

令和 6 年 5 月 17 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K04961

研究課題名（和文）微生物トレーサ法を地下資源開発に適用する技術基盤の確立

研究課題名（英文）Study of technological basis for application of microbial monitoring in subsurface resource exploration

研究代表者

小林 肇（Kobayashi, Hajime）

東京大学・大学院工学系研究科（工学部）・准教授

研究者番号：50549269

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：微生物DNAを指標とするモニタリング手法「微生物トレーサ法」は環境モニタリングのための有望な技術である。本研究では、この技術の地下資源開発での適用可能性を検証するため、国内の操業中の油田での実証研究を世界で初めて行なった。秋田県の申川油田で、9つの生産井と2つの圧入井から3年間継続的にサンプリングし、生産された地層水や圧入水に含まれる微生物叢を分析した。各試料からDNAを抽出し、試料中の微生物叢を解析した。これら結果から、各貯留層の生産への寄与度、断層による遮蔽、井戸間の導通性および圧入水のブレイクスルーなどについて原位置の情報が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は微生物トレーサ法の油田における世界初の長期実証研究であり、石油・天然ガスなど地下資源の開発における同手法の有用性が示された。地層水など地下から採取した試料に含まれる微生物叢を分析することで、地下の地層構造や流体の流動、微生物代謝など有用な情報が得られる事が示され、新規の地下環境モニタリング手法の技術基盤が確立された。

研究成果の概要（英文）：Microbial DNA-based monitoring is a promising tool for environmental monitoring. To assess applicability of this tool on subsurface resource developments, this study applied microbial DNA-based monitoring to an operating oilfield in Japan. Fluid samples were collected periodically from nine production wells and two injection wells in the Sarukawa oilfield (Akita prefecture) for three years. DNA was extracted from the samples, and the microbial composition was analyzed. A comparative analysis of the microbial profiles suggested possible contribution of each reservoir formation to production, reservoir compartmentation by faults, well connectivity and water breakthrough, demonstrating that microbial DNA-based monitoring can provide useful information for subsurface resource developments.

研究分野：微生物工学

キーワード：資源開発 石油 貯留層 モニタリング トレーサー 環境微生物

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) “微生物叢”とは微生物の集合のことであり、地球のほぼ全ての環境に遍在している。細菌など多様な種によって構成されており、それら種の種別や数は生息する環境ごとに異なっている。「微生物トレーサ法」は、この微生物叢を“追跡指標”として利用する環境モニタリング手法である。この手法では、対象の環境から採取した試料(水など)から DNA を抽出、その塩基配列を解読して、試料に含まれる微生物叢の“組成”(どのような種が、どのような割合で含まれているか)を分析する。DNA 塩基配列解読に PCR を介するため感度が極めて高く、試料(環境)にもともと含まれている(人工的に加えたものではない)微生物叢を指標とするため環境影響が無い。公衆衛生や水管理の分野では、河川等の糞便汚染源や水みちの特定に広く利用されている。

(2) 研究開始当初、微生物トレーサ法の地下環境への適用は限定的であった。先行研究は、国外では、米国の油田、シェールガス田および帯水層(科学掘削)における報告が数件あった。国内では、本研究の予備研究である水溶性ガス田での報告が 1 件あるのみであった(引用文献)。この予備研究を通し、地層水や圧入水などに含まれる微生物叢の分析から、坑井間の導通性や貯留層の深度など、地下環境の情報が得られることが示されていた(図 1)。さらに、地表水の混入や微生物反応の示唆など、既存のトレーサ試験では得られない原位置の情報も得られ、微生物トレーサ法の地下環境のモニタリングにおける有用性が示唆されていた。

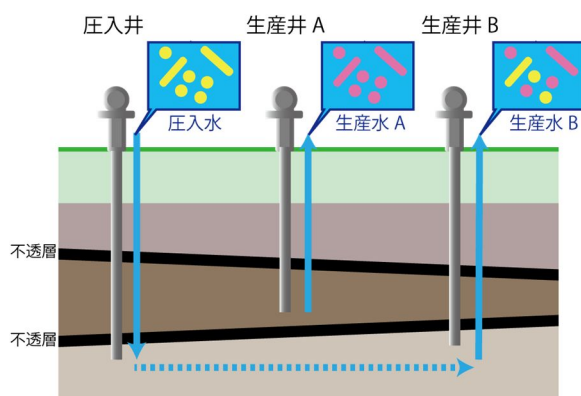


図 1 微生物トレーサ法による坑井間の導通性の推定の概念図。圧入井と同じ地層内にある生産井 B の生産水の微生物叢からは、圧入水に含まれる地上に固有の種も検出される。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、微生物トレーサ法の地下環境への適用、特に油田など地下資源の開発における適用の可能性を検証することを目的に、国内の油田における長期の実証試験を行った。具体的には、国内の在来型の成熟した油田である秋田県の申川油田から水試料(地層水および圧入水)を採取し、それら試料に含まれる微生物叢の組成を比較解析することで、同油田の操業向上に資する地下の原位置情報を取得することを目指した。

3. 研究の方法

(1) 水試料のサンプリング：申川油田の 13 地点(圧入井および生産井)で試料を採取し実験に供した。滅菌したポリプロピレン容器に試料を 500 mL ほど取得、フィルター濾過により試料中の微生物を回収して -20 で保存した。

(2) DNA の抽出：DNeasy PowerWater Kit (QIAGEN 社)を用いて DNA を抽出した。得られた DNA 溶液をさらに NucleoSpin gDNA Clean-up Kit (Macherey Nagel 社)を用いて濃縮し、終濃度が数~数 10 ng/ μ L の DNA 溶液 20 μ L を得た。

(3) 16S rRNA 遺伝子の増幅：水試料から抽出した DNA を鋳型として、マーカー遺伝子である 16S rRNA 遺伝子を PCR により増幅した。本実験では、幅広い微生物種の情報を一度の解析で得ることを目的に、細菌と古細菌両方の認識が可能であるユニバーサルプライマー U789F (5' - AGATACCCBGGTAGTCC - 3') と U1068R (5' - CTGACGRCRRCCATGC - 3') のペアを用いた。このプライマーは 16S rRNA 遺伝子に含まれている、V1-V9 の超可変領域のうち、V6 領域を標的としている。

(4) DNA 塩基配列の解読とアノテーション：PCR により得られた配列を MiSeq2500 (Illumina 社)により網羅的に解読した。次世代シーケンサー解析によって得られた DNA 塩基配列データを分子系統学的な微生物叢解析に供した。次世代シーケンサーによる出力データは数万もの 16S rRNA 遺伝子の標的領域の DNA 配列なので、バイオインフォマティクス解析により、統計的解析が可能な解析用の微生物叢データを作成する必要がある。本解析では、バイオインフォマティクスプラットフォーム QIIME 2 を用いた。QIIME 2 では、配列データの前処理(解析に不要な配列の除去等、ペアエンドリードの結合、メタデータファイルの作成)、配列の相同性によるクラスタリング、系統型(OTU)の作成、OTU の既知微生物種との類似性による分類アノテーション、分類アノテーションによるスーパークラスターの作成、解析用データの作成を行なった。

(5) 微生物叢の比較解析：QIIME 2 によって得られた解析データを用いて、サンプル内の生物多様性を評価する多様性指数の算出と、微生物叢間の類似性を比較するコサイン類似度の算出、微生物叢間の相違度を比較するジャッカド距離の算出、微生物種の比較をするクラスタリング解析を行った。クラスタリング解析では、k-means++法を用いたクラスタリングを行なった。k-means++法は非階層型クラスタリング手法であり、データ群を与えられたクラスター数(k)に分類するアルゴリズムである。クラスター数はエルボー法により決定した。

4. 研究成果

(1) 申川油田は 1959 年から生産が続けられている成熟した油田で、これまでに 100 本以上の井戸が掘削されている。原油は基本的に溶解ガス押し機構により駆動されて生産されている。現在稼働中の坑井は、ほとんどがコミングルの複数層仕上げで、間欠ガスリフトによる採収を行っている。1970 年より水攻法を実施し、2000 年初頭時点で回収率 40%を超える良好な原油回収率を得ている。水攻法の開始当初は海水を圧入していたが、現在は生産された地層水を集油所で集めて処理した後に圧入している。貯留層は断層が卓越した複雑な構造を有しており、海岸沿いに陸域から浅海へ跨る油田であるため地震波探査が適応できず、各層の導通性など地下挙動の把握が困難な状況にある。さらに、生産の歴史が長いことから層変更や生産・圧入切り替えなど多岐に渡り、生産量の各貯留層への配分や水攻法の掃攻効率に課題が残る状況となっている。本研究では、微生物トレーサー法を用いて、地下流体挙動の把握と水攻法の操業最適化に資する地下の原位置情報の取得を行った(引用文献)。

(2) 約 3 年の間、9 つの生産井 (P-1~8 および申川油田近傍の福米沢油田の井戸 P-9) および 2 つの圧入井 (I-1~2) から試料 (原油に伴って生産された地層水、および圧入水) を継続的に採取した。各試料から DNA を抽出し、試料中の微生物叢を 16S rRNA 遺伝子を指標として解析した。全体的に、地層水の微生物叢は古細菌、特に絶対嫌気性のメタン生成古細菌 (メタン菌) が主要な構成種であった。一方、圧入水中の微生物叢は、冬に採取された試料以外は、主として細菌種で占められていた。

(3) コサイン類似度およびジャッカド距離により、各試料の微生物叢プロファイル間の類似性および不同性を比較した。全体として、コサイン類似度とジャッカド距離の結果は良好な一致を見せた。そこで、微生物叢プロファイル間のコサイン類似度の群平均法による凝集により、各試料をクラスタリングした (図 2)。

(4) 圧入水の試料は 3 つのクラスター (I1~I3) に分類された。全体的に、地層水と圧入水では顕著に異なっており、クラスター I2 と I3 は圧入流体と顕著に離れており、地表環境に見られる好気性の細菌種が多く検出された。特に、クラスター I2 の圧入水では好気性の土壌細菌である *Pseudomonas* 属細菌種の卓越が見られた。一方、クラスター I1 (古細菌種が比較的多く検出された) は地層水と比較的近づいた。クラスター I1 は冬期 (2021 年 2 月) に採取された圧入水で形成されている。申川油田では、生産流体から原油を分離した後の地層水を処理したものを圧入水としている。冬期は地上の気温が低いため、地層水中の微生物が分解されることがなく残り、また地上の環境で微生物がほとんど増殖しなかったことが原因と考えられる。以上のことから、圧入水に含まれる微生物叢は時間的に変動していることが示唆された。

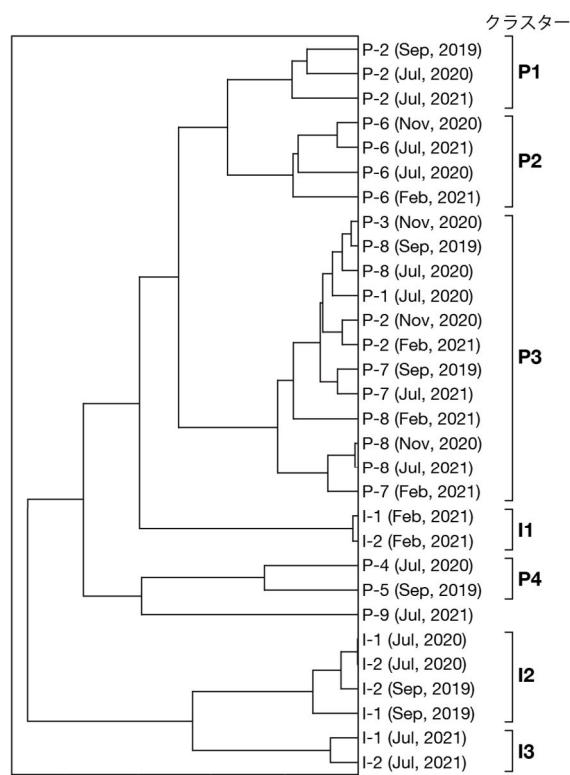


図 2 コサイン類似度に基づいた群平均法による凝集による申川油田水試料の微生物叢のクラスタリング (引用文献)

(5) 地層水のサンプルは 4 つのクラスター (P1~P4) に分類された。クラスター P1 は一つの生産井 (生産井 P-2) から採取された地層水の試料の一部から構成されていた。クラスター P2 は一つの生産井 (生産井 P-6) から採取された地層水の全ての試料で構成されていた。クラスター P3 は生産井 P-1、P-2 (一部)、P-3、P-7 および P-8 の生産水サンプルから成る。

(6) クラスター P1 と P2 では、クラスター P3 に比べ、古細菌中に Methanobacteriales 目のメ

タン菌 (*Methanobacterium* 属および *Methanothermobacter* 属) が占める割合が多かった。特に、クラスターP1 では好熱性 (増殖可能温度域 50 ~ 70 °C、至適増殖温度 60 °C) の *Methanothermobacter* 属の種が多く検出されていることから、クラスターP1 の試料は比較的高温の (すなわち、深度が深い) 環境に由来することが示唆される。クラスターP2 は生産井 P-6 から採取された試料のみで構成されている。クラスターP2 (生産井 P-6) のみで検出されている微生物種 (*Thermacetogenium phaeum* など) も多く、生産井 P-6 は独立した貯留層区画から生産していることが示唆された。地質の見地でもこの説は妥当である。一方、クラスターP3 では、古細菌中の *Methanolobus* 属の種が占める割合が多い。*Methanolobus* 属のメタン菌は増殖可能温度域 25 ~ 50 °C、至適増殖温度 40 °C 付近であり、比較的浅い貯留層の地層水から多く検出されるという結果は妥当と思われる。したがって、*Methanolobus* 属のメタン菌は比較的浅部の貯留層に特徴的な微生物種と考えられる。クラスターP4 は生産井 P-4 と P-5 に由来する試料から成る。両方とも生産停止となっている井戸であり、生産が停止した井戸近傍の環境を代表する微生物叢と考えられる。

(7) 上記の結果から、各クラスターとサンプル種別 (地層水または圧入水) や地層、井戸の位置などに大まかな相関があることが示され、微生物叢がその試料の由来する環境 (地層等) のマーカーとして利用できることが示唆された。生産井 P-2 については、地層水試料が時期によってクラスターP1 と P3 の二つのクラスターに分類された。これは、時期によって *Methanolobus* 属のメタン菌が検出された割合が大きく異なることに起因する。生産井 P-2 は浅部の貯留層群および深部の貯留層から生産している。同井戸の地層水がクラスターP2 に分類された時期は浅部の貯留層群から生産される割合が一時的に増加した可能性が示唆される。その原因の一つとして、同井戸はその時期に改修作業を受けていたことが考えられる。

(8) 興味深いことに、圧入水の試料で *Pseudomonas* 属細菌種の卓越が見られたのと同時期に採取された生産井 P-2、P-6 および P-8 の地層水からも *Pseudomonas* 属細菌が検出された。*Pseudomonas* 属の細菌は中温性の好気性菌であり、地下の環境では増殖しない。したがって、この結果はこれら生産井への (*Pseudomonas* 属の細菌を多く含む) 圧入水の導通の可能性を示唆するものと考えられる。本結果をもとに、申川油田では、主要な生産井へ影響しない水攻法の最適化が達成された。しかし、地層水から圧入水中の *Pseudomonas* 属細菌の確認はできたが、圧入水の区別 (それぞれの生産井で検出された *Pseudomonas* 属細菌がどの圧入井に由来するものか) は出来なかった。

(9) 以上より、掘削時の微生物叢データが存在しない成熟した油田においても、微生物トレーサ法による地下の導通性や流体挙動の推測が可能であり、操業中の油・ガス田における同手法の有用性が示唆された。微生物トレーサ法の地下環境のモニタリングにおける利用可能性をさらに検証するため、他の油・ガス田や地下施設で同手法の実証試験を行った。これら環境についても、微生物代謝や地表由来の水の混入可能性など、有用な示唆が得られている (論文準備中)。

(10) また、従来のトレーサ手法と比較しての、微生物トレーサ法の利点と課題が示された: 従来の自然トレーサ (無機溶存イオン、微量成分、同位体元素など) と比べ感度が高く、高密度の情報得られる。人工トレーサ (フッ化安息香酸類など) と比べ低コスト・省力で、坑井間の導通性や地下の不均質性、さらに微生物反応などの情報が得られる。一方、坑井間の特異的な導通性や実流速、浸透率、残留原油飽和率の測定は依然として人工トレーサのみ可能である。そこで微生物トレーサ法でより高解像度の情報を得るための方法論を検討した。試料の微生物叢の比較解析の手法として、Aitchison 距離に基づいた Ward 法によるクラスタリングを新たに導入したところ、クラスタリングの精度を向上することが出来た (論文準備中)。さらに、微生物トレーサ法と並行して、無機溶存イオンの分析を行ったところ、複数のトレーサの同時分析によってより高解像度の情報が得られることが示唆された (論文準備中)。今後、これらの知見に基づいて微生物トレーサ法をさらに発展させ、高解像度の地下環境の原位置情報を簡単に測定できる革新的な地下環境モニタリング技術を開発する。

<引用文献>

- 小林肇、宮本寛之、渡辺駿一、佐藤光三、岩間弘樹、米林英治、油ガス田における微生物源追跡技術の利用、石油技術協会誌、85 巻、2020、149-156
Hajime Kobayashi, Ayae Goto, Xiang Feng, Katsumasa Uruma, Yuki Momoi, Shunichi Watanabe, Kozo Sato, Yuran Zhang, Roland N. Horne, Takefumi Shibuya and Yoshiyuki Okano, Long-term microbial DNA-based monitoring of the mature Sarukawa oilfield in Japan, SPE Reservoir Evaluation Eng, Vol. 3, 2023, 1110-9.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kobayashi H., Goto A., Feng X., Uruma K., Momoi Y., Watanabe S., Sato K., Zhang Y., Horne R. N., Shibuya T., Okano Y.	4. 巻 26
2. 論文標題 Long-Term Microbial DNA-Based Monitoring of the Mature Sarukawa Oil Field in Japan	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 SPE Reservoir Evaluation & Engineering	6. 最初と最後の頁 1~10
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2118/214313-PA	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 後藤彩恵・漆間功真・桃井勇輝・渡辺駿一・渋谷岳史・岡野祥之・佐藤光三・小林肇
2. 発表標題 DNAを用いた長期バイオモニタリング、申川油田の事例紹介
3. 学会等名 石油技術協会春季講演会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

小林研究室webページ https://sites.google.com/site/hajimekobayashisys/home
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	徳永 朋祥 (Tokunaga Tomochika)		

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	山本 浩士 (Yamamoto Hiroshi)		
研究協力者	後藤 彩恵 (Goto Ayae)		
研究協力者	田中 啓 (Tanaka Kei)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
米国	スタンフォード大学			
中国	精華大学			