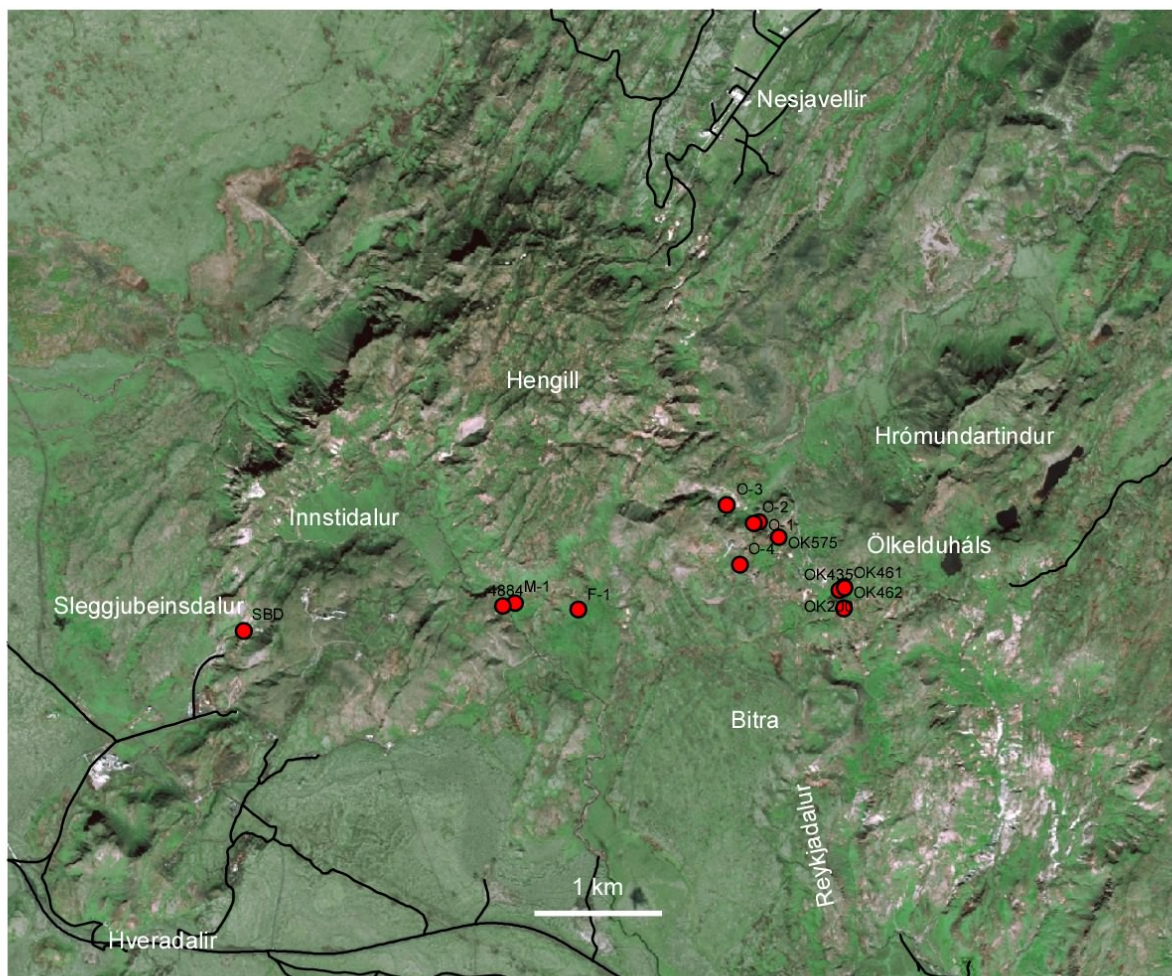
2. Sýnataka og sýnatökustaðir

Val á sýnatökustöðum getur haft úrslitaáhrif á niðurstöður rannsókna. Oft getur slíkt val verið vandkvæðum bundið þar sem heil örveruvistkerfi geta snúist um örlítið uppstreymisop á botni hvers og allt önnur flóra verið ríkjandi í aðeins örfárra cm fjarlægð. Umhverfisfallandar t.d. hitastig frá uppsprettu, styrkur gastegunda og efna eru einnig einkennandi fyrir hverasvæði og oft brattir. Það má því ljóst vera að val á sýnatökustöðum hefur mikið að segja varðandi niðurstöðurnar.

Hér var lögð áhersla á að taka sýni úr sem fjölbreyttustum hveragerðum á háhitasvæðunum sem skoðuð voru innan Rammaáætlunar. Gerð sýna var einnig mismunandi og voru tekin lífmassasýni, jarðvegssýni og vatnssýni. Í einstaka tilvikum var um manngerða sýnatökustaði að ræða s.s. afrennsli frá kæliturnum í orkuverinu í Kröflu.

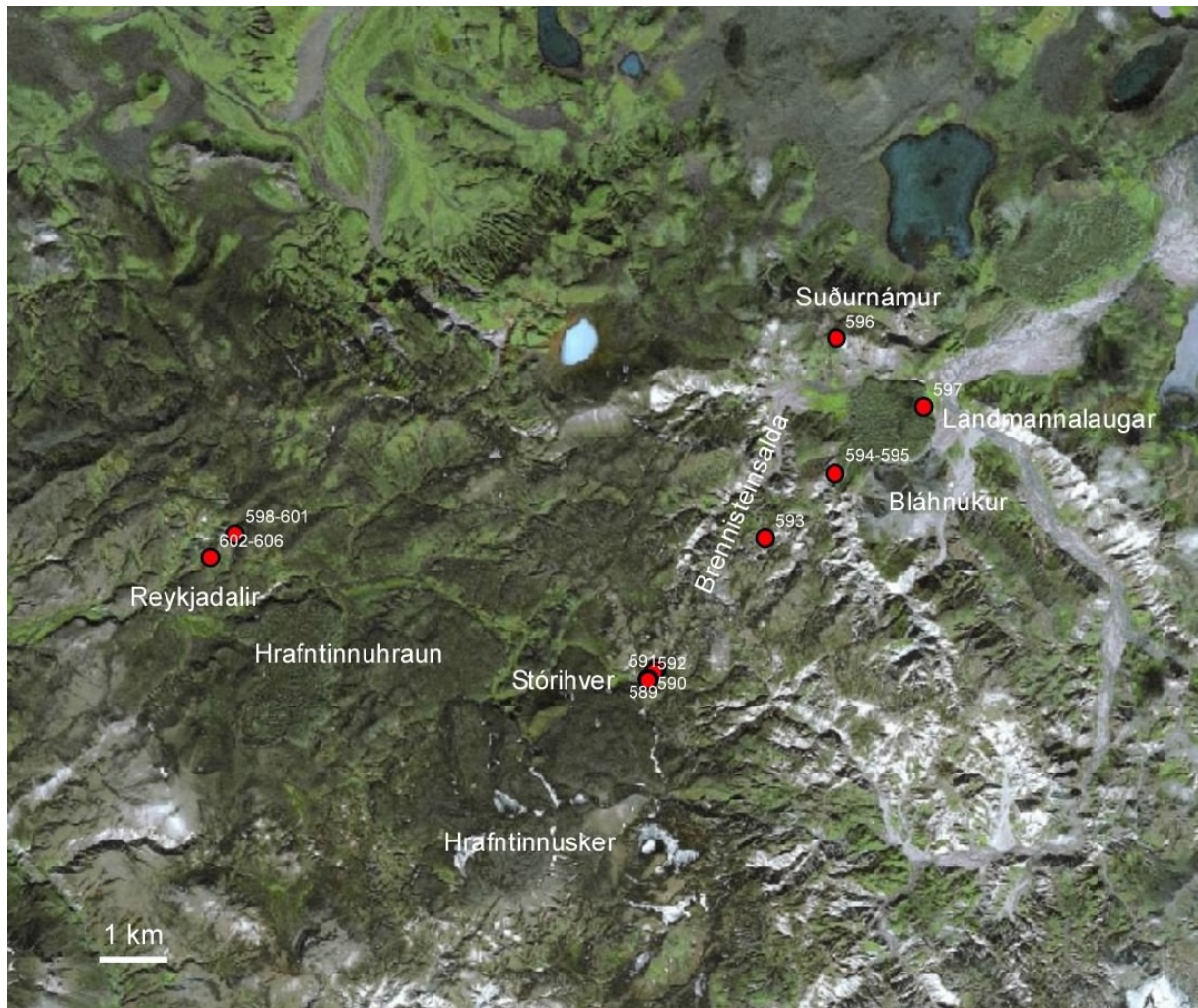
Svæðin sem voru könnuð voru innan Rammaáætlunar voru Hengilssvæðið, þ.m.t. Ölkelduháls, Torfajökulssvæðið, Krísuvík, Krafla / Námafjall og Vonarskarð. Auk þess voru jarðhitasvæðin á Þeistareykjum og í Gjástykki tekin til skoðunar vegna umhverfismats 2008 og voru niðurstöður þaðan teknar með að einhverju leyti í þessari samantekt. Ofangreind svæði eru afar mismunandi að umfangi og fjölbreytileika hveragerða. Ennfremur er afmörkun þeirra oft óljós. Svæðunum sem könnuð voru og undirsvæðum þeirra eða aðliggjandi svæðum er lýst stuttlega hér á eftir:

Hengilssvæðið er tiltölulega stórt og þar finnast fjölbreyttar hveragerðir. Sleggjubeinsdalur, Miðdalur, Fremstidalur, Ölkelduháls, Ölkelduhnúkur, Grændalur, Reykjadalur og Hagavíkurlaugar voru talin til Hengilssvæðisins í þessari umfjöllun (mynd 3). Alls voru tekin 25 sýni og tókst að greina bakteríur og/eða fornbakteríur í 15 þeirra.



Mynd 3. Sýnatökustaðir á Hengilssvæðinu (Kortagerð: Haukur Jóhannesson). Sýni voru einnig tekin í Hagavíkurlaugum og Grændal. (Kortagerð: Haukur Jóhannesson)

Torfajökulssvæðið er gríðarlega yfirgripsmikið jarðhitasvæði með afar fjölbreyttar hveragerðir. Sýni voru tekin úr hverum af svæðinu við Stórahver, Brennisteinsöldu, Landmannalaugum, hverasvæði milli Landmannalauga og Brennisteinsöldu og Reykjadölum vestari (mynd 4). Auk þess voru tekin sýni af hverasvæðinu við Hrafninnusker. Sýni voru hvorki tekin úr Reykjadölum eystri né úr Kerlingafjöllum. Alls voru tekin 20 sýni og tókst að greina bakteríur og/eða fornbakteríur í 14 þeirra.

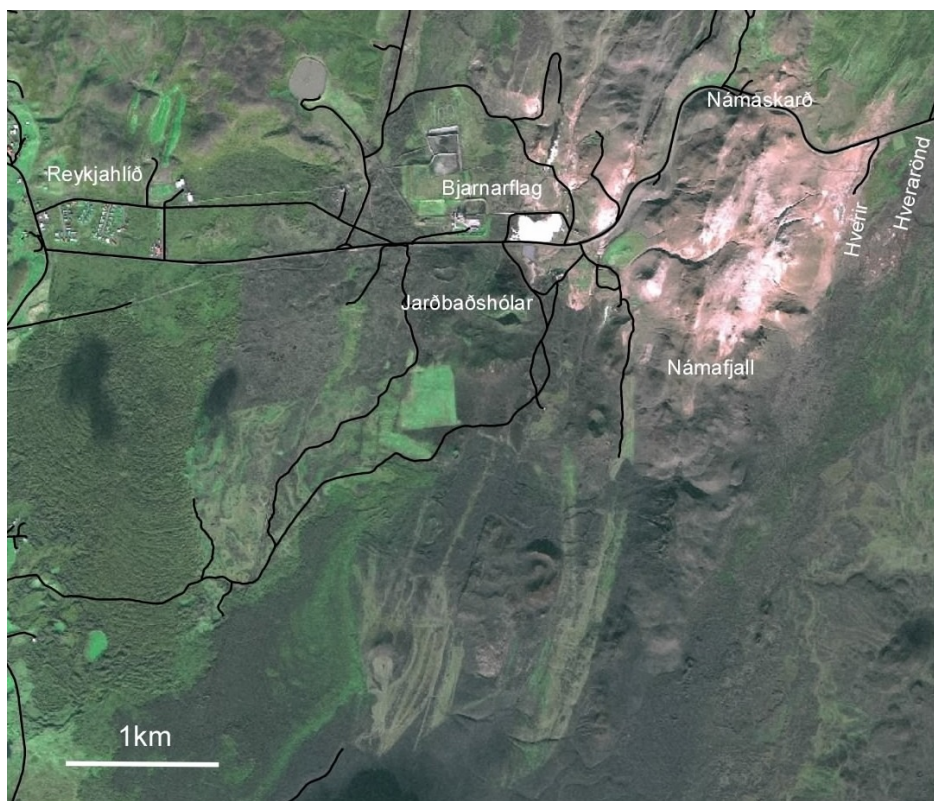


Mynd 4. Rauðu deplarnir tákna sýnatökustaðir á Torfajökulssvæði. Sýni til ræktunar voru einnig tekin úr Hrafninnuskeri. (Kort: Haukur Jóhannesson)

Svæðið Krafla / Námafjall er víðfemt og afar fjölbreytt. Sýni voru tekin úr suðurhlíðum Kröflu, úr afrennislækjum frá Orkuveri, úr Leirhnúki, Námafjalli og Hverum, úr Jarðbaðshólum, Brennisteinsflagi neðan við Jarðbaðshóla og Grjótagjá (myndir 5a og 5b). Alls voru tekin 25 sýni og tókst að greina bakteríur og/eða fornbakteríur í 18 þeirra.



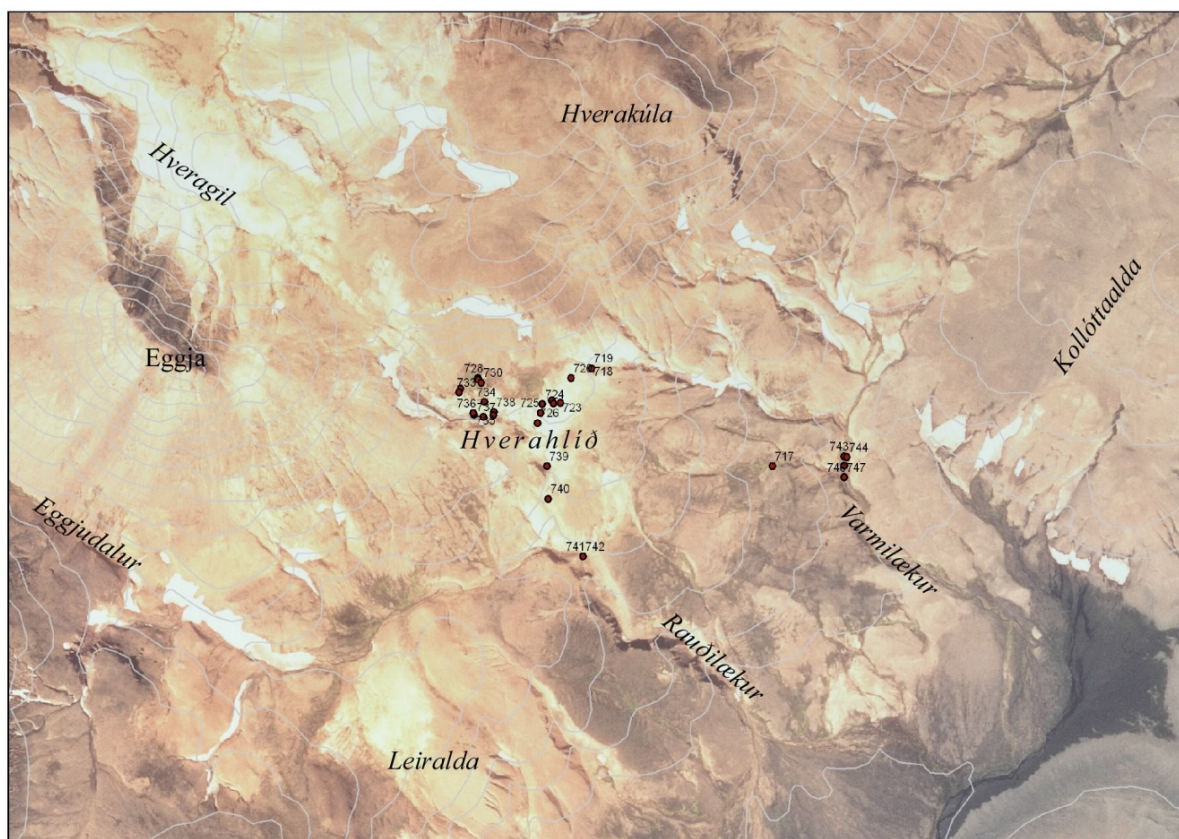
Mynd5a. Sýna-
tökustaðir við
Kröflu. Sýni voru
tekin úr Suður-
hlíðum Kröflu og
af hverasvæðun-
um við Víti og í
Leirhnjúki. Enn-
fremur úr affalls-
lækjum frá Orku-
verinu. (Kort:
Haukur Jóhannes-
son)



Mynd 5b. Sýna-
tökustaðir við
Námafjall. Sýni
voru tekin við
Námafjall, úr
Hverum, Bjarnar-
flagi og Jarðbaðs-
hólum. Ennfremur
úr Grjótagjá. (Kort:
Haukur Jóhannes-
son).

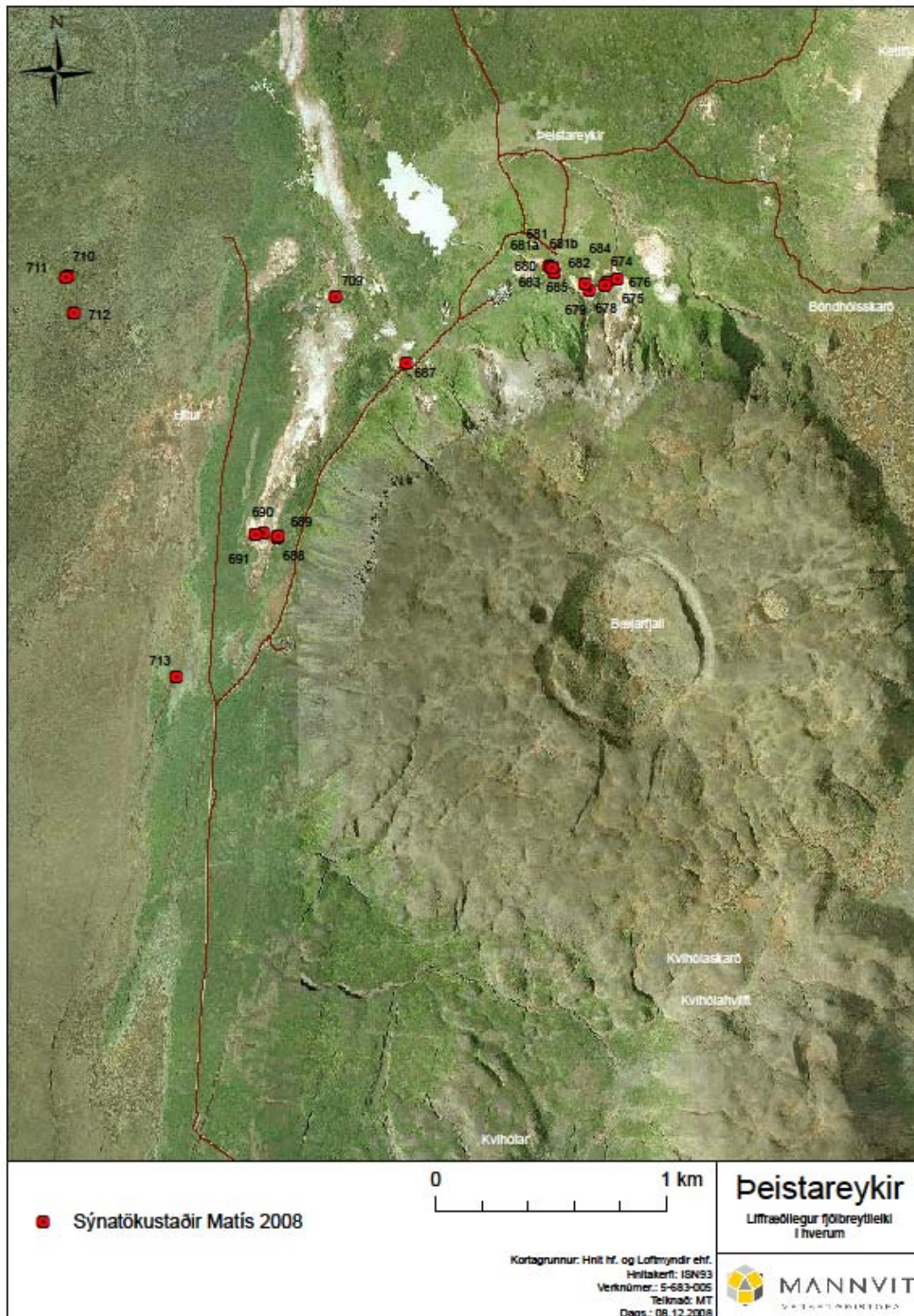
Krísuvíkursvæðið er tiltölulega afmarkað. Í þessari rannsókn voru flest sýni tekin úr súlfíðríkum hverum í Seltúni en einnig úr Austurengjahver. Einnig voru tekin sýni úr hverum á svæðinu við Gunnuhver áður en breytingarnar áttu sér stað. Áætlað er að taka og greina fleiri sýni af svæðinu í tengslum við umhverfismat vegna stækkunar Reykjanesvirkjunar en engin beiðni liggur fyrir enn þar að lútandi. Alls voru tekin 13 sýni úr Krísuvík og Gunnuhver og tókst að greina bakteríur og/eða fornbakteríur í sjö þeirra.

Hverasvæðið í Vonarskarði er afar fjölbreytt en tiltölulega afmarkað. Svæðið sem kannað var innan Rammaáætlunar verkefnisins var svæðið austan Eggju, gufuaugu og leirhverir efst og hverir, lækir og afrennsli hvera neðar, þ.e. Rauðilækur og Varmilækur (mynd 6). Alls voru tekin 32 sýni og tókst að greina bakteríur og/eða fornbakteríur í 26 þeirra.



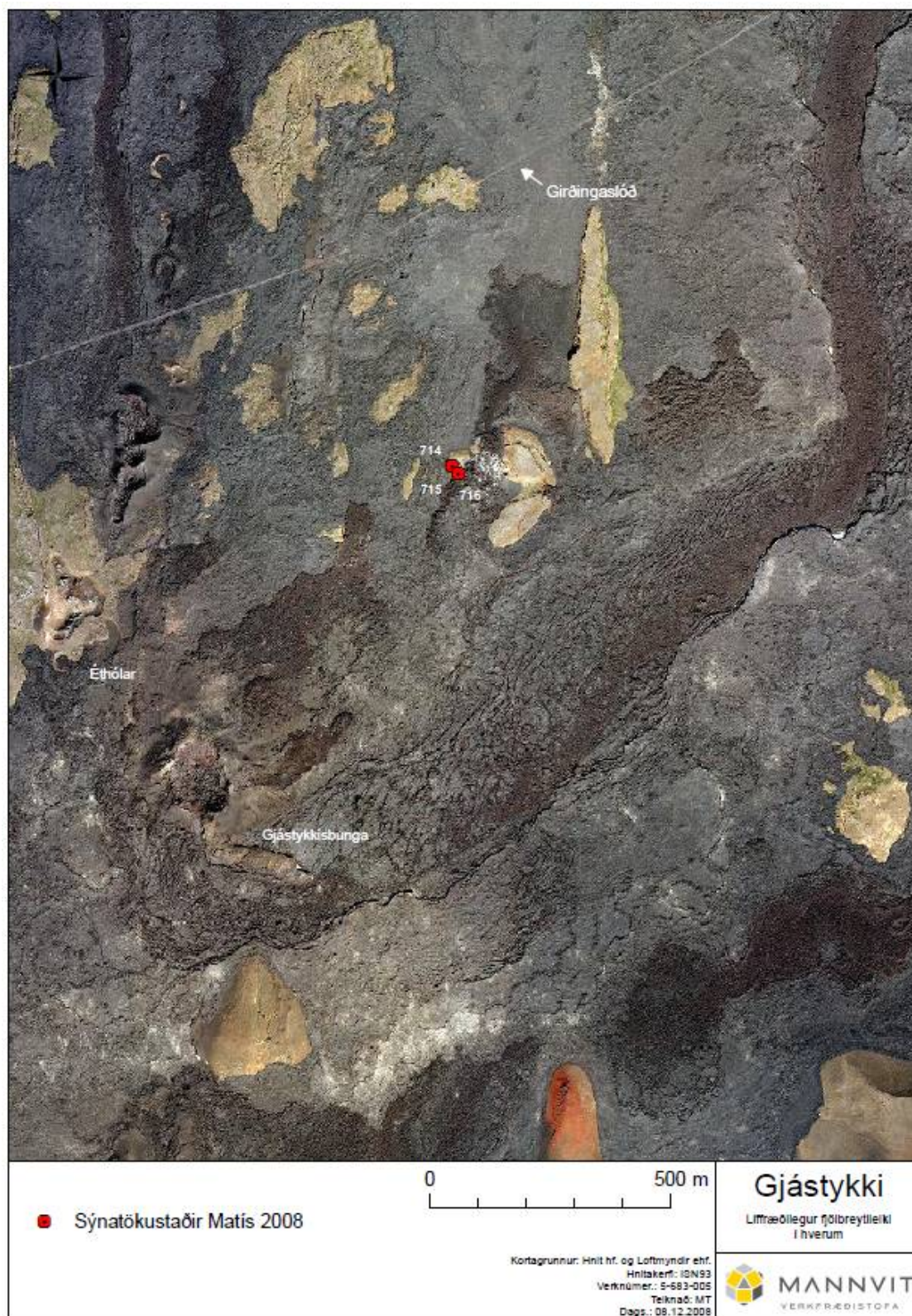
Mynd 6. Sýnatökustaðir í Vonarskarði eru merktir inn á myndina. (Kortagerð: Haukur Jóhannesson).

Mynd 7 sýnir hverasvæðið á Þeistareykjum sem er fremur afmarkað. Þar eru leirhverir algengir ásamt ummyndunum á yfirborði. Í hrauninu eru gufuop ekki ósvipuð þeim sem eru í Jarðbaðshólum.



Mynd 7. Sýnatökustaðir að Þeistareykjum.

Í Gjástykki voru tekin sýni úr hverum á afar litlu svæði inni í hrauninu (mynd 8). Alls voru tekin 27 sýni á þeistareykjum og í Gjástykki og tókst að greina bakteríur og/eða fornbakteríur í 21 sýni.



Mynd 8. Sýnatökustaðir í Gjástykki.

3. Erfðagreiningar

Erfðagreiningaraðferðir þær sem beitt var í rannsóknum á lífríki í hverum vegna Rammaáætlunar einkennast af því að greina tegundasamsetningu baktería í sýnunum án þess að rækta þær fyrst, en þessi aðferð er almennt viðurkennd á alþjóðavísu. DNA er þá einangrað úr sýninu og tegundagreinandi gen baktería og fornbaktería (16SrRNA genið) er magnað upp (PCR) og klónað. Þannig fást fjölmargir klónar sem hver um sig inniheldur 16S rRNA gen úr einni bakteríu. Algengt er að hirða 50-100 klóna úr hverju sýni og raðgreina tegundagreinandi genið úr þeim. Þannig fást 50-100 genaraðir úr hverju sýni og er lengd þeirra 500-700 basapör, en heildarlengd gensins er um 1500 basapör. Þetta er þó jafnan talið nægilega langt til tegundagreiningar. Raðirnar sem fást úr hverju sýni eru flokkaðar og teljast þær sem sýna $\geq 98\%$ einsleitni innbyrðis til sömu tegundar. Til að ákvarða tegundina eða nánasta ættingja hennar er röðin borin saman við sambærilegar raðir í Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) sem hýsir hundruð þúsunda sambærilegra raða og er ómetanlegt tæki við rannsóknir eins og þær sem hér er fjallað um.

Tafla 1 gefur heildaryfirlit yfir sýni og erfðagreiningar sem gerðar voru innan Rammaáætlunar. Misvel gekk að ná DNA úr sýnunum til að nýta í erfðagreiningarnar, en þetta tókst þó í flestum tilvikum að yfirstíga eftir því sem leið á.

Eins og sjá má er fjöldi bakteríu- og fornbakteríugreininga í sýnunum ærið misjafn. Tiltölulega fáir fornbakteríuklónar fengust upp úr sýnunum eins og sjá má. Framan af gekk erfiðlega að einangra gott DNA úr sýnum úr leirhverum og yfirborðsummyndunum og kann það að skýra þetta að e-u leyti. Ennfremur skiluðu fornbakteríuvísar sem notaðir voru framan af ekki viðunandi árangri. DNA einangrunaraðferðirnar voru endurbættar og jafnframt voru fornbakteríuvísarnir endurhannaðir. Þetta skilaði viðunandi árangri við endurteknar greiningar á sýnunum.

Umfjöllun um tegundasamsetningu í einstökum sýnum er að finna í sérstökum skýrslum sem gerðar voru um greiningar á hverju svæði fyrir sig á árunum 2004-2009 (Viggó Þór Marteinson o.fl. 2004; Sólveig K. Pétursdóttir ofl. 2006, 2007, 2008 og 2009).

TAFLA 1. Heildaryfirlit sýna og erfðagreininga

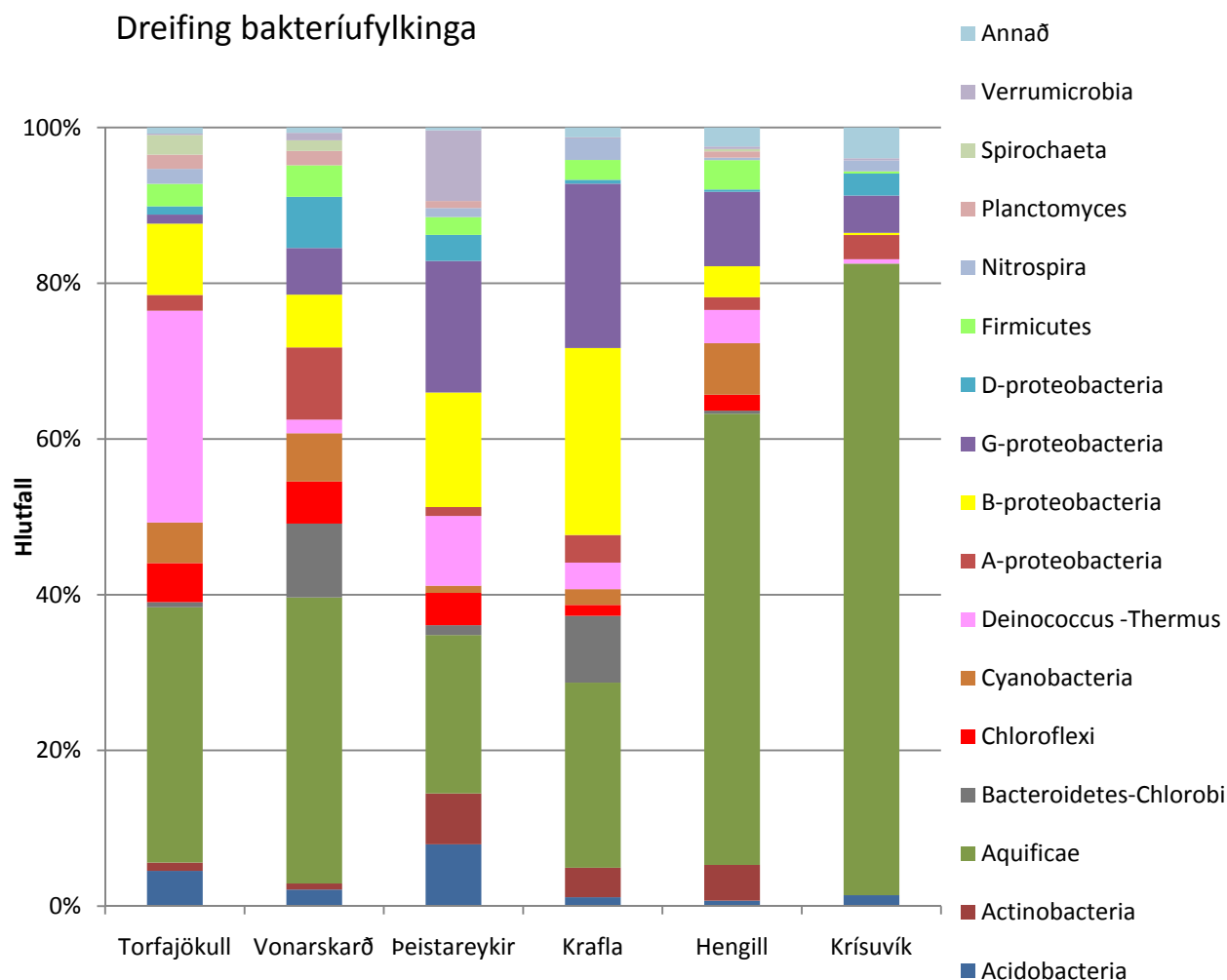
Svæði	Fj. sýna	Fj. erfða-greindra sýna	Fjöldi bakteríu-greininga ^{a)}	Fjöldi bakteríu-tegunda	Fjöldi fornbakteríu-greininga ^{b)}	Fjöldi fornbakteríu-tegunda
Hengill	25	15	975	107	105	11
Torfajökull	20	14	996	156	37	12
Krísuvík/ Gunnhver	13	7	356	24	129	4
Krafla	25	18	791	122	135	13
Vonarskarð	32	26	600	119	155	19
Þeistareykir / Gjástykki	27	21	706	138	445	25
ALLS	115	80	4424		1006	

^{a)}Raðgreiningar á tegundagreinandi 16S rRNA geni baktería; ^{b)} Raðgreiningar á tegundagreinandi 16S rRNA geni fornbaktería

3.1 Dreifing bakteríufylkinga

Mynd 9 sýnir hlutfallslega dreifingu bakteríufylkinga milli einstakra jarðhitasvæða. Hafa ber í huga að innan hvers svæðis er að finna fjölmargar hveragerðir þar sem hitastig, sýrustig, uppleyst efni og gös eru mismunandi og endurspeglast þetta í samsetningu flórunnar. Myndin gefur grófa flokkun í fylkingar en fjölmargar tegundir finnast innan hvers fylkingar. Sextán bakteríufylkingar sjást á myndinni og enn fremur flokkurinn „annað“ sem inniheldur tegundir sem fundust afar sjaldan og e.t.v. aðeins á einu svæði og flokkast til annarra fylkinga en fyrrgreindra 16. Krísuvíkursúlan lengst til hægri inniheldur fæstar fylkingar enda voru greiningar fæstar úr Krísuvík og sýnin fremur einsleit.

Fylkingin *Aquificae* finnst í háu hlutfalli á öllum svæðum eins og mynd 9 ber með sér. Það kemur þó ekki verulega á óvart þar sem tegundir innan hennar eru frumbjarga og geta nýtt sér súlfíð (H_2S) og vetni (H_2) til orkuvinnslu og CO_2 sem kolefnisgjafa en þessi efni eru einmitt einkennandi fyrir háhitasvæði (Eder og Huber 2002). *Aquificae* er sérlega áberandi í Krísuvík eins og sjá má af mynd 9, en það skýrist einkum af einsleitni sýna frá þessu svæði, sem komu flest úr súlfíðríkum leirhverum í Seltúni.



Mynd 9. Hlutfallsleg dreifing bakteríufylkinga á sex jarðhitasvæðum sem rannsökuð voru.

Af öðrum fylkingum sem finnast í umtalsverðum mæli á öllum svæðum má nefna *Deinococcus-Thermus*, β -*proteobakteríur* og γ -*proteobakteríur*. Tegundir sem fundust innan þessara fylkinga eru flestar hverjar dæmigerðar fyrir jarðhitasvæði, en ýmist frumbjarga eða ófrumbjarga. Athygli vakti að afar margar *Thermus* bakteríur fundust á Torfajökulssvæðinu, m.a. ein ný tegund *Thermus islandicus* sem var lýst í alþjóðlegu vísindariti (Björnsdóttir, S. o.fl. 2009). *Thermus* tegundir finnast víða en einstakar tegundir þeirra virðast oftast bundnar ákveðnum svæðum á jarðarkringlunni en flestar þeirra finnast þó hér á landi.

β -*proteobakteríur* geta margar hverjar nýtt sér brennistein og brennisteinssambönd. Tegundir innan þessarar undirfylkingar *Proteobaktería* eru því algengar á hverasvæðum.

Fjölmargar þeirra fundust í sýnum úr Kröflu. Sömu sögu er að segja um *γ-proteobakteríur* sem fundust í umtalsverðu magni í Kröflu og að Þeistareykjum. *Firmicutes* tegundir fundust í nokkru magni á allflestum sýnum, en þessar tegundir eru margar hverjar loftfælnar og finnast því síður á yfirborði.

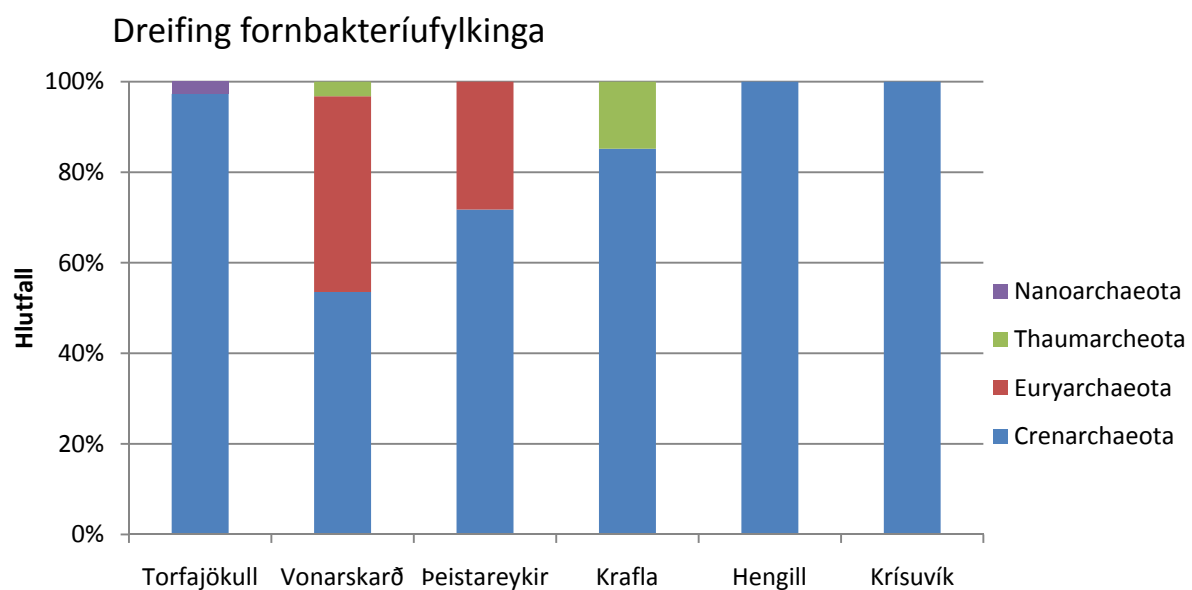
3.2 Dreifing fornbakteríufylkinga

Ríki fornbaktería innihélt lengst af tvær aðalfylkingar þ.e. *Euryarchaeota* og *Crenarchaeota* (Woese og Fox 1977; Pace 2009). Innan *Euryarchaeota* eru afar fjölbreyttar tegundir hvað varðar form, efnaskipti og búsvæði, s.s. methanmyndandi, ofursaltkærar, hitasýrukærar og súlfat-afoxandi örverur (Ludwig og Klenk 2005). Fjölbreytileiki innan *Crenarchaeota* er ekki eins mikill og var löngum talið að innan hópsins væru einvörðungu háhitakærar tegundir sem gætu allflestar nýtt sér brennistein (Burggraf o.fl. 1997). Skipting fornbaktería í þessar tvær fylkingar var einkum byggð á 16S og 23S rRNA raðgreiningum og ennfrems á raðgreiningum á próteinum (Ludwig og Klenk 2005). Eftir því sem sameindalíffræðilegri nálgun óx fiskur um hrygg fóru smám saman að koma fram vísbendingar um fjarskylda hópa fornbaktería, -fylkingar sem hlutu opinbera staðfestingu, þ.e. *Korarchaeota* (Reysenbach o.fl. 2000) *Nanoarchaeota* (Huber o.fl. 2002) og nú síðast *Thaumarchaeota* (Brochier-Armanet o.fl. 2008a). Sú síðastnefnda var framan af talin innihalda einungis miðlungshitakærar tegundir úr sjó en síðar kom á daginn að hún hefur fundist í hverum t.d. í Rússlandi þar sem um er að ræða hitakæra tegund sem getur oxað ammoniak (Spang o.fl. 2010). Fylking *Thaumarchaeota* hefur einnig fundist í söltum jarðvegi í Mexíkó og ennfrems í Japan.

Margar tegundir fornbaktería eru frumbjarga og geta ýmist nýtt sér brennistein og brennisteinssambönd, vetni, metan og CO₂ til orkuöflunar og sem kolefnisgjafa, en ýmsar eru ófrumbjarga og þurfa þá lífrænt efni sér til viðurværis og orkuöflunar.

Mynd 10. sýnir hlutfallslega dreifingu fornbakteríufylkinga sem fundust í sýnum sem tekin voru á háhitasvæðunum sex, en þær flokkuðust aðallega til fylkinga *Crenarchaeota* og *Euryarchaeota*, ennfrems til *Thaumarchaeota* og ein fornbakteríutebund af Torfajökulssvæðinu flokkaðist til *Nanoarchaeota*. Langflestar tegundirnar flokkuðust til *Crenarchaeota* og fundust í öllum sýnum. Á tveimur svæðum, þ.e. á Hengilssvæði og í

Krísuvík fundust einungis *Crenarchaeota* tegundir. *Euryarchaeota* tegundir fundust einungis í Vonarskarði og á Þeistareykjum. *Thaumarchaeota* tegundir fundust eingöngu í Vonarskarði og Kröflu, en þessi fylking fornbaktería var uppgötvuð tiltölulega nýlega (Brochier-Armanet o.fl 2008). Sem fyrr segir er algengt er að tegundir innan fylkingarinnar séu af sjávaruppruna, en þær hafa þó einnig fundist í landhverum m.a. í Rússlandi við tiltölulega lágt hitastig, en það kemur einmitt ágætlega heim og saman við sýnatökustaði í Jarðbaðshólum, hitastig 55-56°C, og í Varmalæk í Vonarskarði þar sem hitastigið mældist 52-54°C.



Mynd 10. Hlutfallsleg dreifing fornbakteríufylkinga á sex jarðhitasvæðum sem rannsökuð voru.

4. Líffræðilegur fjölbreytileiki

Við mat á líffræðilegum fjölbreytileika á svæðunum sem könnuð voru var einkum var byggt á niðurstöðum úr bakteríugreiningum þar sem þær voru mun fleiri en fornbakteríugreiningarnar og náðust úr mun fleiri sýnum og því marktækari. Niðurstöður voru teknar saman og líffræðilegur fjölbreytileiki metinn á hverju svæði með tölfræðilegum aðferðum, s.s. söfnunarkúrfum og útreikningi á Shannon stuðli (H). Svæðunum var svo raðað í samræmi við niðurstöður.

4.1 Líffræðilegur fjölbreytileiki - Shannon

Ýmsar aðferðir eru nýttar til að reikna út líffræðilegan fjölbreytileika í sýnum en líffræðilegur fjölbreytileikastuðull Shannons – „H“ er einna mest notaður og fæst með jöfnunni:

$$H' = - \sum_{i=1}^S p_i \ln p_i - [(S-1)/2N]$$

Þar sem S = fjöldi tegunda, n_i = fjöldi einstaklinga (raða) innan tegundar, N = heildarfjöldi, og p_i = hlutfall hvernar tegundar reiknað út frá n_i / N . Þessi stuðull var notaður til að meta líffræðilegan fjölbreytileika baktería á háhitasvæðunum sex og sýnir tafla 2 niðurstöðurnar.

TAFLA 2. Líffræðilegur fjölbreytileiki baktería á fimm mismunandi háhitasvæðum

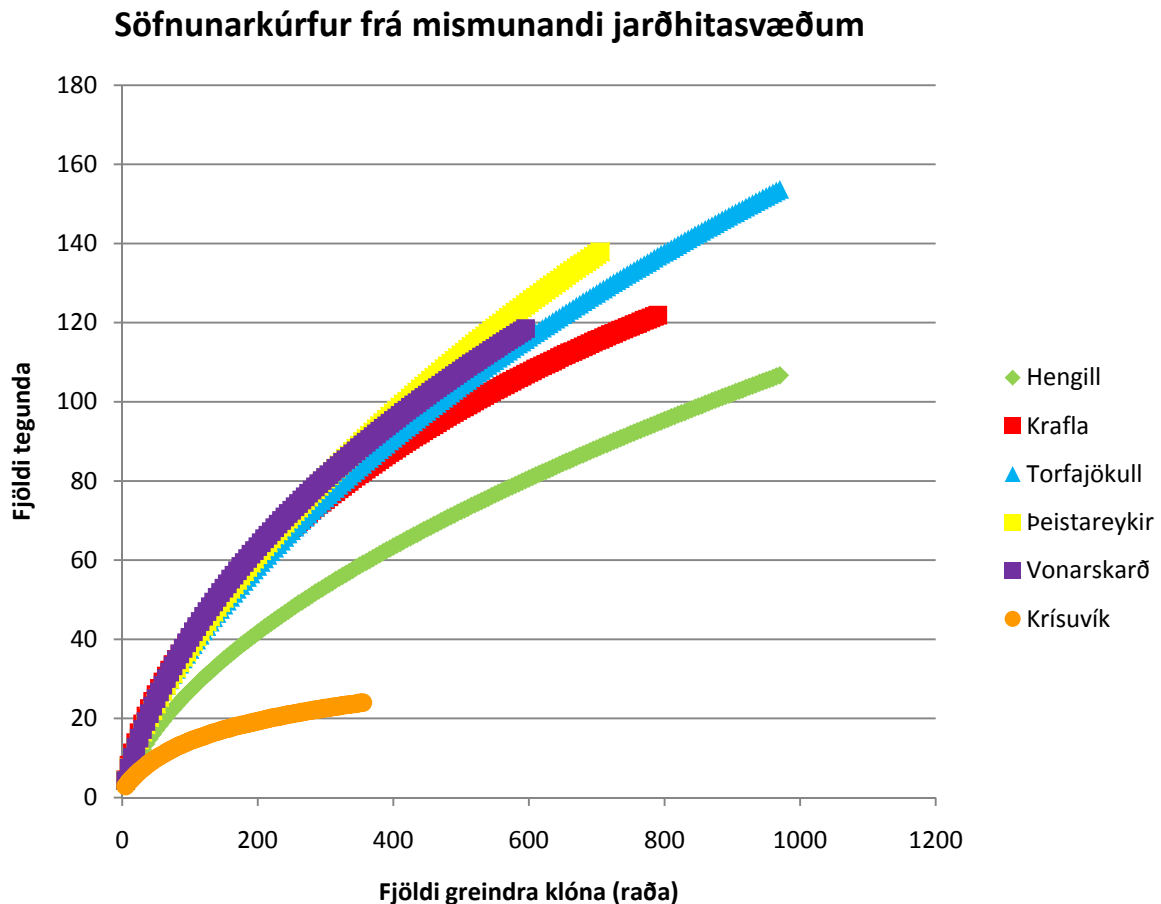
Svæði	N	S	H	Röðun ^{a)}
Krafla	791	122	3,59	1
Torfajökull	996	156	3,43	2
Vonarskarð	600	119	3,36	3
Þeistareykir	706	138	3,35	4
Hengill	975	107	2,66	5
Krísuvík	356	24	1,63	6

^{a)}Röðun byggð á útreiknuðu gildi fyrir líffræðilegan fjölbreytileika þ.e. „H“ í dálkinum á undan.

Samkvæmt töflunni er líffræðilegur fjölbreytileiki svipaður í Kröflu, Torfajökulssvæði, Vonarskarði og Þeistareykjum þar sem sáralitlu munar á útreiknuðum fjölbreytileika (H). Það kom hins vegar nokkuð á óvart að Hengilssvæðið skyldi ekki ná hærri gildi en raun ber vitni, þar sem þar er að finna mjög fjölbreytt búsvæði örvera. Krísuvík lenti lægst á listanum sem kom ekki á óvart þar sem sýni þaðan voru fremur einsleit.

4.2 Líffræðilegur fjölbreytileiki – söfununarkúrfur

Annar mælikvarði á líffræðilegan fjölbreytileika eru svokallaðar „rarefaction“ kúrfur eða söfnunarkúrfur. Slíkar kúrfur gefa til kynna líkurnar á því hvort fleiri tegundir finnast í sýni með því að greina fleiri klóna (raðir) (mynd 11). Þær eru því líka allgóður mælikvarði á fjölbreytileika.



Mynd 11. Samanburður á jarðhitasvæðum. Söfnunarkúrfur. Skýringar á uppruna klóna eru gefnar til hliðar.

Mynd 11 sýnir söfnunarkúrfur sem gerðar voru fyrir sýnin af háhitasvæðunum sex og eru byggðar á sömu gögnum og útreikningar á fjölbreytileikastuðli (H) hér að framan. Eins og sjá má eru kúrfurnar fyrir Vonarskarð, Torfajökulssvæði og Þeistareyki brattastar og eru enn á uppleið sem gefur til kynna að ef fleiri klónar væru greindir væru talsverðir möguleikar á að finna enn fleiri nýjar tegundir. Fjölbreytileikinn telst því mestur á þessum hverasvæðum en Krafla fylgir fast í kjölfarið. Hengilssvæðið liggur talsvert neðar. Eins og vænta mátti liggur kúrfan fyrir Krísuvík neðst og stefnir í lárétta línu sem gefur til kynna að ef fleiri klónar væru greindir úr sýnunum væru hverfandi líkur á að finna nýjar tegundir. Röðun svæða eftir fjölbreytileika út frá niðurstöðum söfnunarkúrfa fyrir einstök svæði verður þá: 1-3 Þeistareykir, Vonarskarð, Torfajökull; 4 Krafla; 5 Hengill; 6 Krísuvík.

Niðurstöðurnar fyrir söfnunarkúrfur staðfesta því nánast að öllu leyti niðurstöður fyrir fjölbreytileikastuðul (H) hér að framan, þannig að röðunin verður sú sama. Niðurstöðurnar gefa einnig til kynna að ef fleiri sýni hefðu verið tekin og greind hefðu fengist fleiri tegundir í öllum tilvikum nema í Krísuvík.

5. Líffræðileg sérstaða

Þegar meta á líffræðilega sérstöðu hverasvæða er nokkur vandi á höndum. Sú leið sem hér var valin var sú að ganga út frá „fágætum“ tegundum sem fundust í verkefninu. „Fágæti“ var þá miðað við skyldleika eða einsleitni $\leq 96\%$ við nánasta ættingja í GenBank. Ennfremur var athugað hvort fágætar tegundir væru bundnar ákveðnum hverasvæðum.

Almennt er miðað við að skyldleiki eða einsleitni raða sem miðast við $\leq 98\%$ greini tegundir að. Ennfremur að skyldleiki $\leq 95\%$ bendi til þess að um nýja ættkvísl sé að ræða, en sú viðmiðun er þó umdeild og á reiki. Samröðun var gerð á öllum tegundagreinandi genum (16S rRNA genum) sem greind voru af hverju svæði. Í framhaldinu voru skyldleikatré búin til fyrir allar fylkingar sem fundust á hverju svæði. Þessi skyldleikatré voru birt í skýrslum fyrir hvert svæði sem var rannsakað innan Rammaáætlunar (Viggó Þór Marteinnsson o.fl. 2004; Sólveig Pétursdóttir o.fl. 2006-2009). Ofangreind skyldleikatré nýttust sem vísbending um fágætar tegundir. Ennfremur var stuðst við erfðagreiningartöflur úr ofangreindum skýrslum.

5.1 Fágætar tegundir á hverasvæðunum sex

Tegundir sem mynduðu stakar greinar í skyldleikatrjám sem birt voru í fyrrgreindum skýrslum fyrir hvert svæði (Viggó Þór Marteinnsson o.fl. 2004; Sólveig Pétursdóttir o.fl. 2006-2009) voru skoðaðar nánar þar sem þær bentu til þess að um sjaldgæfar eða áður óþekktar tegundir eða ættkvíslir gæti verið að ræða. Ákveðið var að setja eftirfarandi skilyrði fyrir „fágæta“ tegund:

- Að tegundin innihéldi >1 röð eða klón, þar sem líkur á að um tilfallandi tegund væri að ræða væri minni ef hún fyndist í fleiri eintökum, - fleiri eintök væru því til staðfestingar á tilvist hennar.
- Að hún sýndi $\leq 96\%$ skyldleika við nánasta ættingja í Genbank.

Þessi skilyrði eru tiltölulega ströng þar sem tilvist tegundar er í raun staðfest með einni röð eða klón og enn fremur er almennt tegundaviðmið $\leq 98\%$ einsleitni eða samsvörun milli raða. Hér voru því settar strangari kröfur en almennt gilda.

Allar tegundir sem fengu stöðuna „fágæt“ í skýrsludrögum fyrir Heildarsamantekt vegna Rammaáætlunar (sem var skilað í byrjun árs 2010) voru endurmetnar fyrir núverandi skýrslu með endurteknum samanburði við sambærilegar raðir í Genbank. Þetta þótti nauðsynlegt í ljósi þess að innihald Genbank er síbreytilegt þar sem sífelld finnast nýjar tegundir víðsvegar um heiminn. Við endurmatið kom í ljós að „fágætum“ tegundum innan Rammaáætlunar verkefnisins fækkaði allnokkuð við þetta og enn fremur að skyldleikaprósentan hækkaði í mörgum tilvikum, þar sem nýr og nánari ættingi hafði fundist.

Tölur 3-8 sýna fágætar tegundir eða ættkvíslir af hverju svæði fyrir sig þar sem miðað var við ofangreind skilyrði um fjölda innan raðar (>1) og raðasamsvörun $\leq 96\%$. Skilyrði fyrir „ný ættkvísl“ voru þó sett við $\leq 93\%$, en ekki $\leq 95\%$ eins og almennt er talið.

Tafla 3 sýnir að fágætar tegundir á Hengilssvæði fundust einkum í sýnum úr Sleggjubeinsdal og af Ölkelduhálsi. Tvær nýjar ættkvíslir innan *Chloroflexi-Firmicutes* fundust í sýnunum, önnur fannst bæði á Ölkelduhálsi og í Sleggjubeinsdal, en tegundin er aðeins 89% skyld

TAFLA 3. Fágætar tegundir baktería og fornbaktería á Hengilssvæði

Ríki	Fylking	Tegund nr. ¹⁾	Uppruni	T°C	pH	Skyldleiki Genbank	Athugasemdir
Bakteríur	Acidobacteria	17-SBD-2	Sleggjubeinsdalur	60	6.3	92%	Ný ættkvísl
		6-O3-3	Ölkelduháls	55	6.0	96%	
	Actinobacteria	7-O3-8	Ölkelduháls	55	6.0	94%	
	Chloroflexi-Firmicutes	13-O3-2	Ölkelduháls	55	6.0	93%	Ný ættkvísl
		7-SBD-1 8-O3-7	Sleggjubeinsdalur Ölkelduháls	60 55	6.3 6.0	89%	Ný ættkvísl
	Planctomycetes	21-SBD-2	Sleggjubeinsdalur	60	6.3	91%	Ný ættkvísl
Fornbakteríur	β -Proteobacteria	6-O1-2	Ölkelduháls	46	7.4	96%	
	Crenarchaeota	641-10-1	Ölkelduháls	77	5.0	94%	
		641-5-2 641-7-2	Ölkelduháls Ölkelduháls	77 77	5.0 5.0	93% 94%	Ný ættkvísl

Miðað er við að skyldleiki $\leq 93\%$ bendi til að um nýja ættkvísl sé að ræða.¹⁾ Síðasti tölustafurinn í tegundarnúmeri sýnir fjölda klóna eða raða innan hvernar raðar.

nánasta ættingja í Genbank (tafla 3, mynd 14). Nokkrar stakar fágætar tegundir, með aðeins einn fulltrúa fundust í sýnunum, m.a. af fylkingu *Bacteroidetes* / *Chlorobi*, fundust í verkefninu en þær sjást aðeins í viðeigandi skyldleikatré (mynd 13). Þrjár nýjar tegundir innan fylkingar *Crenarchaeota* fundust í sama sýni af Ölkelduhálsi (tafla 3, mynd 15). Af 10 fágætum tegundum sem fundust á Hengilssvæðinu voru fimm fulltrúar fyrir nýjar ættkvíslir.

Í töflu 4 sést að í Krísuvík fannst ein fágæt tegund *δ-Proteobaktería* í nokkrum eintökum á þremur sýnatökustöðum á svæðinu. Brennisteinsefnaskipti eru algeng meðal tegunda innan fylkingarinnar og líf í súlfíðríkum hver hentar því að öllum líkindum ágætlega.

TAFLA 4. Fágætar tegundir baktería í Krísuvík

Ríki	Fylking	Röð nr. ¹⁾	Uppruni	T°C	pH	Skyldleiki Genbank	Athugasemdir
	<i>δ-Proteobacteria</i>	K1-3-3 K3-6-1 K4-7-3	Seltún súlfíðríkur leirhver	55 57-60 53-54	5.5-6 6 5.5-6	94%	

Miðað er við að skyldleiki ≤93% bendi til að um nýja ættkvísl sé að ræða. ¹⁾Síðasti tölustafurinn í raðarnúmeri sýnir fjölda klóna eða raða innan hversrar raðar.

Í töflu 5 sést að fágætar tegundir af svæðunum Krafla / Námafjall koma flestar úr gufuaugum úr Jarðbaðshólum. Þar má nefna nýja ættkvísl innan *Actinobacteria*, en fleiri fulltrúar tegundarinnar fundust í sýnum frá Þeistareykjum og Gjástykki (mynd 12).

TAFLA 5. Fágætar tegundir baktería af svæðinu Krafla / Námafjall

Ríki	Fylking	Röð nr. ¹⁾	Uppruni	T°C	pH	Skyldleiki Genbank	Athugasemdir
Bakteriur	<i>Acidobacteria</i>	JB-8-2 JB5-9-1	Jarðbaðshólar	35-55	4-5	95%	
	<i>Actinobacteria</i>	JB1-12-3	Jarðbaðshólar	56	5-6	89%	Ný ættkvísl
	<i>Chloroflexi-Firmicutes</i>	JB5-4-6	Jarðbaðshólar	35-55	4-5	89%	Ný ættkvísl
		693-5-2	Leirhnúkur	78,2	3	94%	
		JB1-10-2	Jarðbaðshólar	56	5-6	95%	
		JB1-9-2	Jarðbaðshólar	56	5-6	86%	Ný ættkvísl
		JB5-6-4	Jarðbaðshólar	35-55	4-5	90%	Ný ættkvísl
	<i>Deinococcus - Thermus</i>	L2-8-2	Affallslækur í Kröflu	65	8.5-9	96%	
		L2-6-3	Affallslækur Kröflu	65	8.5-9	98%	Skyldleiki við <i>Thermus aquaticus</i> ?
	<i>γ-Proteobacteria</i>	L5-12-2 L4-10-1	Affallslækur í Kröflu	43 41	8-9 8-9	96%	
	<i>β-Proteobacteria</i>	L4-9-2	Affallslækur Kröflu	41	8-9	93%	Ný ættkvísl
	<i>Gemmatimonadetes</i>	JB1-6-2	Jarðbaðshólar	56	5-6	92%	Ný ættkvísl
		JB1-4-2	Jarðbaðshólar	56	5-6	90%	Ný ættkvísl
	<i>OP-10 Cand division</i>	693-6-3	Leirhnúkur	78,2	3	96%	

Miðað er við að skyldleiki ≤93% bendi til að um nýja ættkvísl sé að ræða. ¹⁾Síðasti tölustafurinn í raðarnúmeri sýnir fjölda klóna eða raða innan hversrar raðar.

Nokkrar nýjar tegundir innan *Chloroflexi Firmicutes* eru einnig áberandi, en ein þeirra fannst í Leirhnúk. Ennfremur finnast sérstakar tegundir í affallslæk frá orkuverinu í Kröflu, en sýrustigið í læknum er 8.5-9.

Í sýni úr Leirhnúk fannst einnig tegund sem flokkast til OP-10 fylkingarinnar sem enn hefur ekki hlotið nafn en fannst fyrst í Obsidian Pool í Yellowstone þjóðgarðinum í Bandaríkjunum. Af 13 nýjum tegundum í Kröflu / Námafjallssýnum eru 7 fulltrúar nýrra ættkvísla.

TAFLA 6. Fágætar tegundir baktería og fornbaktería á Torfajökulssvæði

Ríki	Fylking	Röð nr. ¹⁾	Uppruni	T°C	pH	Skýldleiki Genbank	Athugasemdir
Bakteríur	<i>Acidobacteria</i>	7-603-2	Reykjadalir	62	4.5	95%	
		18-588-2	Stórhver	43,2	5.0	92%	Ný ættkvísl
		4-605-8	Reykjadalir	47-65	6.0	96%	
		6-594-5	Brennisteinsalda	55-60	5.5-6		
		15-588-2	Stórhver	43,2	5.0	92%	Ný ættkvísl
	<i>Cyanobacteria</i>	5-603-3	Reykjadalir	62	4.5	94%	
	<i>Chloroflexi-Firmicutes</i>	15-592-1	Stórhver	94	3.5	92%	
		21-592-1	Stórhver	94	3.5		
		4-592-3	Stórhver	94	3.5		Ný ættkvísl
		15-600-1	Reykjadalir	45-50	5-5.5		
		10-603-1	Reykjadalir	62	4.5	90%	
		4-603-10	Reykjadalir	62	4.5		
		2-591-5	Stórhver	70	5.0		Ný ættkvísl
		34-588-1	Stórhver	43,2	5.0		
		3-595-1	Brennisteinsalda	69	5.0	90%	
		17-594-1	gufaugu	55-60	5.5-6		Ný ættkvísl
		12-600-2	Reykjadalir	45-50	5-5.5	92%	Ný ættkvísl
		5-600-2					
		37-600-1	Reykjadalir	45-50	5-5.5	91%	Ný ættkvísl
		40-600-1					
		7-591-2	Stórhver	70	4.5-5	92%	Ný ættkvísl
		8-591-2	Stórhver	70	4.5-5	93%	Ný ættkvísl
	<i>Deinococcus / Thermus</i>	605	Reykjadalir Stórhver	47-65	6.0	96%	<i>Thermus islandicus</i> úr Reykjadölum, fannst einnig í Stórahver
		1-600-18	Reykjadalir	45-50	5-5.5	96%	
		7-597-1	Brennisteinsalda	47-58	6.5		<i>Meiothermus</i>
		2-594-7	Brennisteinsalda	55-60	5.5-6		
		10-594-2	Brennisteinsalda	55-60	5.5-6	92%	Ný ættkvísl
		5-588-4	Stórhver	43,2	5.0	94%	
		9-588-6					
		13-588-2	Stórhver	43,2	5.0	93%	Ný ættkvísl
		10-588-2					
	<i>δ-Proteobacteria</i>	16-588-2	Stórhver	43,2	5.0	92%	Ný ættkvísl
	<i>ε-Proteobacteria</i>	8-588-2	Stórhver	43,2	5.0	95%	
	<i>Planctomycetes</i>	6-592-4	Stórhver	94	3.5	94%	
		8-592-2	Stórhver	94	3.5	92%	Ný ættkvísl
	OP-10 Cand div	6-591-5	Stórhver	70	4.5-5	95%	
Fornbakteríur	<i>Nanoarchaeota</i>	598-12-1	Brennisteinsalda	94	6.5-7	92%	Sjaldgæf fylking

Miðað er við að skyldleiki $\leq 93\%$ bendi til að um nýja ættkvísl sé að ræða. ¹⁾ Síðasti tölustafurinn í raðarnúmeri sýnir fjölda klóna eða raða innan hversrar raðar.

Tafla 6 sýnir að af 23 sjaldgæfum tegundum sem fundust í sýnum á Torfajökulssvæðinu voru 13 sem telja má fulltrúa nýrra ættkvísla. Sumar tegundir fundust í fleiri en einum hver, en flestar fágætar tegundir fundust á hverasvæðum í Reykjadölum og einnig á svæðinu við Stórahver. Fulltrúar sjö nýrra ættkvísla innan fylkingar *Chloroflexi-Firmicutes* fundust í sýnum úr Reykjadölum, Stórahver og Brennisteinsöldu. Nokkrar nýjar tegundir innan *Deinococcus-Thermus* fundust í sýnunum, en þar voru aðallega *Meiothermus* tegundir á ferð, en þær eru algengari við lægri hitastig. Fulltrúi fornbakteríufylkingarinnar *Nanoarchaota* fannst í sýni sem tekið var úr Brennisteinsöldu, - en fulltrúar þessarar fylkingar eru afar fáséðir og telst því merkilegur fundur, þrátt fyrir að einungis væri um staka röð að ræða.

TAFLA 7. Fágætar tegundir baktería og fornbaktería úr Vonarskarði

Ríki	Fylking	Röð nr. ¹⁾	Uppruni	T°C	pH	Skyldleiki Genbank	Athugasemdir			
Bakteríur	Aquificae	737-10-1	Vestara svæði	45,1	3.8	91-93%	Ný ættkvísl			
		737-13-1								
		737-12-1								
		736-18-2								
		730-4-1	Vestara svæði	49,8	4.9	94%	Ný ættkvísl?			
		730-10-1		64,5	4.7	93%				
		736-14-1		64,5	4.7	96%				
		Bacteroidetes – Chlorobi		736-9-3	Vestara svæði	64,5		4.7	90%	Ný ættkvísl
735-1-4	41		3.4							
731-13-1	41,7		3.4							
	734-16-1		Vestara svæði	40,3		5.8	93%	Ný ættkvísl		
	734-21-1									
	738-6-1	42		3,7						
	Chloroflexi-Firmicutes	A734-4-3		Vestara svæði	40,3	5.8			91%	Ný ættkvísl
A744-7-11		Varmilækur	36,6	7.3	90%	Ný ættkvísl				
A747-1-3		Varmilækur	39	7.3	93%	Ný ættkvísl				
		738b-2-16	Vestara svæði	42	3.7	92%	Ný ættkvísl			
	732-10-3	35,7		3.2						
	735-4-1	41		3.4						
	731-7-3	41,7		3.4						
Fornbakteríur	Euryarchaeota	A746-14-1	Varmilækur	54	7.3	91%	Ný ættkvísl			
		A745-11-1		52,5	7.3					
		A718-3-3		Háhitasvæði efst	92,8			1.9	93%	Ný ættkvísl
		A744-6-2		Varmilækur	36,6			7.3	94%	
		A741-2-4	Rauðilækur	59	5.9	79%	Ný ættkvísl / fylking???			
		A730-4-2	Vestara svæði	49,8	4.9					
		A734-3-19	Vestara svæði	40,3	5.8			95%		
		A740-15-1	Rauðilækur	22	6.0					
		A744-1-8	Varmilækur	36,6	7.3					
		A742-1-1	Rauðilækur	46	6.9					

Miðað er við að skyldleiki $\leq 93\%$ bendi til að um nýja ættkvísl sé að ræða. ¹⁾ Síðasti tölustafurinn í raðarnúmeri sýnir fjölda klóna eða raða innan hversrar raðar.

Flestar fágætar tegundir úr Vonarskarði komu af Vestara svæði og úr Varmilæk þar sem hitastigið á sýnatökustöðunum var að jafnaði fremur lágt (tafla 7). Þó kom ein fágæt tegund fornbakteríu af hverasvæðinu efst í skarðinu þar sem hitastigið mældist yfir 90°C og pH um 2.

Skyldleikagildin eru lág að jafnaði og því sýnilega margar nýjar ættkvíslir að ræða. Ný ættkvísl innan *Aquificae* telst til tíðinda, en tegundir innan ættkvíslarinnar eru algengar í hverum, geta nýtt sér vetni og súlfíð og ólífrænt kolefni og eru því frumbjarga og leggja því grunninn að vistkerfinu. Tvær nýjar ættkvíslir innan *Bacteroidetes-Chlorobi* fylkinganna eiga sér fulltrúa í Vonarskarði (sjá einnig mynd 13). Fjórar nýjar ættkvíslir *Chloroflexi-Firmicutes* finnast ennfremur á Vestara svæði og í Varmalæk (sjá einnig mynd 14). Fjórar af fimm nýjum tegundum innan *Euryarchaeota* fylkingarinnar finnast í sýnum við lægri hitastigin. Ein þeirra vekur þó sérstaka athygli þar sem skyldleikaprósentan er aðeins 79% sem telst afar lágt. Þessi tegund fannst í tveimur sýnum af sitthvoru svæðinu, þ.e. úr Rauðalæk við 59°C og pH 5.9 og af vestara svæði við 49,8 og pH 4.9. Ekki er ljóst á hvaða flokkunarstigi þessi tegund er sem hefur hvergi fundist áður svo vitað sé (tafla 7, mynd 16).

TAFLA 8. Fágætar tegundir baktería og fornbaktería af þeistareykjum og úr Gjástykki.

Ríki	Fylking	Röð nr. ¹⁾	Uppruni	T°C	pH	Skyldleiki Genbank	Athugasemdir
Bakteríur	Acidobacteria	714-6-4	Gjástykki	58,4	6.6	94%	
		713-8-3	Hraunhólar þeistareykjum	44,8	6.7		
		712-7-15	Hraunhólar þeistareykjum	55	8.0		
	Actinobacteria	710-3-9	þeistareykjum	83,6	8.6	91%	Ný ættkvísl
		712-8-15	Hraunhólar þeistareykjum	55	8.0	87%	Ný ættkvísl
		710-1-9	þeistareykjum	83,6	8.6		
		715-17-1	Gjástykki	66-68	6.9		
			710-4-2	Hraunhólar þeist.	83,6	8.6	91%
		681-29-1	þeistareykir vatns ríkur leirhver	90	2.7	93%	Ný ættkvísl
		681-1-1					
		712-6-3	Hraunhólar þeist.	55	8.0	86%	
		715-12-1	Gjástykki	66-68	6.9	89%	Ný ættkvísl
		713-2-2	Hraunhólar þeist.	44,8	6.7		
		713-14-1	Hraunhólar þeist.	44,8	6.7	88%	
Chloroflexi	714-18-1	Gjástykki	58,4	6.6			
	Deinococcus – Thermus	714-17-1	Gjástykki	58,4	6.6	88%	Ný ættkvísl
713-13-1		Hraunhólar þeist.	44,8	6.7			
Meiothermus							
	Verrumicrobia	716-6-37	Gjástykki	84,8	4.4	88%	Ný ættkvísl
		715-2-29	Gjástykki	66-68	6.9		
		713-1-8	Hraunhólar þeist.	44,8	6.7		
Fornbakteriur	Thaumarchaeota	716A-1-8	Gjástykki	84,8	4.4	95%	
		715A-5-17		66-68	6.9		
		Euryarchaeota	676A-4-2	þeistareykir ummyndanir	54-70	3.1	95%

Miðað er við að skyldleiki $\leq 93\%$ bendi til að um nýja ættkvísl sé að ræða. ¹⁾ Síðasti tölustafurinn í raðarnúmeri sýnir fjölda klóna eða raða innan hvorrar raðar.

Fágætar tegundir af þeistareykjum koma allflestar úr gufuaugum í hraunhólum (tafla 8). Það vekur athygli að sömu tegundir finnast í nokkrum tilvikum í Gjástykki. Fimm nýjar ættkvíslir innan fylkingar *Actinobacteria* sjást í töflunni. Þær eiga flestar uppruna í gufuaugum í hraunhólum að þeistareykjum, en ein þeirra kemur úr súru og heitu umhverfi úr vatnsríkum

leirhver af hverasvæðinu á Þeistareykjum þar sem hitastig mældist 90°C og sýrustig pH 2.7. Tvær ættkvíslanna eiga fulltrúa í hraunhólum á Þeistareykjum og jafnframt í hverunum í Gjástykki (tafla 8 og mynd 12). Tegund sem flokkast til *Verrumicrobia* fylkingarinnar er afar sérstök og aðeins 88% skyld nánasta ættingja í Genbank (tafla 8). Hún er ríkjandi bakteríutebundin í sýnum 715 og 716 úr Gjástykki og fer raunar saman við ríkjandi tegund fornbaktería í þessum sýnum sem er af fylkingu *Thaumarchaeota* sem var uppgötvuð tiltölulega nýlega (Brochier-Armanet, o.fl. 2008a).

Genið sem almennt er notað til tegundagreininga, þ.e. 16S genið er tiltölulega líkt meðal *Thaumarchaeota* og *Crenarchaeota* tegunda og er samanburður ákveðinna próteina því einkum notaður til aðgreiningar (Gupta o.fl. 2010). Á skyldleikatré sem sýnir *Crenarchaeota* og *Thaumarchaeota* á mynd 15 í þessari skýrslu sést að Gjástykkistegundirnar lenda á grein með *Thaumarchaeota* tegundum.

TAFLA 9. Fágætar tegundir baktería og fornbaktería - samantekt

	Hengill	Krísuvík	Torfajökull	Krafla Námafjall	Vonarskarð	Þeistareykir Gjástykki	Alls
<i>Acidobacteria</i>	2		4	1		2	9
<i>Actinobacteria</i>	1			1		5	7
<i>Aquificae</i>					2		2
<i>Bacteroidetes- Chlorobi</i>					2		2
<i>Chloroflexi Firmicutes</i>	3		7	5	4	1	20
<i>Cyanobacteria</i>			1				1
<i>Deinococcus Thermus</i>			5	2		1	8
<i>Gemmatimonadetes</i>				2			2
<i>β-Proteobacteria</i>	1			1			2
<i>δ-Proteobacteria</i>		1	1				2
<i>γ-Proteobacteria</i>				1			1
<i>ε-Proetobacteria</i>			1				1
<i>Planctomycetes</i>	1		2				3
<i>Verrumicrobia</i>						1	1
<i>OP-10</i>			1	1			2
<i>Crenarchaeota</i>	3					1	4
<i>Euryarchaeota</i>					5	1	6
<i>Nanoarchaeota</i>			1				1
Tegundir alls	11	1	23	14	13	12	74

Í töflu 9 eru niðurstöður úr töflum 3-8 dregnar saman og skoðaðar í heild. Þar sést að sjaldgæfar tegundir flokkast til 11 fylkinga baktería og 2 fylkinga fornbaktería. Ennfremur sýnir taflan að sá flestar nýjar tegundir koma af Torfajökulssvæði og síðan úr Kröflu, en Hengilssvæðið og Vonarskarð fylgja fast á eftir.

Skuldleikatré byggð á samröðunum á 16S rRNA geni fágætra tegunda úr töflunni hér að ofan voru búin til (myndir 12-18). Fylkingar sem höfðu aðeins eina tegund, eða fundust aðeins á einu svæði var þó sleppt í flestum tilvikum.

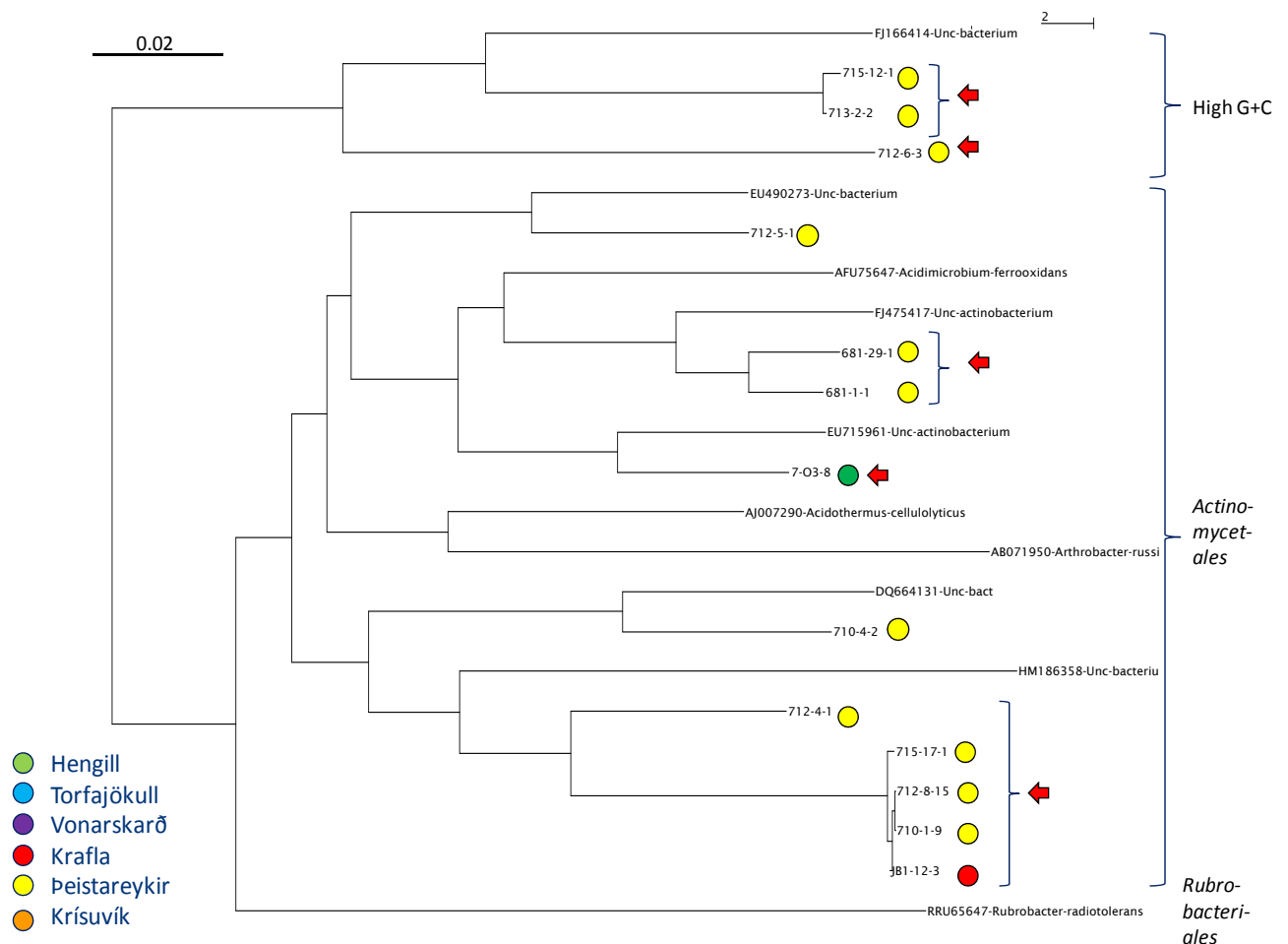
5.2 Dreifing fágætra tegunda

Fágætar tegundir sem sýndu $\leq 96\%$ skyldleika við nánasta ættingja í Genbank voru flokkaðar sér og síðan samrætt innan fylkinga af öllum svæðum til að athuga hvort þær fundust á fleiri en einu svæði rannsóknarinnar. Fulltrúar nánasta ættingja úr Genbank voru hafðir með í samröðuninni. Skyldleikatré byggð á fyrrgreindri samröðun voru búin til fyrir fágætar tegundir innan nokkurra fylkinga í því skyni að sjá dreifingu tegundanna og innbyrðis skyldleika á myndrænan hátt. Við skoðun á skyldleikatrjánum (myndir 12-18) sést glögglega að flestar fágætar tegundir eru staðbundnar, sama sjaldgæfa tegundin finnst aðeins í örfáum tilvikum á fleiri en einu svæði og þá mest á tveimur svæðum.

5.2.1 *Actinobacteria*

Mynd 12 sýnir skyldleikatré fágætra *Actinobacteria* tegunda. Almennt finnast þessar tegundir víða í vatni og í jarðvegi þar sem þær eru mikilvirkar í niðurbroti á lífrænum efnum. Fágætar tegundi *Actinobacteria* sem fundust í þessari rannsókn virðast í flestum tilvikum svæðisbundnar eins og tréð ber með sér. Eins og sjá má koma langflestar fágætu tegundirnar af svæðinu við Þeistareyki og úr Gjástykki. Á efstu greininni sjást tvær tegundir sem mynda greinar innan svonefndra „High G+C“ *Actinobacteria*, sem vísar til þess að DNA þeirra er einstaklega ríkt af niturbösum G (guanine) og C (cytosine). Önnur þessara tegunda finnst bæði í hraunhólum á Þeistareykjum og í Gjástykki. Fágætar tegundir sem mynda neðri hluta trésins flokkast svo til *Actinomycetales* sem myndar sundurleitan hóp tegunda sem margar hverjar hafa aldrei verið flokkaðar til tegunda.

Efst innan *Actinomycetales* (mynd 12) sést grein sem sýnir skyldleika, að vísu fjarlæg, við *Acidimicrobium ferrooxidans* sem er algeng tegund á hverasvæðum sem lifir við lágt pH og getur oxað járnsambönd eins og nafnið bendir til. Þessi tegund fannst í vatnsríkum leirhver á Þeistareykjum við 90°C og pH 2.7. Enn neðar í trénu sést svo tegund af Hengilssvæði, nánar tiltekið af Ölkelduhálsi sem virðist ekki finnast annars staðar. Stór grein, nánast neðst í trénu vekur athygli þar sem hún inniheldur talsverðan fjölda fulltrúa og finnst bæði í gufuaugum í hraunhólum á Þeistareykjum, í Gjástykki og í Jarðbaðshólum á Kröflu / Námafjallssvæðinu og er því ekki svæðisbundin. Nánast ættingi í Genbank hefur aldrei verið ræktaður og myndar aðeins fjarlæga grein í trénu. Hér er því líklega um einlenda tegund að ræða sem hefur þó umtalsverða útbreiðslu hér á landi.

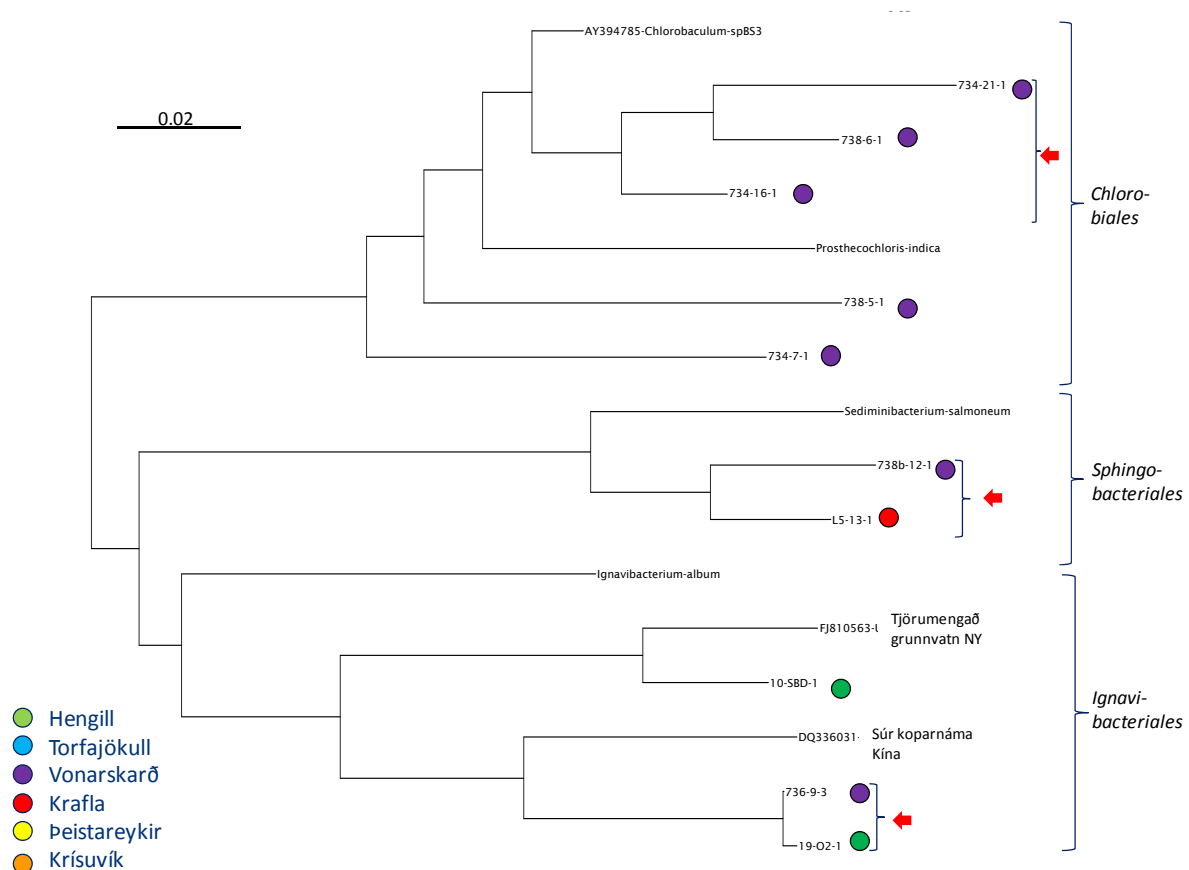


Mynd 12. Myndin sýnir skyldleikatré og dreifingu sjaldgæfra *Actinobacteria* á jarðhitasvæðum sem könnuð voru innan Rammaáætlunar. Langflestar þessara sjaldgæfu tegunda fundust á Þeistareykjum. Einnig fundust sjaldgæfar tegundir á Hengilssvæðinu og á svæðinu Krafla / Námafjall.

5.2.2. *Bacteroidetes* / *Chlorobi*

Mynd 13 sýnir skyldleikatré fágætra *Bacteroidetes* / *Chlorobi* tegunda sem fundust innan rannsóknar Rammaáætlunar. Þessar tvær fylkingar eru náskyldar og því fjallað um þær hér saman. *Bacteroidetes* tegundir finnast víða i umhverfinu, m.a. í sjó, jarðvegi og m.a.s. í jöklum í Tíbet (Zhang o.fl 2009). Nokkrar tegundir hafa greinst í jarðvegi og í örveruþekjum á hverasvæðum. *Bacteroidetes* fylkingin inniheldur ófrumbjarga tegundir sem þurfa lífrænt kolefni til vaxtar og viðhalds. Þær þykja áhugaverðar því þær framleiða ensím sem gera þeim kleift að sundra stórsameindum eins og fjölsykrum. *Chlorobi* tegundir eru einkum þekktar fyrir að geta nýtt sér ýmis konar brennisteinssambönd.

Eins og sjá má virðast flestar fágætar tegundir innan þessara fylkinga vera svæðisbundnar og þá einkum við Vonarskarð. Efsta grein trésins á mynd 13 inniheldur fágætar tegundir innan *Chlorobi* sem gengur einnig undir nafninu „Grænar brennisteinsbakteríur“ og eru tiltölulega



Mynd 13. Myndin sýnir skyldleikatré og dreifingu sjaldgæfra *Bacteroidetes* / *Chlorobi* tegunda á jarðhitasvæðum sem könnuð voru innan Rammaáætlunar. Langflestar tegundirnar komu úr Vonarskarði, en einnig fundust tegundir á svæðinu Krafla / Námafjall og á Hengilssvæði.

algengar á hverasvæðum. Margar þessara tegunda innihalda litarefni bacteriochlorophyll c og carotenefni, eru ljóstillífangi en nýta sér súlfíð (H_2S) í stað vatns (H_2O) sem elektrónugjafa. Þær mynda einnig oft brennisteinskorn utan frumunnar við oxun á súlfíði (Anil Kumar o.fl. 2009). Allar fágætar tegundir innan *Chlorobiales* komu úr læk af Vestara svæði í Vonarskarði, þar sem hitastig var tiltölulega lágt (33-42°C) og pH einnig (pH 3.7-5.8).

Miðhluti trésins – *Sphingobacteriales*- sýnir tvær tegundir á nálægum greinum annars vegar úr Vonarskarði (33°C pH 3.7) og hins vegar úr affallslæk við Kröflu (43°C, pH 8-9). Þessar tegundir teljast að öllum líkindum báðar til *Sediminibacterium* ættkvíslarinnar miðað við samröðun í trénu. Reyndar tókst að rækta og einangra aðra þeirra og eru uppi áform um að lýsa henni síðar.

Innan *Ignavibacteriales* í neðstu grein trésins eru einnig grænar brennisteinsbakteríur eins og meðal *Chlorobiales*. Allra neðst í trénu á mynd 13 er fágæt tegund sem finnst bæði í Vonarskarði (64,5°C pH 4.7) og á Ölkelduhálsi (53°C, pH 5.5) og aðeins ofar tegund úr Sleggjubeinsdal.

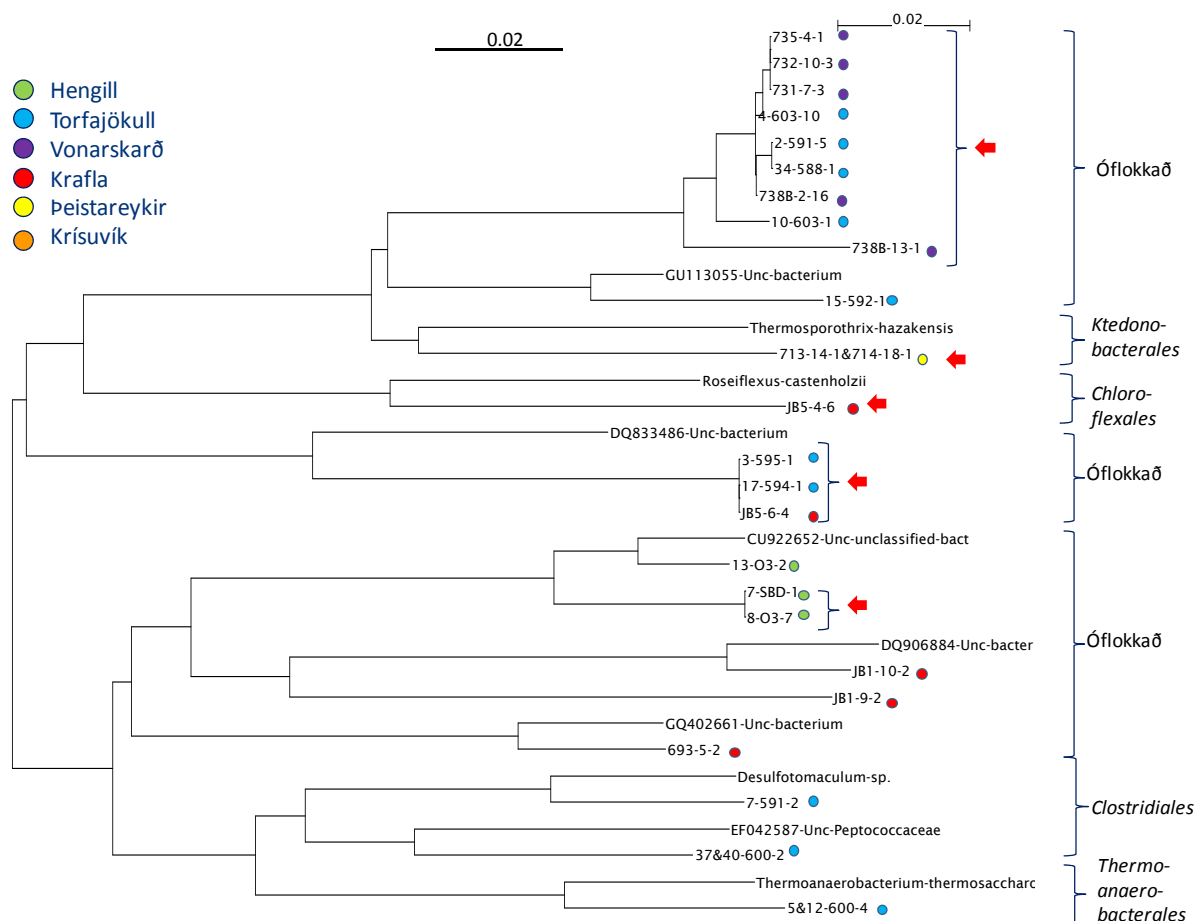
5.2.3 *Chloroflexi* - *Firmicutes*

Mynd 14 sýnir skyldleikatré fágætra tegunda innan fylkinga *Chloroflexi* - *Firmicutes*. Innan *Chloroflexi* fylkingarinnar eru vel þekktar hverabakteríur. Þetta á sérstaklega við um *Chloroflexus aurantiacus* sem er ein af einkennistegundum í vatnshverum. Þessi tegund getur nýtt sér sólarljós til frumbjarga lífs og myndar þá oft áberandi appelsínugular örveruþekjur í afrennsli vatnshvera, þar sem sýrustig er u.þ.b. hlutlaust eða pH 7. Þessi tegund getur einnig lifað ófrumbjarga lífi. *Clostridiales* tegundir innan *Firmicutes* mynda hóp sem þolir illa súrefni og er oft grómyndandi. Þær hafa vakið athygli síðari árin þar sem þær nýta sér járn- og brennisteinssambönd.

Eins og sjá má koma flestar tegundirnar af Torfajökulssvæðinu, þó nokkrar úr Vonarskarði og nokkrar af Hengilssvæði og af svæðinu Krafla / Námafjall. Erfitt reyndist að finna ýmsum tegundum stað í skyldleikatrénu, þar sem nánustu ættingjar í Genbank reyndust „óflokkaðir“ og á því eftir að finna þeim stað í lífsins tré.

Efsta grein trésins vekur einkum athygli þar sem hún sýnir tegund sem finnst í umtalsverðum fjölda bæði á Torfajökulssvæði og í Vonarskarði við tiltölulega lág hitastig (35-62°C) og sýrustig (pH 3-5) en virðist ekki eiga sér neinn náinn ættingja, - ekki einu sinni óræktaðan. Þegar borið er saman við Genbank fæst skyldleiki við nánasta ættingja 91%, og virðist sem greinin eigi heima innan fylkinga *Chloroflexi* / *Firmicutes*, en þó er ekki útilokað að um sérstaka fylkingu sé að ræða sem ekki hefur öðlast sess innan flokkunarfræðinnar ennþá.

Innan *Chloroflexales* á mynd 14 sést svo einnig fjarskyld, stök tegund úr Jarðbaðshólum. Aðeins neðar má sjá tegund sem finnst bæði í Stórahver á Torfajökulssvæði og einnig í Jarðbaðshólum. Þessi tegund nær aðeins flokkunarstiginu „óflokkað“. Sama á við um tegundir af Hengilssvæði og úr Sleggjubeinsdal.

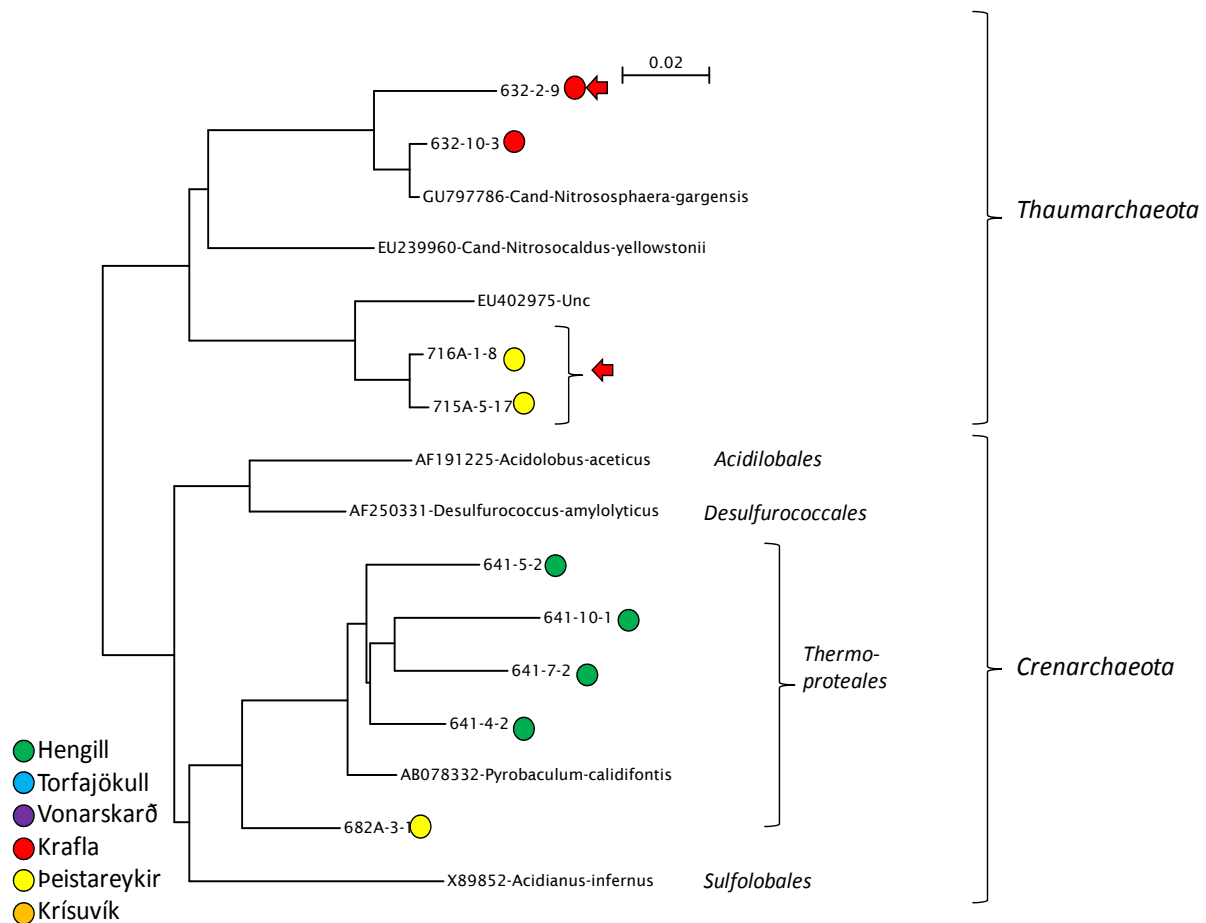


Mynd 14. Myndin sýnir skyldleikatré og dreifingu sjaldgæfra *Chloroflexi* / *Firmicutes* tegunda sem fundust á jarðhita-svæðunum sem rannsökuð voru.

5.2.4 *Crenarchaeota* og *Thaumarchaeota*

Mynd 15 sýnir skyldleika fágætra tegunda fornbakteríufylkinganna *Crenarchaeota* og *Thaumarchaeota* sem fundust í sýnunum, auk nánustu ættingja í Genbank. *Crenarchaeota* hópurinn innan fornbaktería er talinn innihalda elstu lífsform jarðarinnar. Innan hans eru hitakærustu örverur sem þekkjast og hafa flestar fundist eða verið einangraðar úr land- eða neðansjávarhverum. Þær vaxa oft við 80-100°C. Margar tegundir lifa einnig við mjög súrar aðstæður (pH 1-2). Margar tegundir þola einnig lægra hitastig, en ekki hefur tekist að einangra þær og er því lítið vitað um eiginleika þeirra og lífshætti. Innan *Crenarchaeota* finnast fjölbreyttar tegundir bæði frumbjarga og ófrumbjarga, loftháðar og loftfælnar. Margar nýta brennistein eða brennisteinnssambönd í orkuvinnslu. Nokkrar tegundir eru frumframleiðendur lífrænna efna og nýta CO₂ sem kolefnisgjafa og ná í orku með oxun á brennisteini og vetni og afoxun á brennisteini og nítrati. Aðrar nýta lífræn efni sér til vaxtar og viðhalds. Eins og áður greinir er *Thaumarchaeota* hópur fornbaktería sem áður var talinn til *Crenarchaeota*, en fékk fylkingarsess tiltölulega nýlega (Gupta o.fl. 2010). Hér er oftast um miðlungshitakærar tegundir af sjávaruppruna að ræða, en nokkrar tegundir hafa einnig verið staðfestar úr hverum.

Enn og aftur sést að fágætar tegundir eru svæðisbundnar. Í efri hluta trésins á mynd 15 sést að innan *Thaumarchaeota* dreifast fágætar tegundir einkum á tvær greinar, annars vegar tegundir sem fundust í sýnum úr Jarðbaðshólum af svæðinu Krafla / Námafjall (56°C, pH 5) og hins vegar tegundir sem fundust í sýnum úr Gjástykki (66-84°C; pH 4.4-6.9). Neðri hluti trésins á mynd 15 sýnir svo fágætar tegundir innan fylkingar *Crenarchaeota*. Tegundir upprunnar á Ölkelduhálsi (77°C, pH 5) þjappa sér saman á nokkrar nálægar greinar og sýna skyldleika við *Pyrobaculum* tegund, en slíkar tegundir finnast einmitt almennt við hátt hitastig. Aðeins fjarskyldari er svo tegund af Þeistareykjasvæði (96,5°C, pH 3.1).

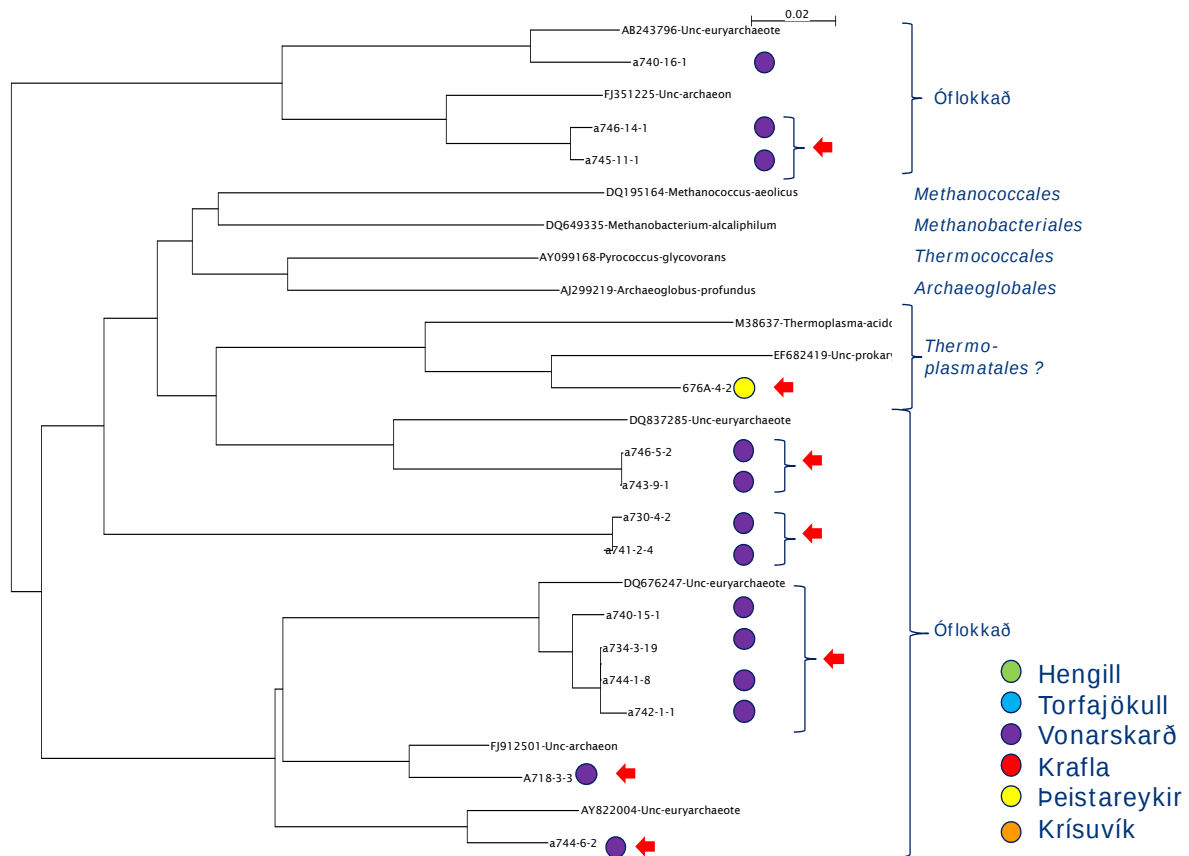


Mynd 15. Dreifing fágætra tegunda innan fornbakteríufylkinga *Crenarchaeota* og *Thaumarchaeota* sem fundust í sýnum sem tekin voru á vegum Rammaáætlunar. Síðasta tala innan sýnánúmers táknar fjölda í sýni.

5.2.5 *Euryarchaeota*

Ríki *Euryarchaeota* hýsir sundurleitan hóp fornbaktería s.s. saltkærar halobakteríur, metanmyndandi tegundir og hitakærar tegundir. Innan fylkingarinnar eru einnig fjölmargar tegundir sem eru skilgreindar sem „óflokkað“.

Mynd 16 sýnir skyldleikatré fágætra tegunda innan fornbakteríufylkingar *Euryarchaeota* sem fundust í sýnum sem tekin voru innan Rammaáætlunar. Eins og sjá má koma allflestar fágætu tegundirnar úr Vonarskarði. Annað sem vekur athygli er að flestar tegundirnar sem fundust renna inn í hópa sem eru merktir „óflokkað“.



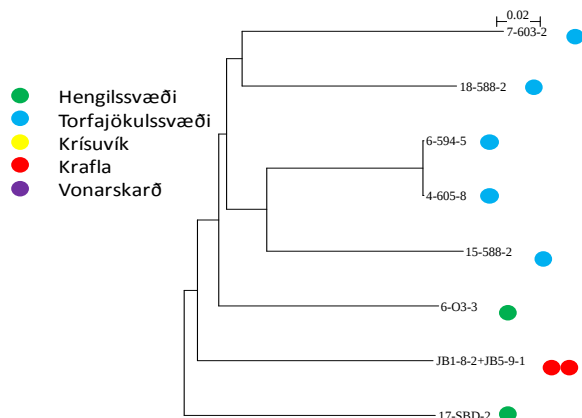
Mynd 16. Ýmsar áður óþekktar tegundir *Euryarchaeota* innan Fornbaktería fundust í Vonarskarði en ekki annars staðar.

Í næst efstu grein trésins sést tegund sem fannst í tveimur sýnum úr Varmalæk við rúmlega 50°C og pH 7.3. Aðeins ein tegund kemur af öðru svæði en Vonarskarði og það er tegund sem kemur úr sýni úr yfirborðsummyndunum, eða hverahrúðri á Þeistareykjum (70°C, pH 3.1). Þetta er reyndar eina tegundin innan trésins sem nær flokkun og lendir innan *Thermoplasmatales*.

5.2.6 *Acidobacteria*

Oft reyndist erfitt að finna fágætum tegundum stað í lífsins tré. Þetta átti einkum við tegundir sem fengu flokkunina „*Acidobacteria*“ hér að framan. Þegar leitað var nánustu ættingja í Genbank var mjög á reiki hvar þessar tegundir flokkuðust. Þegar þeim var samrætt sást að þær sýndu svæðisbundna dreifingu eins og flestar hinna fágætu tegundanna (mynd 17).

Dreifing sjaldgæfra tegunda *Acidobacteria*



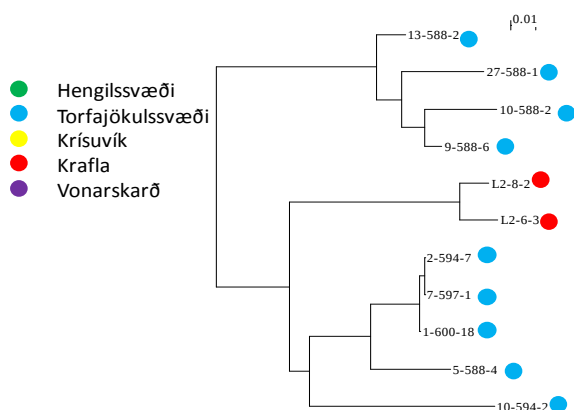
Sjaldgæfar tegundir *Acidobacteria* eru svæðisbundnar og koma flestar af Torfajökulssvæði

Mynd 17. Dreifing sjaldgæfra tegunda *Acidobacteria*

5.2.7 *Deinococcus - Thermus*

Flestar fágætar tegundir innan fylkingarinnar flokkast undir miðlungshitakærar tegundir *Meiothermus*. Allflestar tegundirnar sem fundust koma af Torfajökulssvæðinu. Mynd 18. sýnir skyldleikatré fágætra *Thermus* tegunda og sést að þær flokkast á þrjár greinar og sýna sterka svæðisbundna dreifingu.

Dreifing sjaldgæfra tegunda *Deinococcus / Thermus*



Sjaldgæfar tegundir *Deinococcus* *Thermus* eru svæðisbundnar og flestar á Torfajökulssvæði

Mynd 18. Dreifing sjaldgæfra tegunda *Deinococcus Thermus*.

6. Samantekt

Þessari samantekt um lífríki í hverum á háhitasvæðum á Íslandi er ætlað að svara spurningum um hve mikill og hvers eðlis breytileikinn er í örveruflóru milli sex háhitasvæða á Íslandi einkum m.t.t. fjölbreytni og fágætra hópa og að raða háhitasvæðunum eftir líffræðilegum fjölbreytileika og líffræðilegri sérstöðu.

Hér að framan hefur því verið leitast við að draga saman meginatriði rannsókna á örverulífriki í hverum á sex jarðhitasvæðum á Íslandi sem allar voru á vegum Rammaáætlunar nema ein sem var liður í umhverfismati. Svæðin sem rannsökuð voru innan Rammaáætlunar voru fimm talsins, þ.e. Hengilssvæði, Torfajökulssvæði, Krafla / Námafjall, Krísuvík og Vonarskarð. Sambærileg rannsókn sem gerð var vegna umhverfismats á jarðhitasvæðunum á Þeistareykjum og í Gjástykki var höfð með í þessari umfjöllun.

Alls voru tekin 115 sýni á jarðhitasvæðunum sex og tókst að greina tegundasamsetningu í 80 þeirra með sameindalíffræðilegum aðferðum. Leitað var að bakteríum og fornbakteríum í sýnunum og tegundagreinandi gen þeirra mögnuð upp og raðgreind. Raðirnar voru síðan flokkaðar eftir skyldleika og bornar saman við sambærilegar raðir í genabönkum til að greina tegundir eða nánustu ættingja. Alls tókst að greina 4424 bakteríuraðir og 1006 fornbakteríuraðir úr sýnunum.

Dreifing baktería og fornbaktería í sýnunum var metin út frá gögnunum og kom í ljós að 16 bakteríufylkingar fundust á allflestum svæðunum og voru tegundir af fylkingu *Aquificae* algengastar, sem kom ekki á óvart þar sem tegundir innan fylkingarinnar eru frumbjarga og einkennandi fyrir lífríki í hverum. Tegundir sem flokkast til fylkinga *β-proteobaktería*, *γ-proteobaktería* og *Deinococcus – Thermus* fundust einnig í umtalsverðum mæli á öllum svæðum nema í Krísuvík. Auk ofangreindra 16 fylkinga fundust stakar fylkingar á einstaka svæðum í nokkrum tilfellum. Sambærileg athugun á fornbakteríum sýndi að fjórar fylkingar fundust. *Crenarcheota* tegundir fundust á öllum svæðunum, *Euryarchaeota* tegundir fundust í Vonarskarði og að Þeistareykjum, *Thaumarchaeota* fannst í Vonarskarði og í Kröflu / Námafjalli og *Nanoarchaeota* fannst á Torfajökulssvæðinu.

Tölfræðilegum aðferðum var beitt til að meta líffræðilegan fjölbreytileika á einstökum svæðum, annars vegar með útreikningi á líffræðilegum fjölbreytileikastuðli Shannons (H) og hins vegar með útreikningi á svokölluðum söfnunarkúrfum. Niðurstöður voru þær að útreiknaðir stuðlar fyrir líffræðilegan fjölbreytileika gefa til kynna að Kröflusvæðið sé fjölbreyttast, þá Torfajökull, síðan Vonarskarð, Þeistareykir, Hengill og að lokum Krísuvík. Mat á líffræðilegum fjölbreytileika með útreikningi á söfnunarkúrfum styður þessa niðurstöðu: Vonarskarð, Torfajökull, Þeistareykir og Krafla sýna svipaðar niðurstöður, Hengilssvæðið kemur í kjölfarið og að lokum Krísuvík.

Líffræðileg sérstaða eða fágæti var metin á grundvelli fágætra tegunda, m.v. $\leq 96\%$ samsvörun við nánasta ættingja í Genbank og að fágæt tegund fyndist í fleiri en einu eintaki. Alls fundust 74 fágætar tegundir eða ættkvíslir. Fágætar tegundir virtust að langmestu leyti svæðisbundnar. Niðurstöðurnar gáfu til kynna að flestar nýjar tegundir eða ættkvíslir fundust á Torfajökulssvæðinu. Vonarskarð, Krafla / Námafjall og Þeistareykir voru með nokkru færri fágætar tegundir eða ættkvíslir. Nýjar ættkvíslir fundust einnig á Hengilssvæðinu, en ekki í sama mæli.

Flestar fágætar tegundir flokkuðust til bakteríufylkinga *Chloroflexi* – *Firmicutes*, *Actinobacteria* og fornbakteríufylkingar *Euryarchaeota*. Allnokkrar flokkuðust til bakteríufylkinga *Deinococcus* – *Thermus*, *Acidobacteria* og *Bacteroidetes* – *Chlorobi* og fornbakteríufylkingar *Crenarchaeota*. Ennfremur fundust tegundir sem flokkuðust til nýuppgötvaðrar fornbakteríufylkingar *Thaumarchaeota*. Sérstaka athygli vöktu eftirfarandi fágætar tegundir sem eru að öllum líkindum jafnframt einlendar:

- Þrjár tegundir *Actinobacteria* sem fundust einkum í sýnum frá Þeistareykjum og Gjástykki.
- Nokkrar tegundir *Bacteroidetes* - *Chlorobi* sem fundust í sýnum úr Vonarskarði en einnig á Hengilssvæði og Kröflu.
- Ný fjarskyld tegund innan fylkingar *Chloroflexi* – *Firmicutes* sem fannst í sýnum sem komu úr Vonarskarði og af Torfajökulssvæði.
- Tvær nýjar tegundir innan nýuppgötvaðrar fylkingar *Thaumarchaeota*. Þessar tegundir eiga uppruna sinn annars vegar í Jarðbaðshólum og hins vegar í Gjástykki.
- Nokkrar tegundir innan fylkingar *Euryarchaeota*. Langflestar þessara tegunda koma úr Vonarskarði.

Ætla má að sú mynd sem dregin er upp á grundvelli núverandi rannsókna á lífríki í hverum á nokkrum háhitasvæðum á Íslandi sé orðin nokkuð heilleg. Leitast hefur verið við að draga fram mælanlega þætti úr gögnunum til að ná sem heillegustum samanburði milli sex háhitasvæða hvað varðar dreifingu, fjölbreytileika og fágæti örverutegunda sem fundust í sýnunum. Niðurstöðurnar eru um margt merkilegar einkum fjöldi nýrra ættkvísla og tegunda sem fundust. Áætlað er að greina frá niðurstöðum rannsókna í erlendu vísindariti.

Þakkir

Verkefnastjórum Rammaáætlunar frá Orkustofnun, þeim Hákonni Aðalsteinssyni og Kristni Einarssyni viljum við þakka fyrir góða samvinnu. Ennfremur viljum við þakka Hauki Jóhannessyni fyrir ómetanlega aðstoð hvað varðar upplýsingar um sýnatökustaði í Vonarskarði og kortagerð. Síðast en ekki síst viljum við þakka Andra Stefánssyni fyrir greinargóðar upplýsingar um jarðefnafræði einstakra svæða og samvinnu sem stofnað var til innan Rammaáætlunar en mun að öllum líkindum skila sér í fleiri verkefnum á snertiflötum örveruvistfræði og jarðefnafræði.

HEIMILDIR

Brochier-Armanet, C.; Boussau, B.; Gribaldo, S., Forterre, P. 2008a. Mesophilic Crenarchaeota: proposal for a third archaeal phylum, The Thaumarchaeota. *Nat Rev Microbiol.* 6:245-252.

Burggraf, S.; Huber, H., Stetter, KO. 1997. Reclassification of the crenarchaeal orders and families in accordance with 16S rRNA sequence data. *Int J Syst Bacteriol.* 47: 657-660.

Eder, W. and Huber, R. 2002. New isolates and physiological properties of the *Aquificales* and description of *Thermocrinis albus* sp. nov. *Extremophiles.* 6:309-318.

Huber, H., Hohn, MJ., Rachel R., Fuchs, T., Wimmer, VC., Stetter, KO. 2002. A new phylum of Archaea represented by a nanosized hyperthermophilic symbiont. *Nature.* 417: 63-67.

Guðmundur Pálmason. Jarðhitabók - Eðli og nýting auðlindar. Hið íslenska bókmenntafélag. Reykjavík 2005.

Gupta, R.S. og Shami, A. 2010. Molecular signatures for the Crenarchaeota and the Thaumarchaeota. *Antonie van Leeuwenhoek.* DOI 10.1007/s10482-010-9488-3

Anil Kumar P, Naga Radha Srinivas T, Sasikala C, Venkata Ramana C, Süling J, Imhoff J. 2009. *Prosthecochloris indica* sp. nov., a novel green sulfur bacterium from a marine aquaculture pond, Kakinada, India. *J Gen Appl Microbiol.* 55(2):163-169.

Ludwig, W. og Klenk, H-P. 2005. Overview: a phylogenetic backbone and taxonomic framework for prokaryotic systematics: Brenner DJ, Krieg NR., Staley, JT; Garrity GMþ (útg). *Bergey's manual of systematic bacteriology.* Springer-Verlag. Berlin, bls 49-65.

Pace, NR., Stahl, DA., Lane, DJ. og Olsen, GJ. 1985. Analysing natural microbial populations by RNA sequences. *ASM News.* 51: 4-12.

Pace, NR. 2009. Mapping the tree of life: Progress and prospects. *Microbiol Mol Biol Rev.* 73:565-576

Petursdóttir, S.K., Björnsdóttir, S.H. 2010. Microbial Assessment of five geothermal areas in Iceland using culture independent methods. Matis ohf, Biotechnology and Biomolecules, Vinlandsleið 12, Reykjavík, 113, Iceland. Kynning á International Symposium of Microbiology Ecology (ISME-13) ráðstefnunni sem haldin var í Seattle 22.-27. ágúst 2010.

Reysenbach, AL, Ehringer, M., Hershberger, K. 2000. Microbial diversity at 83 degrees C in Calcite Springs, Yellowstone National Park: Another environment where the Aquificales and „Korarchaeota“ coexist. *Extremophiles.* 4: 61-67.

Snaedis H. Björnsdóttir, Solveig K. Petursdóttir, Guðmundur O. Hreggvidsson, Sigurlaug Skirnisdóttir, Sigríður Hjorleifsdóttir, Johann Arnfinnsson, and Jakob K. Kristjánsson. 2009. *Thermus islandicus* sp. nov., a mixotrophic, sulfur-oxidizing bacterium isolated from the

Torfajokull geothermal area. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 59(12) 2962-2966.

Sólveig K. Pétursdóttir, Snædís Björnsdóttir, Alexandra Klonowski, Sólveig Ólafsdóttir, Guðmundur Óli Hreggviðsson. Lífríki í kalkríkum hverum á Ölkelduhálsi. Unnið fyrir styrk úr Umhverfissjóði OR. [Skýrsla Matis 30-08](#), 34 s.

Sólveig K. Pétursdóttir, Steinunn Magnúsdóttir, Dr. Viggó Þ. Marteinson, Dr. Guðmundur Óli Hreggviðsson, Dr. Jakob K. Kristjánsson. Lífríki í hverum á Torfajökulssvæðinu. Janúar 2006. Skýrsla unnin fyrir Orkustofnun vegna Rammaáætlunar;

Sólveig K. Pétursdóttir, Tryggvi Þórðarson, Steinunn Magnúsdóttir, Guðmundur Óli Hreggviðsson. 2006. Mat á umhverfisáhrifum jarðvarmavirkjana í Hverahlíð og við Ölkelduháls. Athugun á lífríki hvera. Unnið fyrir Orkuveitu Reykjavíkur.

Sólveig K. Pétursdóttir, Sólveig Ólafsdóttir, Steinunn Magnúsdóttir og Guðmundur Óli Hreggviðsson. 2007. Lífríki í hverum í Krísuvík og Gunnhver á Reykjanesi. Rannsókn unnin vegna Rammaáætlunar um nýtingu á jarðvarma á háhitasvæðum. [Skýrsla Matis 31-07](#). Unnið fyrir Orkustofnun 2006 – 2007. ISSN 1670-7192;

Sólveig K. Pétursdóttir, Snædís H. Björnsdóttir, Sólveig Ólafsdóttir og Guðmundur Óli Hreggviðsson. 2008. Líffræðilegur fjölbreytileiki í hverum við Kröflu og Námafjall. [Skýrsla Matis 02-08](#). Unnin fyrir Orkustofnun vegna Rammaáætlunar. ISSN 1670-7192

Sólveig K. Pétursdóttir, Snædís H. Björnsdóttir, Sólveig Ólafsdóttir, Guðmundur Óli Hreggviðsson. 2009. Lífríki í hverum í Vonarskarði / Microbial diversity in hot spring sin Vonarskarð. Unnið fyrir Orkustofnun. [Skýrsla Matis 09-09](#) , 80 s.

Sólveig K. Pétursdóttir, Snædís Huld Björnsdóttir, Sólveig Ólafsdóttir, Guðmundur Óli Hreggviðsson. 2008. Líffræðilegur fjölbreytileiki í hverum að Þeistareykjum og í Gjástykki. [Skýrsla Matis 39-08](#). 60 bls.

Spang, A., Hatzenpichler, R., Brochier-Armanet, C., Rattei, T., Tischler, P., Spieck, E., Streit, W., Stahl, D.A., Wagner, M. and Schleper, C. 2010. Distinct gene set in two different lineages of ammonia-oxidizing archaea supports the phylum Thaumarchaeota Trends Microbiol. 18 (8), 331-340.

Viggó Þór Marteinson, Sólveig K. Pétursdóttir, Steinunn Magnúsdóttir. 2004. Líffræðileg fjölbreytni í hverum og laugum á Hengilssvæðinu. Skýrsla unnin fyrir Orkustofnun vegna Rammaáætlunar

Woese, CR. og Fox, GE. 1977. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 5088-5090.

Zhang, X., Ma, X., Wang, N. og Yao, T. 2009. New subgroup of *Bacteroidetes* and diverse microorganisms in Tibetan plateau glacial ice provide a biological record of environmental conditions. FEMS Microbiolog. 67:21 (2009) PMID 19049497.