

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25289333

研究課題名(和文) 生物的原油分解メタン生成ポテンシャルとメカニズムに着目した油層特性評価技術の開発

研究課題名(英文) Development of technology to assess oil reservoir characteristics with attention focused on methanogenic crude oil biodegradation potential and mechanism

研究代表者

坂田 将 (Sakata, Susumu)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・地圏資源環境研究部門・研究グループ長

研究者番号：70357101

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：国内油田を対象として原油生分解メタン生成の地球化学的痕跡を調査した結果生産ガス中のCO₂、プロパン、n-ブタンが¹³Cに富み、原油中のn-アルカンがi-アルカンより少ない油田が見出され、油層を模擬する温度圧力条件でその原油と水を長期間培養した結果、顕著なメタン生成が観察された。¹³C-トレーサー実験や炭化水素組成分析の結果、トルエン等のアルキルベンゼン類がメタンの主たる根源物質と推定され、メタゲノム解析の結果、優占するバクテリアがアルキルベンゼン類を分解する酵素を持つと推定された。原油生分解の地球化学的痕跡を有する油田において、油層内微生物が原油をメタンに変換していることが実証された。

研究成果の概要(英文)：Exploration of geochemical signatures for methanogenic crude oil degradation in domestic oilfields revealed that some of the domestic oilfields were characterized by the enrichment of ¹³C in CO₂, propane and n-butane in the gas and the depletion of n-alkanes relative to i-alkanes in the oil, and a significant methane production was observed in a long-term incubation of the production water and crude oil under the condition mimicking temperature and pressure of the oil reservoir. ¹³C-tracer experiment and hydrocarbon composition analysis suggested that alkylbenzenes such as toluene are the primary source materials, and bacterial metagenomic analysis further revealed that the dominant species have the enzymes for degradation of alkylbenzenes. We have demonstrated that microbes in the reservoirs are converting crude oil to methane in the oilfields with geochemical signatures of crude oil biodegradation.

研究分野：工学

キーワード：国内油田 原油生分解メタン生成 地球化学的痕跡 油層温度圧力模擬培養 ¹³C-トレーサー実験 メタゲノム解析 アルキルベンゼン類

1. 研究開始当初の背景

未曾有の大災害となった原子力発電所の事故を契機に、シェールガスやメタンハイドレートなどの未利用化石燃料の資源開発に期待が集まる中、枯渇油田に大量に残留する原油を油層微生物の働きで天然ガス(メタン)に変換して回収する枯渇油田再生化技術の開発を目指す研究も世界的に高い関心を集めている。油層のような無酸素環境下で微生物が原油を分解しメタンを生成するプロセスの存在が知られるようになったのはごく最近であり、そのメカニズムはほとんど明らかにされていない。同プロセスの反応経路や関与微生物を特定できれば、派生的に、油層の原油分解ポテンシャルを表す新たな地球化学的・微生物学的指標が確立され、枯渇油田再生化技術の適用可能性を判断するための油層特性を評価する新技術への道標となる。

2. 研究の目的

本研究は、枯渇油田環境において、油層微生物(群)の機能を最大限活用して残留原油成分を新たなエネルギー資源(メタンガス)として再生・回収する革新的技術の創成を将来目標とし、油層中の生物学的原油分解メタン生成のメカニズムとポテンシャルを解析するための全く新しい油層特性評価技術を提案しようとするものである。特に、本申請課題では、国内の主要な油田を対象に、原油分解メタン生成ポテンシャルを有する油層を明らかにする。さらに、油層の当該ポテンシャルの有無を表す地球化学的・微生物学的特徴を抽出し、それらを原油分解メタン生成ポテンシャルのバイオマーカーとして活用することにより、長期の培養実験に依存することなく、油層特性を迅速に評価する指標を提案することを目的とする。

3. 研究の方法

生物学的原油分解メタン生成ポテンシャルを有する油層の地球化学的・微生物学的特徴を見出し、それを油層特性評価に有効なバイオマーカーとして提案する。具体的には、国内の主要な油田を対象として、現場油層環境の地球化学的・微生物学的データを収集・解析するとともに、独自に開発した油層環境模擬培養システムを活用して原油分解メタン生成反応を実験的に再現し、さらに安定同位体を用いて原油分解メタン生成メカニズム(反応経路、関与微生物)を解明する。最終的に、これらの情報を統合して解析し、油層環境における原油分解メタン生成ポテンシャルを表すバイオマーカーを選定する。

4. 研究成果

(1)現場油層環境の地球化学的データ
秋田県、山形県内の油田(以下、秋田油田、山形油田と略記)から油層水、原油、ガス試

料を採取後、原油の炭化水素組成とガスの同位体比を測定した結果、原油分解メタン生成プロセスの地球化学的痕跡(生産ガス中のCO₂、プロパン、*n*-ブタンが¹³Cに富む、原油中の*n*-アルカンが*i*-アルカンより少ない等)が山形油田から検出された。端的な例として、原油の生分解の進行度を示す指標であるプリスタン/ヘプタデカン比およびフィタン/オクタデカン比が、山形油田の原油では2以上であるのに対し、秋田油田の原油はいずれも1.0以下であった。

(2)現場油層環境の分子生態学的データ

秋田油田、山形油田の油層水を対象として、現場油層環境における微生物群集構造の解析を行った。古細菌群集構造解析の結果、秋田油田の油層水はいずれも水素資化性メタン生成菌が優占していた。一方で、山形油田の油層水は、水素資化性メタン生成菌が優占しているものの、酢酸資化性メタン生成菌も古細菌群集全体の10%弱の割合で存在した。

細菌群集構造については、秋田油田の一部の油層水で酢酸酸化共生細菌として知られる *Thermacetogenium phaeum* が優占しており、その他の油層水についても機能未知ではあるが過去の調査から酢酸酸化共生細菌と推定される Firmicutes 門の未培養細菌が優占していた。山形油田の油層水は、同じく機能未知の Firmicutes 門の未培養細菌が優占する一方で、Candidate division JS1 細菌が全体の20%強の割合で存在した。

(3)油層環境模擬培養システム(高温高压培養実験)による原油分解メタン生成ポテンシャルの評価

秋田油田と山形油田から採取した油層水と原油に WS 培地(無機塩、ビタミン等で調製した塩水培地)を添加し、油層を模擬する温度・圧力条件で長期間培養し原油分解メタン生成ポテンシャルの有無を調査した。培養開始 30~60 日後の間に、全ての培養系で油層水に元々含まれる酢酸などの有機酸からのメタン生成反応を観察した。その後、秋田油田の培養系からはメタン生成が観察されなかったのに対し、山形油田の培養系からは 350 日以上経過後に顕著なメタン生成が観察された。山形油田の培養系は同じ培養条件での継代が可能で原油分解メタン生成プロセスが継続的に観察されたため、当該微生物コミュニティの集積が可能となった。

(4)原油分解メタン生成反応で消費(利用)される原油成分の特定

山形油田の原油に予め [UL-¹³C]-トルエンまたは [UL-¹³C]-ヘキサデカン をトレーサーとして添加し、(3)と同様に、同油田の油層水 + WS 培地とともに高温高压条件で培養した。生成するメタンの炭素同位体比を測定すると、[UL-¹³C]-トルエンを添加した場合においてのみ、メタンの炭素同位体比が高くなる

(¹³Cに富む)現象が観察された。また培養前後の原油の炭化水素組成を比較すると、培養(メタン生成)に伴ってトルエンが有意に減少する傾向が見出された。以上の結果から、当該原油分解メタン生成微生物コミュニティが利用する原油成分は、主にアルキルベンゼン類であると推定された。

(5)原油分解メタン生成集積培養系のメタゲノム解析

(3)の集積培養後の微生物コミュニティを対象としたメタゲノム解析を行った。メタゲノム解析とは、系内に存在する微生物群の全ゲノムを解読しそれらの機能を推定する解析技術である。本解析により系内で優占する数種の微生物ゲノムを決定し、当該微生物ゲノム中に原油分解に直接関与する機能遺伝子の存在を特定することによって、原油分解反応に中核的な微生物群を明らかにすることができる。本解析によって山形油田由来の原油分解メタン生成微生物コミュニティを構成する4種の微生物ゲノムを決定することに成功し、原油分解反応に中核的な役割を担う微生物群を明らかにした。

(6)油層微生物による枯渇油田再生化を志向した油層特性評価技術

本研究において、原油生分解メタン生成プロセスの地球化学的痕跡を有する/有さない山形油田/秋田油田の原油と油層水の高圧高温培養実験を行った結果、山形油田の培養系においてのみ、原油分解メタン生成ポテンシャルが検出され、油層環境において原位微生物が原油をメタンに変換していることが実証された。このことから、当該地球化学的痕跡が枯渇油田再生化を志向した油層特性を迅速に評価するツールとして極めて有効であることが明らかとなった。さらに本研究では、原油分解メタン生成を担う中核的微生物とその反応メカニズムが解明されたため、各微生物とその機能に関する遺伝子が当該油層特性を評価する指標として有効である。更に、原油生分解プロセスの原料となる炭化水素成分(アルキルベンゼン類)およびその分解産物(コハク酸、カルボン酸)の存在度(他の成分に対する濃度比)も、油層特性を評価する指標になると考えられる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計10件、すべて査読有)

Katayama T., Yoshioka H., Takahashi H., Amo M., Fujii T., Sakata S., Changes in microbial community structures associated with gas hydrates in subseafloor sediments from the Nankai Trough. *FEMS Microbiology Ecology*, in press, DOI:10.1093/femsec/fiw093

Yoshioka H., Mochimaru H., Sakata S.,

Takeda H., Yoshida S., Methane production potential of subsurface microbes in Pleistocene sediments from a natural gas field of the dissolved-in-water type, central Japan. *Chem. Geol.* 419, 92-101 (2015), DOI:10.1016/j.chemgeo.2015.10.033

Takeuchi M., Yamagishi T., Kamagata Y., Oshima K., Hattori M., Katayama T., Hanada S., Tamaki H., Marumo K., Maeda H., Nedachi M., Iwasaki W., Suwa Y., Sakata S., *Tepidicaulis marinum* gen. nov., sp. nov., a novel strictly microaerobic denitrifying bacterium isolated from marine sediment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 65, 1749-1754 (2015), DOI:10.1099/ij.s.0.000167

Katayama T., Yoshioka H., Muramoto Y., Usami J., Fujiwara K., Yoshida S., Kamagata Y., Sakata S., Physicochemical impacts associated with natural gas development on methanogenesis in deep sand aquifers. *ISME J.* 9: 436-446 (2015), DOI:10.1038/ismej.2014.140

田中敦子・坂本靖英・眞弓大介・東野晴行・坂田 将・中尾信典、CCSと微生物機能の融合技術(Bio-CCS)リスク評価の試み。 *Journal of MMIJ* 131, 524-532 (2015), DOI:10.2473/journaloffmmij.131.524

Oba, M., Sakata S., Fujii T., Archaeal polar lipids in subseafloor sediments from the Nankai Trough: implications for the distribution of methanogens in the deep marine subsurface. *Organic Geochemistry* 78, 153-160 (2015), DOI:10.1016/j.orggeochem.2014.11.006

Takeuchi M., Kamagata Y., Oshima K., Hanada S., Tamaki H., Marumo K., Maeda H., Nedachi M., Hattori M., Iwasaki W., Sakata S., *Methylocaldum marinum* sp. nov., a novel marine thermotolerant methane oxidizing bacterium isolated from marine sediments. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 64, 3240-3246 (2014), DOI:10.1099/ij.s.0.063503-0

Katayama T., Yoshioka H., Mochimaru H., Meng X.Y., Muramoto Y., Usami J., Ikeda H., Kamagata Y., Sakata S., *Methanohalophilus levihalodurans* sp. nov., a slightly halophilic, methylotrophic methanogen isolated from natural gas-bearing deep aquifers, and emended description of the

genus *Methanohalophilus*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 64: 2089-2093 (2014), DOI:10.1099/ijs.0.063677-0

Takeuchi M., Oshima K., Yamagishi T., Katayama T., Hanada S., Tamaki H., Kamagata Y., Marumo K., Nedachi M., Maeda H., Sakata S., *Methyloceanus cenitepidus* gen. nov., sp. nov., a novel restricted facultatively methylotrophic bacterium isolated from methane-utilizing mixed culture originated from marine sediments near the methane-seep area. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 64, 462-468 (2014), DOI:10.1099/ijs.0.053397-0

Mayumi D., Dolfing J., Sakata S., Maeda H., Miyagawa Y., Ikarashi M., Tamaki H., Takeuchi M., Nakatsu C.H., Kamagata Y., Carbon dioxide concentration dictates alternative methanogenic pathways in oil reservoirs. *Nature Communications* 4 (2013), DOI:10.1038/ncomms2998

〔学会発表〕(計7件)

Mayumi D., Tamazawa S., Tamaki H., Maeda H., Wakayama T., Ikarashi M., Nishikawa K., Oshibe H., Shirai Y., Sakata S., Kamagata Y., Insight into *in situ* methanogenic crude oil degradation in an oil reservoir assessed by geochemical and microbiological analyses, 5th International Symposium On Applied Microbiology And Molecular Biology In Oil Systems, 2015.6.3, Stavanger (Norway).

眞弓大介、玉澤聡、玉木秀幸、前田治男、若山樹、五十嵐雅之、鎌形洋一、坂田将、未利用エネルギー資源開発への地圏微生物学の挑戦、日本微生物生態学会 2015 年度大会、2015.10.19、土浦亀城プラザ(茨城県土浦市)

五十嵐雅之、若山樹、前田治男、眞弓大介、玉澤聡、玉木秀幸、坂田将、鎌形洋一、微生物は地下に残った原油をメタンに変換できるのか?、2015 年石油学会石油討論会、2015.11.5、ウインク愛知(愛知県名古屋市)

五十嵐雅之、前田治男、眞弓大介、玉澤聡、玉木秀幸、坂田将、鎌形洋一、地下残留原油の微生物利用によるメタン変換回収の可能性、2015 年資源素材学会秋季大会、2015.9.8、愛媛大学 城北キャンパス(愛媛県松山市)

五十嵐雅之、若山樹、前田治男、眞弓大介、玉澤聡、玉木秀幸、坂田将、鎌形洋一、油田内常在微生物による残留原油のメタン変換回収研究、2015 年石油技術協会春季個人

講演会、2015.6.10、国立オリンピック青少年総合センター(東京都渋谷区)

原英里、眞弓大介、玉澤聡、玉木秀幸、前田治男、若山樹、五十嵐雅之、西川向一、押部洋、白井良和、坂田将、鎌形洋一、深部地下油層環境における未培養細菌の機能解明、農芸化学会 2015 年度大会、2015.3.27、岡山大学津島キャンパス(岡山県岡山市)

玉澤聡、眞弓大介、持丸華子、坂田将、前田治男、若山樹、五十嵐雅之、西川向一、大坂典子、押部洋、白井良和、鎌形洋一、玉木秀幸、深部地下油層環境から分離した新規 *Deferribacteres* 門鉄還元細菌の機能解析、農芸化学会 2015 年度大会、2015.3.27、岡山大学津島キャンパス(岡山県岡山市)

〔図書〕(計1件)

眞弓大介、鎌形洋一、シーエムシー出版、二酸化炭素地中貯留と地下微生物生態系への影響、難培養微生物研究の最新技術 微生物の生き様に迫り課題解決へ、2015、234-242

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称:新規微生物および当該微生物を用いたメトキシ化合物からメタンを製造する方法

発明者:玉木秀幸、鎌形洋一、持丸華子、眞弓大介、坂田将

権利者:(国研)産業技術総合研究所

種類:特許

番号:特許願 2015-242322 号

出願年月日:平成 27 年 12 月 11 日

国内外の別:国内

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

坂田 将(SAKATA, Susumu) 産業技術総合研究所・地圏資源環境研究部門・研究グループ長

研究者番号:70357101

(2)研究分担者

玉木 秀幸(TAMAKI, Hideyuki) 産業技術総合研究所・生物プロセス研究部門・主任研究員

研究者番号:00421842

(3)連携研究者

眞弓大介(MAYUMI, Daisuke) 産業技術総合研究所・地圏資源環境研究部門・研究員
研究者番号:30549861