

メタン生成高温海底油田環境中の微生物共生機構解析

Studies on Microbial Symbiosis in a Methanogenic High Temperature Subsurface Petroleum Reservoir

加藤 雄大^{1,2}, 漆畑 亘^{1,3}, 森川 正章^{1*}

TAKAHIRO KATO, WATARU URUSHIBATA and MASAOKI MORIKAWA

¹ 北海道大学大学院環境科学院生物圏科学専攻 〒060-0810 札幌市北区北10条西5丁目

² 現所属 清水建設株式会社技術研究所 〒135-8530 東京都江東区越中島3丁目4番17号

³ 現所属 キューピー醸造株式会社研究所 〒182-0002 東京都調布市仙川町2-5-7

*TEL & FAX: 011-706-2253

* E-mail: morikawa@ees.hokudai.ac.jp

¹ Division of Biosphere Science, Graduate School of Environmental Science, Hokkaido University, N-10, W-5, Kita-ku, Sapporo 060-0810, Japan

² Institute of Technology, SHIMIZU CORPORATION, 3-4-17, Etchujima, Koto-ku, Tokyo 135-9530, Japan

³ Kewpie Jyozo Co., Ltd, 2-5-7, Sengawa-cho, Chofu, Tokyo 182-0002, Japan

キーワード: 高温海底油田, メタン生成, 微生物共生, ナノワイヤ, *Coprothermobacter proteolyticus*

Key words: High temperature subsurface petroleum reservoir, Methanogenesis, Microbial symbiosis, Nanowire, *Coprothermobacter proteolyticus*

(原稿受付 2016年9月5日/原稿受理 2016年9月12日)

1. はじめに

地表から隔絶した深部地底環境は新たな生態系発見の可能性を秘めている。2001年から2005年にかけておよそ600億円をかけて建造された我が国が世界に誇る地球深部探査船「ちきゅう」による第337次研究航海「下北八戸沖石炭層生命圏掘削」(2012)において、国立研究開発法人海洋研究開発機構およびドイツ・米国などの国際共同チームが青森県八戸市沖の約80 kmの地点(水深1,180 m)から採取された海底下2,466 mまでの堆積物コアサンプルを分析した結果、海底下に埋没した約2000万年以上前の褐炭層地層に、陸性の微生物生態系(石炭の起源である森林土壌の微生物群集)に類似する固有の微生物群集「海底下の森」が存在することを発見した⁹⁾。一方、商業生産している海底油田は地表微生物のコンタミネーションのリスクはあるものの、比較的アクセスの容易な地底環境である。これまでにいくつかの海底油田において多様な微生物が生息し、太陽光に依存しない独自の生態系を築いていることが報告されている^{2,11,18,22)}。暗所嫌気的な海底油田の主な微生物は硫酸還元菌、発酵菌、メタン生成菌であり、これらが海底油田の物質循環を担っていると考えられている^{14,17)}。

油田の多くは最終産物として原油とともにメタンが生産されるが、南カナダのオイルサンドでは水素資化性メタン生成菌 hydrogenotrophic methanogen が優占し、アラスカの中温海底油田では酢酸資化性メタン生成菌

acetogenotrophic methanogen が優占していると報告されている¹⁸⁾。海底油田の微生物は石油生産プロセスにも影響を及ぼす。硫酸還元菌が生産する硫化水素は人体に有毒であると共に油田パイプラインの腐食を引き起こし、時には酸敗など石油の品質低下を招くこともある⁹⁾。一方では、枯渇油田から石油を回収するための Microbial enhanced oil recovery (MEOR) 技術は油田に土着あるいは外来の発酵微生物やバイオサーファクタント生産菌あるいはメタン生成菌などの複合微生物活性を利用したものである¹⁾。すなわち海底油田微生物の生理や微生物同士の相互作用を解析することは地表と隔絶された環境の生態系の理解に加えて、より効率的な化石燃料の生産プロセスおよび品質管理技術への貢献も期待できる。

2. 海底油田由来高度好熱性細菌 PM9-2

私たちは2000年にマレーシア国営のペトロナス社の協力を得て、マレー半島沖南シナ海の海上プラットフォーム PM9 で海底油田随伴水を採取する機会を得た。この油田では、原油と共にメタンを含む天然ガスが生成していたが後者は燃焼廃棄されていた。また、この油田随伴水を微生物学的に調査するのはこれがはじめてであった。

この油田随伴水は Na, Mg, K, Ca が周辺海水と比べて極端に少なく、Si が海水に比べて顕著に多いことか

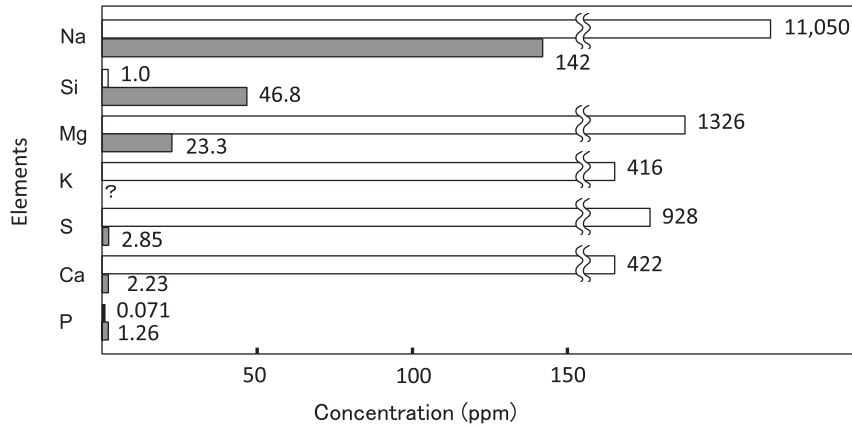


Fig. 1. 周辺海水 (□) と PM9 海底油田随伴水 (■) の元素組成比較。

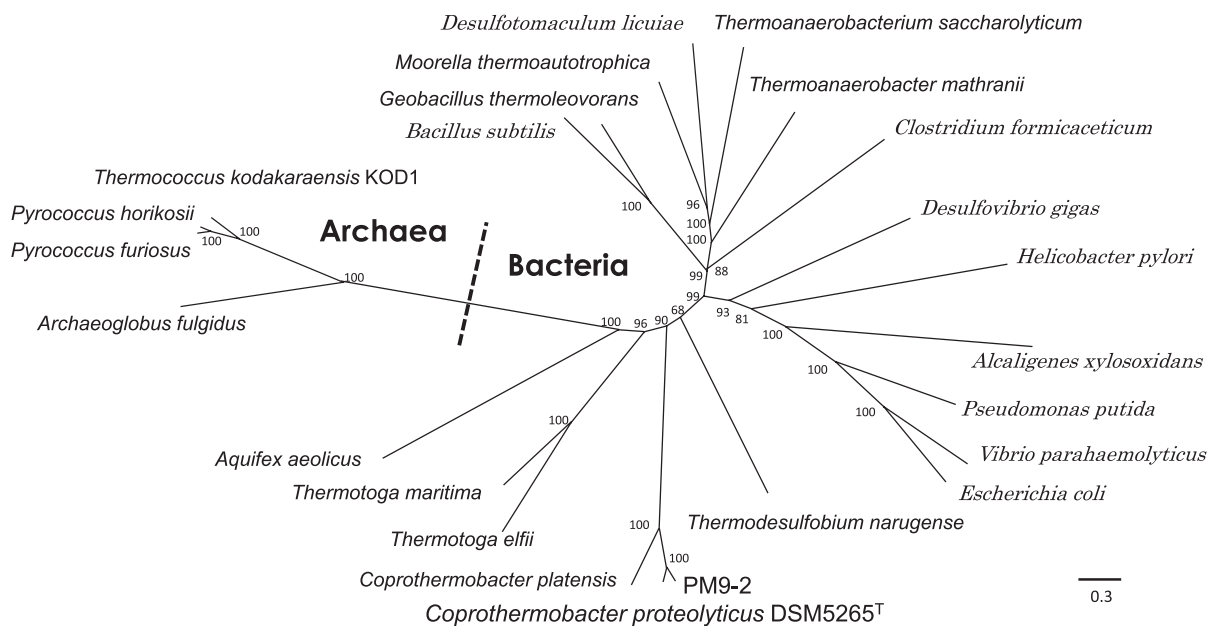


Fig. 2. 16S rRNA に基づいた分子系統樹。

ボールド体は 75°C 以上で生育可能な高度好熱菌および超好熱菌, 数字はブートストラップ値を表わす。Coprothermobacter 属は Thermotoga 属などとともに超好熱性アーキアに近い。

ら海水由来ではなく, プラットフォーム PM9 油田は海洋から隔絶・孤立した環境であることがわかる (Fig. 1)。特に Si が多いことは地殻に含まれる成分が溶け出していると考えられる。さまざまな条件で集積培養した結果, この環境から 3 種類の高度好熱性嫌気性微生物の取得に成功し, その中で最も生育速度の大きいものを PM9-2 と名付けて諸特性解析を行った。PM9-2 は 16S rRNA 遺伝子配列解析の結果, Coprothermobacter 属細菌であることが判明し, 驚いたことにフランスの有機廃棄物の高温メタン発酵槽から単離された Coprothermobacter proteolyticus DSM5265^T と 99.5% の塩基同一性を有していた。PM9-2 の 16S rRNA 遺伝子配列をもとに作成した分子系統樹を Fig. 2 に示す。

Coprothermobacter 属細菌は現在 Coprothermobacter proteolyticus と Coprothermobacter platensis の 2 種が報告されており^{3,4,16}, 報告されているものは PM9-2 株を除いて全て嫌気性高温あるいは中温消化槽 (メタン発酵

槽) から単離されたものである⁵。Coprothermobacter 属細菌は嫌気性メタン発酵槽における初期処理 (タンパク分解期) で頻出し, ある消化槽内では Coprothermobacter 属細菌が全細菌中の 93% を占めているという報告もある^{6,7}。

16S rRNA による系統解析からは Coprothermobacter 属は Firmicutes 門に分類され Thermodesulfobium 属と近縁であるが, あるタンパク質遺伝子や全ゲノム比較によると他の門に分類するのが適当という意見もある¹⁵。実際, C. platensis 3R^T はチオ硫酸還元活性を有している点やグルコースの代謝でアラニンを生産する Pyrococcus furiosus などのアーキアに近い生物が持つ代謝経路を有している点がユニークである³。

今回, 高温海底油田からはじめて単離された PM9-2 は至適生育温度が 65°C の絶対嫌気性高度好熱菌であり, 他の同属細菌と同様に代謝産物として, 水素, 二酸化炭素, 酢酸を発酵生産する。酵母エキスやペプトンなどの

Table 1. *Coprothermobacter proteolyticus* PM9-2 および DSM5265^T とメタン生成アーキア Δ H との共培養。
共培養はメタン生成アーキア用の DSM334 培地に *Coprothermobacter proteolyticus* PM9-2 および DSM5265^T の生育基質としてグルコースと酵母エキスをそれぞれ 10 mM, 1 g/L になるように添加したものをを用いた。

Strains	OD600	CFU/ml	acetate (mg/L)	H ₂ (mg/L)	CO ₂ (g/L)	CH ₄ (mg/L)
PM9-2 single culture	0.187±0.008	1.8×10 ⁸ ±7.4×10 ⁶	637±129	448±29	12.1±1.3	—
DSM5265 ^T single culture	0.145±0.011	1.4×10 ⁸ ±1.1×10 ⁷	383±33	281±9	6.4±0.3	—
PM9-2 & Δ H co-culture	0.229±0.019		450±120	3.1±0.7	10.4±1.3	394±28
Δ H		6.2×10 ⁷ ±5.2×10 ⁶				
PM9-2		3.6×10 ⁸ ±3.1×10 ⁷				
DSM5265 ^T & Δ H co-culture	0.277±0.008		917±35	5.0±2.6	11.9±0.4	437±21
Δ H		7.5×10 ⁷ ±2.0×10 ⁶				
DSM5265 ^T		4.4×10 ⁸ ±1.2×10 ⁷				

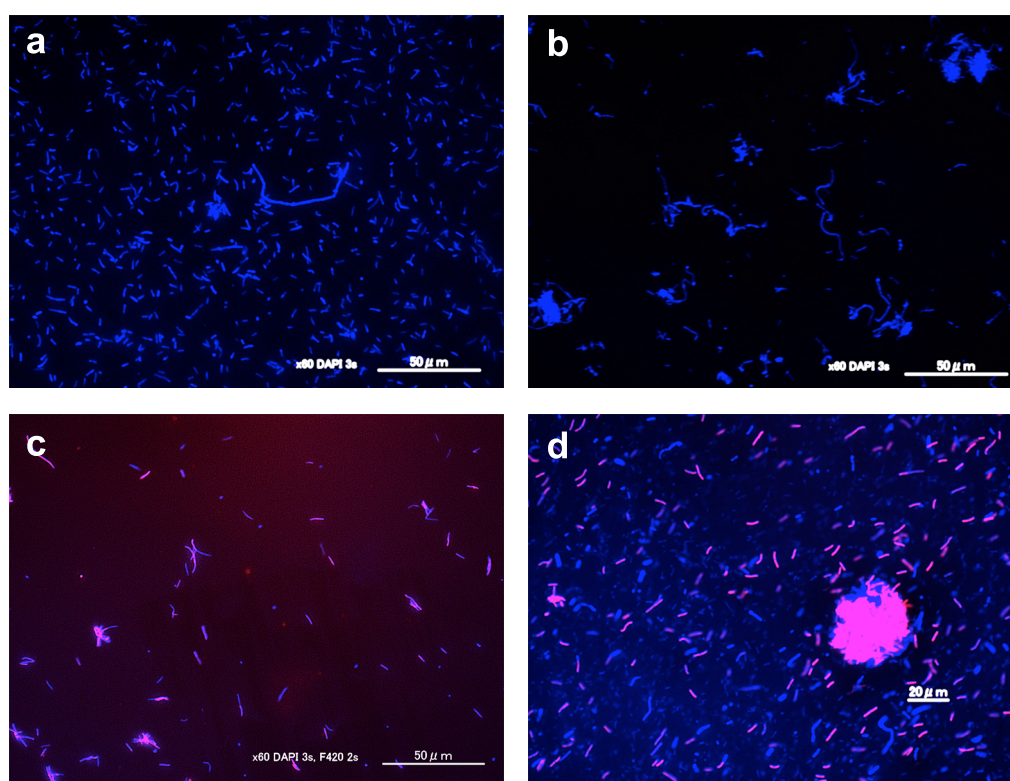


Fig. 3. DAPI 染色および F₄₂₀ 自家蛍光による細胞の観察。

- PM9-2 単独培養 (DAPI)
- DSM5265^T 単独培養 (DAPI)
- Δ H 単独培養 (DAPI&F₄₂₀)
- PM9-2 & Δ H 共培養 (DAPI&F₄₂₀)

タンパク質を含む培地でよく生育する従属栄養細菌であり、炭素源としてグルコースを用いた際に最も効率良く水素を生産したが生育速度の低下が観察された。電力中央研究所のグループによって高温メタン発酵槽から単離された *Coprothermobacter proteolyticus* CT-1 も自身が生産した水素によって生育が阻害され、水素資化性の好熱性メタン生成アーキア *Methanothermobacter thermautotrophicus* Δ H と共培養することによってタンパク質分解が促進されることが報告されている²⁰⁾。そこで、PM9-2 を *M. thermautotrophicus* Δ H と共培養したところ PM9-2 の増殖抑制が改善されるとともに水素の蓄積量は激減し旺盛なメタン生成が認められた (Table 1)。 Δ H との栄養共生によるメタン生産能力は *C. proteolyticus* 標準株 DSM5265^T とほぼ同程度であった。

3. PM9-2 とメタン生成アーキアによる細胞凝集体形成

つぎにこの共培養液を光学顕微鏡で観察したところ、PM9-2 と Δ H の細胞が凝集体を形成している様子が観察された。水素は酸素や二酸化炭素などに比べて水に対する溶存濃度は非常に低く、細胞凝集体を形成することによって細胞間の距離を最小にして水素を介した栄養共生を成功させているものと思われる。

PM9-2 と Δ H を 7 日間共培養して DAPI で核酸を染色し、DAPI-BP filter と CFP filter で観察した画像を重ね合わせ疑似カラー表示したものを Fig. 3 に示す。DAPI 染色では DNA と結合して発した蛍光が青色で観察され、メタン生成菌が持っている固有の補酵素 F₄₂₀ による蛍光は赤色で観察される。そのため PM9-2 の細胞は青

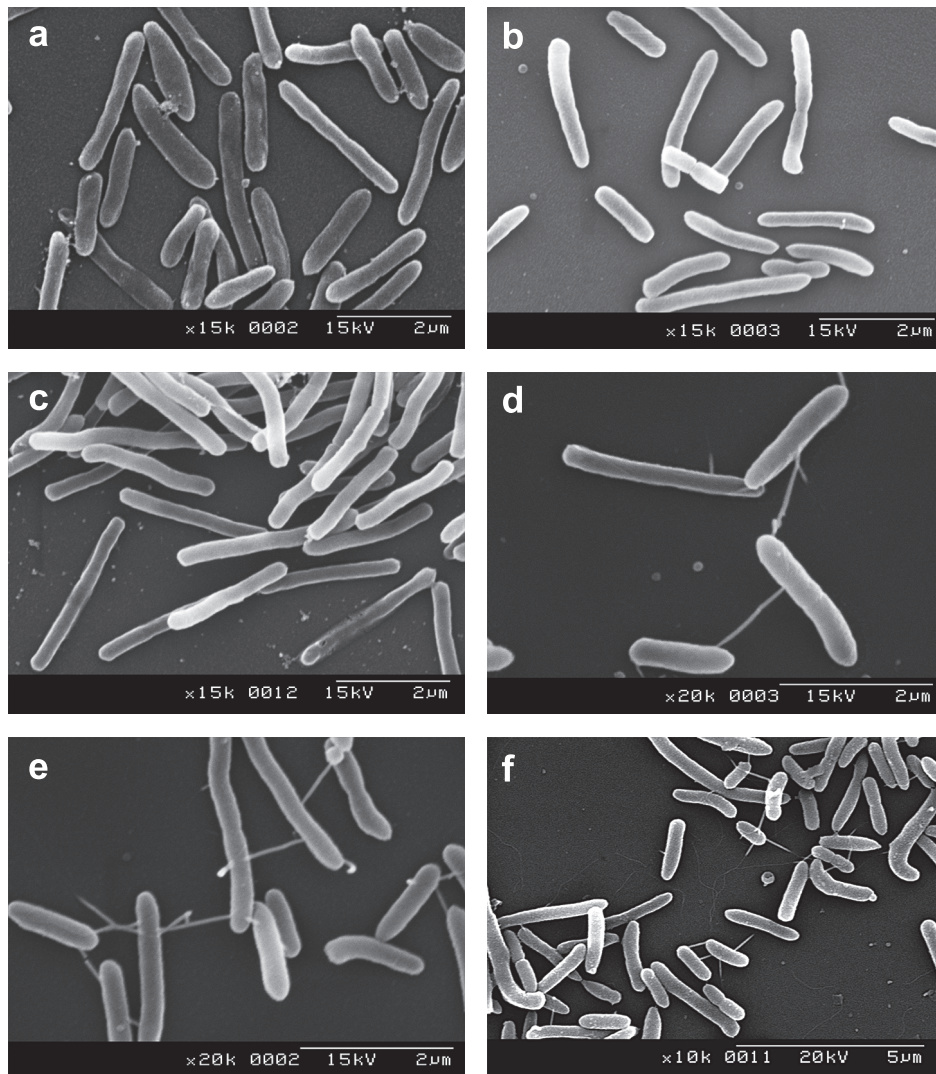


Fig. 4 培養3日目の走査型電子顕微鏡観察。

- PM9-2 単独培養
- DSM5265^T 単独培養
- ΔH 単独培養
- PM9-2 & ΔH 共培養 細胞間にナノワイヤ様の繊維状構造体が見える
- DSM5265^T & ΔH 共培養
- DSM5265^T & ΔH 共培養 (低倍率) ナノワイヤ様構造体とべん毛が見える

色に、ΔHは紫色に観察される。PM9-2, DSM5265^T および ΔH はいずれも単独培養の場合では細胞は分散して生育しているが (Fig. 3a, 3b, 3c), PM9-2 と ΔH 共培養下では凝集体を形成していることが観察された (Fig. 3d)。DSM5265^T と ΔH 共培養においても同様の凝集体が観察された。最も大きな凝集体はおよそ 30 μm × 50 μm 程度の大きさであった。

次に、単独あるいは共培養したそれぞれの細胞を走査型電子顕微鏡で観察した (Fig. 4)。PM9-2 および DSM5265^T と ΔH の細胞はいずれも長桿状で両者を区別することは困難であった。一方、ΔH との共培養において、PM9-2 および DSM5265^T いずれの場合も鞭毛よりも明らかに太く伸張したナノワイヤ様構造体の形成と細胞間連絡が観察された (Fig. 4d, 4e, 4f)。このナノワイヤ様構造体は3日目で最も明瞭に観察することができ、その事徐々に観察されなくなった。

同様のメタン生成アーキアと共生細菌による細胞凝集体とナノワイヤ様構造体形成は渡邊一哉博士 (現在、東京薬科大学) らのグループによってプロピオン酸酸化細菌 *Pelotomaculum thermopropionicum* SI とメタン生成菌 ΔH の共培養時にも報告されている¹⁰⁾。このナノワイヤ様構造体は鞭毛であることが示唆されており、さらには *P. thermopropionicum* (水素生産者) が生産する鞭毛タンパク質 FlhD を培地に添加することによってメタン生成が促進されるという結果からメタン生成アーキアも共生すべき相手を何らかの方法で認識していると考えられている¹⁹⁾。一方、Fig. 4f をよくみるとナノワイヤ様構造体とは別に屈曲した鞭毛も多数観察されており、その太さの違いからこの構造体は鞭毛以外のもので構成されているのではないかと考えている。近年、有機物から取り出した電子を電極に転送できる鉄呼吸 (=還元) 細菌による微生物燃料電池が新たなバイオエネルギーとし

て注目されているが、これらの細菌も電極との間に導電性ナノワイヤを形成していることが知られており、その構成成分は *Geobacter surfurreducens* 細菌では線毛 (pili) であるのに対して、*Shewanella oneidensis* MR-1 においてはチトクロームを豊富に含む外膜およびペリプラズムが伸張したものであり、細菌は非常に多様な種類のナノワイヤを作ることができるようである¹⁹⁾。また、今回の電子顕微鏡観察では確認できなかったが *M. thermautotrophicus* の線毛タンパク質である Mth60 が細胞の凝集や固体への付着に関する接着タンパク質アドヘシンとして機能することも報告されていることもここに記しておきたい²⁰⁾。

残念ながら、PM9-2 起源の油田随伴水からメタン生成菌の単離はできていないが、今回、海底油田から単離された PM9-2 とメタン生成菌において陸性のメタン発酵槽と同様の共生関係が観察されたことから、このようなメタン生成を伴った共生関係は地球上のさまざまな環境において広く分布していることが示唆された。

4. PM9-2 が分泌生産するプロテアーゼ

C. proteolyticus はその名前の通りタンパク質分解活性を有している。そこで、*C. proteolyticus* DSM5265^T と PM9-2 の培養上清について、SDS-PAGE による細胞外タンパク質解析およびゼラチンゲル上においてプロテアーゼ活性染色を行った (Fig. 5a, 5b)。PM9-2 培養上清は 76 kDa 付近にプロテアーゼ活性が観察され、標準株 DSM5265^T はそれよりも大きい 150~200 kDa 付近にプロテアーゼ活性が検出された。このことから PM9-2 は DSM5265^T とは異なるプロテアーゼを細胞外に分泌していることが分かった。前者を以降、“P76 プロテアーゼ”と呼ぶ。また、PM9-2 と DSM5265^T では細胞外タンパク質のパターンも異なっていた。PM9-2 が生産す

る主要な細胞外タンパク質 75 kDa が P76 プロテアーゼである可能性を調べるために、タンパク質バンドを切り出して PVDF 膜に転写した後エドマン分解法によって N 末端アミノ酸配列を解析した結果、これはプロテアーゼではなく細胞表層を覆っている S-layer protein であることが分かった。

P76 プロテアーゼの培地中への生産量は多くなく、精製することが困難であったため、PM9-2 のドラフトゲノム (1,392,495 bp : *C. proteolyticus* DSM5265^T の全ゲノム 1,424,912 bp の 97.7% に相当) からプロテアーゼと推測される ORF を検索した結果、分泌型すなわち N 末端にシグナルペプチドを持ち、推定分子量が 70 kDa を超えるものは NODE4_cov51_5526_9044 遺伝子産物 “Peptidase S8 and S53, subtilisin, kexin, sedolisin” (1,172 amino acids) だけであり、シグナルペプチドを除いた成熟タンパク質の分子量は 121 kDa と推定された。培養上清の SDS-PAGE によるタンパク質バンドの推定分子量 76 kDa との違いは、多くのプロテアーゼが N 末端領域に保有するプロセシブ配列が切断除去されるいわゆるプロセッシングによるものではないかと予想している。この NODE4_cov51_5526_9044 遺伝子 ORF を pET vector system を用いて大腸菌内で大量発現した結果、菌体内画分および菌体外画分いずれにおいてもプロテアーゼ活性が検出された。IPTG 添加による遺伝子発現誘導後 0~18 時間のサンプルのプロテアーゼ活性を測定するとともに SDS-PAGE によるタンパク質発現解析を行った (Fig. 6)。IPTG 添加 2 時間後から菌体内画分においてプロテアーゼ活性が確認できた。その後、菌体内プロテアーゼ活性は 4 時間以降 18 時間まで徐々に減少していくのに対して菌体外のプロテアーゼ活性は IPTG 添加後 18 時間まで徐々に増加した。SDS-PAGE 解析では菌体内において 250 kDa 付近のタンパク質 (二量体?) と 44 kDa 付近のタンパク質が誘導時間とともに増加していた

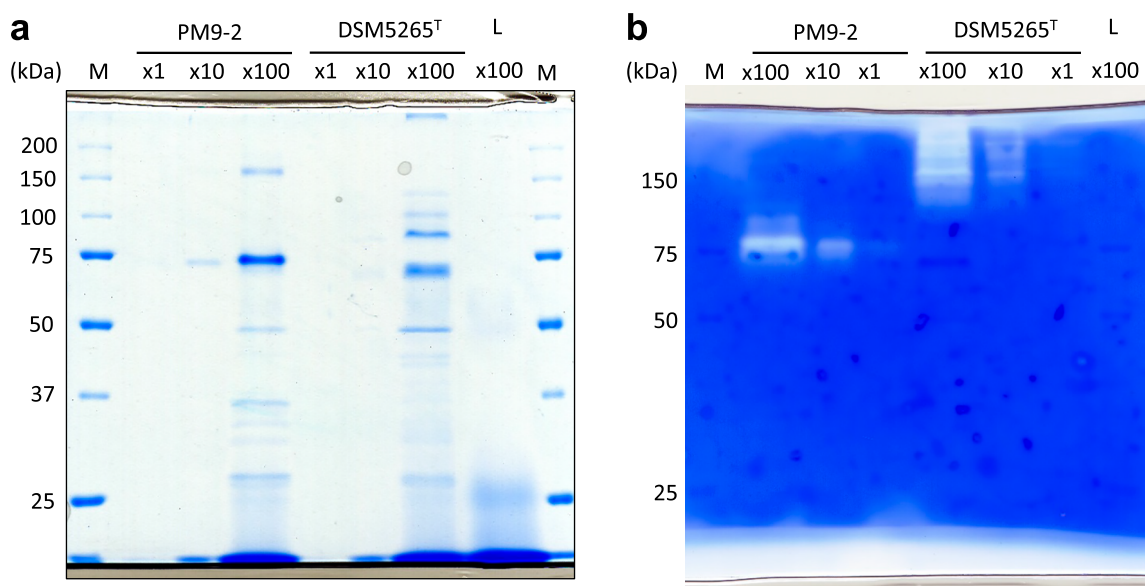


Fig. 5. PM9-2 と DSM5265^T の菌体外タンパク質および菌体外プロテアーゼ活性の解析。

- a. 菌体外タンパク質の SDS-PAGE ×1: 培養上清原液 ×10: 10 倍濃縮液 ×100: 100 倍濃縮液
 b. 菌体外プロテアーゼの活性染色 ×1: 培養上清原液 ×10: 10 倍濃縮液 ×100: 100 倍濃縮液 PM9-2: PM9-2 の培養上清濃縮液 DSM5265^T: DSM5265^T の培養上清濃縮液 L: 培地濃縮液 M: タンパク分子量マーカー

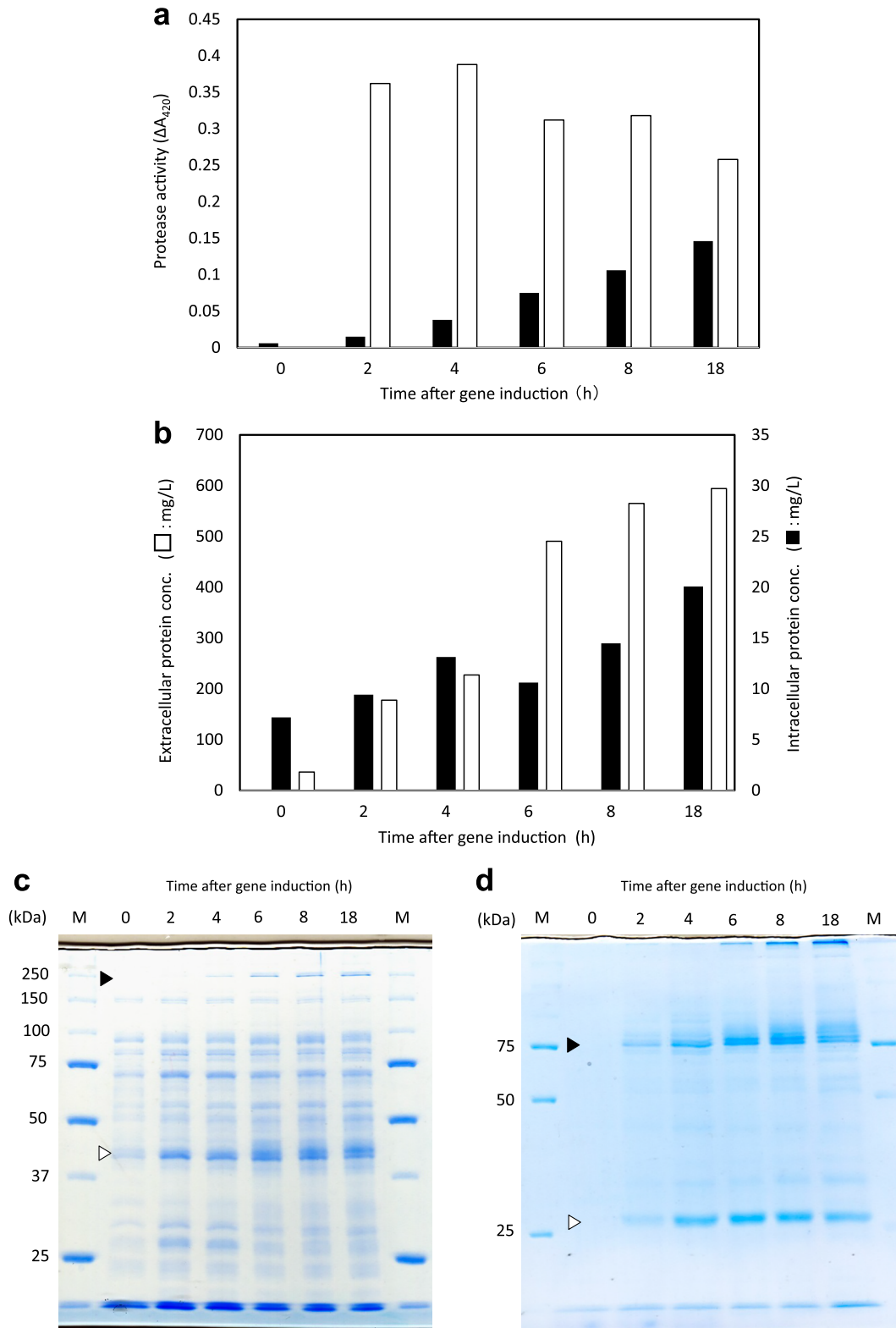


Fig. 6. 大腸菌における NODE4_cov51_5526_9044 (P76 プロテアーゼ) 遺伝子発現誘導の経時変化 .

- a. プロテアーゼ活性の経時変化 □: 培養上清 10 倍濃縮液 ■: 全菌体 10 倍濃縮液
 b. タンパク濃度の経時変化 □: 菌体外画分 (培養上清) ■: 菌体内画分 (全菌体)
 c. 菌体内タンパク質 (全菌体) の SDS-PAGE ▲, △: 誘導されたタンパク質
 d. 菌体外タンパク質 (培養上清) の SDS-PAGE ▲, △: 誘導されたタンパク質

(Fig. 6c)。一方、培養上清 (Fig. 6d) では 76 kDa 付近のタンパク質が誘導時間に従って増加していた。これは、NODE4_cov51_5526_9044 遺伝子産物が大腸菌においてもシグナルペプチドの切断およびプロ領域のプロセシングが起こり、P76 プロテアーゼとして分泌されていることを示唆する。27 kDa 付近にも誘導時間に伴って増加するタンパク質バンドが見られるがこれは P76 プロテアーゼの自己分解による産物の可能性があると考えている。

P76 プロテアーゼ発現株の培養上清をアセトン沈殿、熱処理、疎水性相互作用クロマトグラフィーによって酵素の精製を試みた。2 倍量の氷冷アセトンによる沈殿濃縮後も 64% の活性を有していたことから本酵素は有機溶媒に対して耐性のあるプロテアーゼといえる。ほぼ単一のタンパク質まで精製したサンプルを用いて P76 プロテアーゼの特性解析を行った。その結果、反応最適温度は 70°C であった。また、pH 7~10 の範囲でほぼ同程度の活性を持つことがわかった。65°C 60 分間処理後も 90% 程度の活性を維持し、活性の半減期は 90°C 15 分付近であった。つぎに様々な添加物を 5 mM の濃度で加えたときのプロテアーゼ活性の変化を調べた。二価金属イオンのうち塩化カルシウムを加えた場合 32% 活性が増加した。プロテアーゼ阻害剤についてはセリンプロテアーゼ阻害剤である PMSF によって活性が減少したが、その阻害の程度は低く約 80% の活性が残存していた。さらに驚くべきことに非イオン界面活性剤である Triton X-100 あるいは Tween 20 を添加した場合に活性がそれぞれ 5.2 倍および 1.4 倍に上昇した。一方で陰イオン性界面活性剤である SDS によって活性は約 40% まで減少した。興味深いことにメタン発酵槽から単離された *C. proteolyticus* DSM5265^T もやはりドラフトゲノムに見つかった候補遺伝子の大腸菌での異種発現によって有機溶媒や界面活性剤に耐性をもつ subtilisin-family に属する分子量 44 kDa のセリンプロテアーゼ “Proteolysin” (WP_012544358) を分泌生産していることが示唆されている²¹⁾。しかしながら、今回 Fig. 5b において DSM5265^T 培養上清に検出されたプロテアーゼ活性の分子量が 44 kDa よりもはるかに大きな分子量 150 kDa < であったことは、DSM5265^T のドラフトゲノムに存在するもう一つの推定分子量 195 kDa の subtilisin-family protease (WP_012543598, 1,851 amino acids) が実際に生産している主要プロテアーゼである可能性が高い。P76 プロテアーゼと WP_012543598 プロテアーゼは分子量こそ異なるが、その一次構造を比較するとほぼ全長にわたって 66% のアミノ酸配列同一性を有していた。すなわち、人為的な高温メタン発酵槽と地表から隔離した海底油田環境において、同種の祖先型 subtilisin-family protease がそれぞれの環境に応じて分散型の進化を遂げたことが示唆される¹³⁾。今回は残念ながら、油田随伴水の菌叢解析や有機物量分析はできなかったが、高温海底油田も意外に豊かな微生物圏を育てている環境なのかも知れない。

5. 総 括

本研究では南シナ海の高熱海底油田随伴水から絶対嫌気性高度好熱菌 *Coprothermobacter proteolyticus* PM9-2

を単離し、その諸特性解析によって海底油田における微生物間相互作用および物質循環を示唆する情報を得ることができた。PM9-2 はナノワイヤ様構造体や細胞外多糖類を介して好熱性メタン生成菌 *Methanothermobacter thermautotrophicus* ΔH と細胞凝集体を形成し、有機物代謝によって生成した水素を介した栄養共生によってメタン生成プロセスに貢献し得ることを確認した。また、PM9-2 は海底油田随伴水中に有機溶媒や界面活性剤などに耐性を有するプロテアーゼを分泌生産していると考えられ、本酵素によってタンパク質をより利用しやすいペプチドにまで分解して自身や他の微生物群に炭素源や窒素源を供給していると考えられる。

謝 辞

Methanothermobacter thermautotrophicus ΔH を提供頂くとともに、さまざまな助言を賜りました産業技術総合研究所鎌形洋一博士、加藤創一郎博士に感謝申し上げます。

また、N 末端アミノ酸配列解析および質量分析は北海道大学グローバルファシリティセンターにて行なわれたものである。

文 献

- 1) Brown, L.R. 2010. Microbial enhanced oil recovery (MEOR). *Curr. Opin. Microbiol.* 13: 316–320.
- 2) Dahle, H., F. Garshol, M. Madsen, and N. Birkenland. 2008. Microbial community structure analysis of produced water from a high-temperature North Sea oil-field. *Antonie van Leeuwenhoek.* 93: 37–49.
- 3) Etchebehere, C. and L. Muxi. 2000. Thiosulfate reduction and alanine production in glucose fermentation by members of the genus *Coprothermobacter*. *Antonie van Leeuwenhoek.* 77: 321–327.
- 4) Etchebehere, C., M.E. Pavan, J. Zorzopulos, M. Soubes, and L. Muxi. 1998. *Coprothermobacter platensis* sp. nov., a new anaerobic proteolytic bacterium isolated from an anaerobic mesophilic sludge. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48: 1297–1304.
- 5) Gagliano, M.C., C.M. Braguglia, M. Petruccioli, and S. Rossetti. 2015. Ecology and biotechnological potential of the thermophilic *Coprothermobacter* spp. *FEMS Microbiol. Ecol.* 91: fiv018.
- 6) Gagliano, M.C., C.M. Braguglia, and S. Rossetti. 2014. *In situ* identification of the syntrophic protein fermentative *Coprothermobacter* spp. involved in the thermophilic anaerobic digestion process. *FEMS Microbiol. Lett.* 358: 55–63.
- 7) Gianico, A., C. Braguglia, R. Cesarini, and G. Mininni. 2013. Reduced temperature hydrolysis at 134°C before thermophilic anaerobic digestion of waste activated sludge at increasing organic load. *Bioresour. Technol.* 143: 96–103.
- 8) Gieg, L.M., R.R. Jack, and J.M. Foght. 2011. Biological souring and mitigation in oil reservoirs. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 92: 263–282.
- 9) Inagaki, F., K.U. Hinrichs, et al. 2015. Exploring deep microbial life in coal-bearing sediment down to ~2.5 km below the ocean floor. *Science* 349: 420–424.
- 10) Ishii, S., T. Kosaka, K. Hori, Y. Hotta, and K. Watanabe. 2005. Coaggregation facilitates interspecies hydrogen transfer between *Pelotomaculum thermopropionicum* and *Methanothermobacter thermautotrophicus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 7838–7845.
- 11) Li, D., D.J. Midgeley, J.P. Ross, Y. Oytam, G.C.J. Abell, H.

- Volk, W.A.W. Duad, and P. Hendry. 2012. Microbial biodiversity in a Malaysian oil field and a systematic comparison with oil reservoirs worldwide. *Arch. Microbiol.* 194: 513–523.
- 12) Liszka, M., M. Clark, E. Schneider, and D. Clark. 2012. Nature versus nurture: developing enzymes that function under extreme conditions. *Annu. Rev. Chem. Biomol. Eng.* 3: 77–102.
- 13) Lovley, D.R. and N.S. Malvankar. 2015. Seeing is believing: novel imaging techniques help clarify microbial nanowire structure and function. *Environ. Microbiol.* 17: 2209–2215.
- 14) Magot, M., B. Ollivier, and B.K.C. Patel. 2000. Microbiology of petroleum reservoirs. *Antonie van Leeuwenhoek.* 77: 103–116.
- 15) Nishida, H., T. Beppu, and K. Ueda. 2011. Whole-genome comparison clarifies close phylogenetic relationships between the phyla Dictyoglomi and Thermotogae. *Genomics.* 98: 370–375.
- 16) Ollivier, B.M., R.A. Mar, T.J. Ferguson, D.R. Boone, J.L. Garcia, and R. Robinson. 1985. Emendation of the Genus *Thermobacteroides*: *Thermobacteroides proteolyticus* sp. nov., a Proteolytic Acetogen from a Methanogenic Enrichment. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 35: 425–428.
- 17) Orphan, V.J., L.T. Taylor, D. Hafenbradl, and E.F. Delong. 2000. Culture-dependent and culture-independent characterization of microbial assemblages associated with high-temperature petroleum reservoirs. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 700–711.
- 18) Pham, V.D., L.L. Hnatow, S. Zhang, R.D. Fallon, S.C. Jackson, J. Tomb, E.F. Delong, and S.J. Keeler. 2009. Characterizing microbial diversity in production water from and Alaskan mesothermic petroleum reservoir with two independent molecular methods. *Environ. Microbiol.* 11: 176–187.
- 19) Shimoyama, T., S. Kato, S. Ishii, and K. Watanabe. 2009. Flagellum Mediates Symbiosis. *Science.* 323: 1574.
- 20) Thoma, C., M. Frank, R. Rachel, S. Schmid, D. Nather, G. Wanner, and R. Wirth. 2008. The Mth60 fimbriae of *Methanothermobacter thermoautotrophicus* are functional adhesins. *Environ. Microbiol.* 10: 2785–2795.
- 21) Toplak, A., B. Wu, F. Fusetil, P. Quaedflieg, and D. Janssen. 2013. Proteolysin, a novel highly thermostable and cosolvent-compatible protease from the thermophilic bacterium *Coprothermobacter proteolyticus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 79: 5625–5632.
- 22) van der Kraan, G.M., J. Bruining, B.P. Lomans, M.C. van Loosdrecht, and G. Muyzer. 2010. Microbial diversity of an oil-water processing site and its associated oil field: the possible role of microorganisms as information carriers from oil-associated environments. *FEMS Microbiol. Ecol.* 71: 428–443.