

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009～2010

課題番号：21880014

研究課題名（和文）石油の分解により天然ガスを生産する油田内部の新規微生物共生システムの分子基盤

研究課題名（英文）Molecular basis of oil-degrading methanogenic microbial symbiotic system indigenous to petroleum reservoir

研究代表者

小林 肇 (KOBAYASHI HAJIME)

東京大学・大学院工学系研究科・助教

研究者番号：50549269

研究成果の概要（和文）：原油を分解しメタンを生成する油田内の微生物共生系の産業利用のための基礎的知見を得る事を目的として、油田から地下水を採集、含まれる微生物群の群集構造とメタン生成活性を解析した。その結果、原油生分解が起こっている油田内の微生物系では、酢酸資化性メタン菌が重要な役割を果たしている事が示唆された。さらに、複合栄養分の添加により、枯渇油田内の微生物系のメタン生成活性が賦活化される事が示唆された。

研究成果の概要（英文）：To gain basic knowledge for industrial application of crude-oil-degrading methanogenic microorganisms endogenous to petroleum reservoir, we collected reservoir brine samples from petroleum reservoirs and analyzed population structure and methanogenic activity of microorganisms in the reservoirs. Our results suggested an important role of acetoclastic methanogens in the microbial system within a biodegraded oil reservoir. Moreover, we showed that supplementation of complex nutrients could enhance the methanogenic activity of microorganisms endogenous to a depleted oil reservoir.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,110,000	333,000	1,443,000
2010 年度	1,010,000	303,000	1,313,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,120,000	636,000	2,756,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：地下微生物、油田、メタン菌、石油、共生

## 1. 研究開始当初の背景

油田において油層に存在している原油の埋蔵量に対して地上へ取り出すことのできる原油の量（回収率）は、現行の技術では平均3割程度である。原油の更なる増進回収を目的として種々の石油増進回収法（Enhanced Oil Recovery; EOR）が試行されており、その一種に微生物を利用して石油の回収率を向上させる微生物攻法（Microbial Enhanced Oil Recovery; MEOR）がある。微生物や炭

養源などを油層へ圧入し、微生物の増殖や代謝産物（界面活性剤、ガスなど）の作用によって増進回収を図る方法が提唱されている。

近年、幾つかの油田内で原油が微生物的に分解されメタンが生成している可能性が示されており、この自然プロセスを利用して原油を天然ガス（回収率7割程度）の主成分であるメタンに変換して回収するシステムの可能性が提唱されている。しかし、要である原油分解によるメタン生成反応に直接関わ

る微生物の実態が不明である事がプロセスの全容解明と利用を困難としている。油田内部から原油分解性の微生物が分離された前例は無いことから、この未知微生物は従来のアルカン資化性に基づいた選択培養法では分離が困難と考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究は、“枯渇”した油田に取り残されている残留原油を微生物を利用してメタンに変換し、回収が容易な天然ガスとして利用する新規 MEOR 技術開発を主構想に、その基礎的研究として、主に以下の目的で研究を行った。

### (1) 「油田内原油生分解のナチュラルアナログの微生物的背景調査」

油田内で原油が生分解を受けることは古くから報告されており、近年その代謝産物としてメタンが発生する可能性が示唆されている。よって本研究項目では、原油生分解によりメタンを生産する新規 MEOR 技術で使用する微生物種の選定を目的に、自然界における同様の現象(ナチュラルアナログ)に関わる微生物系を調査し、分解プロセスに関与する微生物群の特定を試みた。

### (2) 「栄養分添加によるメタン生成活性賦活化の可能性検討」

油田内の原油生分解反応は、一般に、自然の状態では地質学的時間スケールで進行するプロセスであると考えられている。さらに、油層が高温(80℃ $<$ )の油田等、原油生分解が全く見られない油田も多く存在する。本研究項目では、このプロセスの反応速度を産業利用可能なレベルまで上昇させる手段として、実際の枯渇油田から採取した微生物群を用いて、栄養分の添加による油田内微生物のメタン生成活性の賦活化の可能性を検討した。

## 3. 研究の方法

(1) 新堀油田(山形県)と八橋油田(秋田県)の生産井から油層水(原油を含む地層水)を嫌氣的に採取した。得られた原油はガスクロマトグラフィーによる炭化水素成分の分析に供された。原油、地層水、さらに地層水中に含まれる不溶性粒子から以下の手順で DNA を抽出した: 油層水サンプルから地層水と原油を相分離し、それぞれ分注した。地層水をガラスフィルター濾過し、地層水中に含まれる比較的サイズの大きい( $>3 \mu\text{m}$ )不溶性粒子を分離した。フィルターに残った残滓(不溶性粒子)に含まれる微生物群から、化学的溶菌と物理的菌体破壊を併用して DNA を抽出した。また、濾過した地層水に含まれる微生物群をナイロンフィルター濾過で回収し、DNA を抽出した。原油から DNA を採取するため、原油を等量のイソオクタン

と混合し、遠心分離した。この沈殿物をイソオクタンで洗浄後、DNA 抽出に供した。得られた DNA を鋳型に 16S rRNA 遺伝子を PCR 増幅、クローンライブラリーを構築してプラスミドを生成した。油田サンプル由来の 16S rRNA 遺伝子の塩基配列を決定し、それら塩基配列を指標に、油田由来のサンプルに含まれる微生物の分子系統学的多様性を解析した。

(2) 採取した地層水を微生物源として培養実験を行い、油田由来微生物群のメタン生成活性を評価した。地層水をバイアル瓶に分注、油田の貯留層内温度に近い 55℃で嫌氣的に静置培養した。ガスクロマトグラフィーを用いてバイアル瓶気相部成分を定期的に分析しメタン生成を測定した。原油、アルカン・トルエン混合物、蒸留水をそれぞれ添加し、メタン生成活性への影響を評価した。さらに、複合栄養分として酵母エキスを加え、メタン生成活性の賦活効果を評価した。

## 4. 研究成果

(1) 新堀油田では、原油の炭化水素成分を分析した結果、微生物による原油分解の初期段階の指標である直鎖状アルカンの選択的欠乏が検出された。そこで新堀油田から油層水サンプルを採取して「油田内原油生分解(本研究が目的とする MEOR 技術のナチュラルアナログ)プロセス」の研究モデルとして、主に分子系統学的手法を用いて油田内の微生物生態系を解析した。

原油の炭化水素成分の分析結果から、新堀油田内で原油が軽度の生分解を受けている事が示唆された。新堀油田は高温域の油田に分類されるため(貯留層温度 55℃)、本研究は原油生分解が示唆される高温油田に関しての初めての微生物学的解析と言える。今回は、油田内微生物群の系統学的多様性を解析、原油分解に関わる微生物種の特定を試みた。

従来、油田由来試料の微生物学的解析には試料から原油分を除いた水成分のみが供されてきた。しかし、一般に原油(アルカン)分解菌は油表面に吸着する性質を持つ。そこで原油成分からも DNA を抽出、原油分に含まれる微生物群の多様性も解析した。さらに、電子受容体に乏しい環境下にある微生物群はサイズの大きい共凝集体を形成する傾向にある点に着目し、地層水中に存在する凝集体を粒子サイズに基づいて濃縮する事を構想、ガラスフィルター濾過により地層水中から採集した比較的粒子径の大きい( $>3 \mu\text{m}$ )不溶性粒子からも DNA を抽出、不溶性粒子分に含まれる微生物群の多様性も解析した(図 1)。

古細菌では、原油、不溶性粒子中で *Methanosarcinales* 目の酢酸資化性メタン菌

種の優占化が観察され、原油生分解が起こっている油田内生態系で酢酸資化性メタン菌が重要な役割を果たしている事が示唆された。細菌種に関しては、特定の油層水成分に対する微生物種の優先化は見られず、原油生分解に関わる細菌種の特定には至らなかった。しかし、油層水の3成分（原油、不溶性粒子、地層水）中で原油から最も多様な細菌種が検出されたことから、油田内生態系では原油が重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

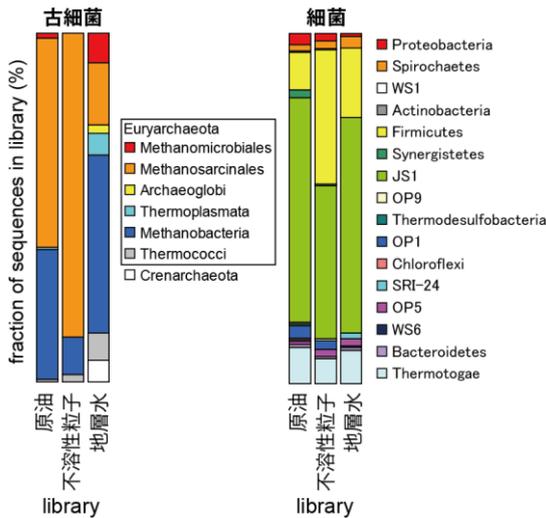


図1. 新堀油層水各成分（原油、不溶性粒子、地層水）から検出された系統型の分布。発表論文①から改変。

また、地層水試料に原油（新堀油田由来、非滅菌）、アルカンを添加し油田内温度（55℃）で培養、地層水中に含まれる微生物群のメタン生成活性を評価した（図2）。原油を添加した試料では非添加の試料に比べ活発なメタン生成が観察されたが、アルカン添加によるメタン生成活性化は見られず、顕著なアルカン分解能を示す培養系は得られなかった。

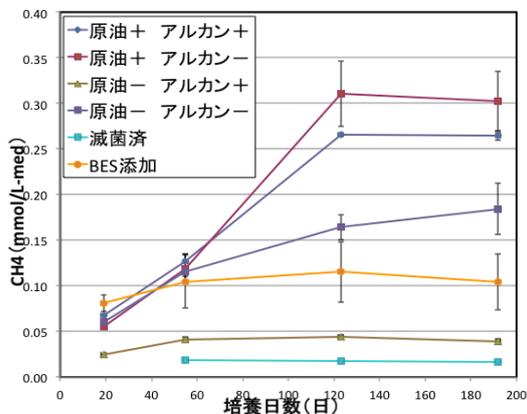


図2. 新堀油田地層水内の微生物によるメタン生成。地層水には原油成分（ボックス内参

照）の他には添加物は加えていない。

(2) 八橋油田は日本最大の油田であるが、含水率が高く”枯渇”状態に近い事から、将来的にMEORの適応対象となる事が考えられる。そこで、八橋油田の油層水を嫌氣的に採集し、「枯渇油田」内の微生物群の研究モデルとして、地下貯留層内と同様の高温・高圧の環境を模擬するために高圧培養容器を使用して培養実験を行った。その結果、地下貯留層内の環境を模擬した実験条件下でも、微生物群が油層水中に含まれる有機物（主に酢酸）を消費し、メタンを生産する事が示された。

そこで、地下微生物によるメタン生産の速度を産業利用可能なレベルまで上昇させる手段として、栄養分の添加による地下微生物の代謝賦活化を試みた。油田から採取した油層水サンプルに複合栄養分である酵母エキスを添加し、さらに原油生分解の反応賦活化の可能性を評価するため原油やアルカン混合物を加え、メタン生産への影響を解析した（図3）。

酵母エキスを添加した培養サンプルでは、酵母エキスを添加していない培養サンプルと比べ、メタン生成量が著しく大きくなった。さらに酵母エキスを添加した培養サンプル同士の比較において、原油やアルカン混合物を添加したサンプルでは、油成分を添加していないサンプルに比べ、より活発なメタン生産が観察された。この結果から、添加した酵母エキスが、天然の油層水中に不足している栄養素を補って、地下微生物のメタン生産または原油生分解に関わる代謝活性を賦活化した事が示唆された。

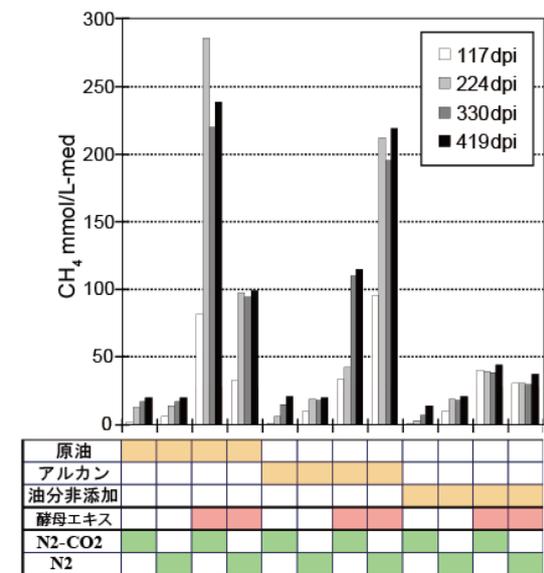


図3. 八橋油田地層水内の微生物によるメタン生成。油成分（原油、アルカン・トルエン混合物）、酵母エキス、さらに二種の気相

部ガス(N<sub>2</sub>、N<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>)を添加し生成されたメタンを測定(dpi:days post inoculation)。気相部ガスの影響は不明瞭。表論文②から改変。

酵母エキスを添加した培養サンプルにおけるメタン生産賦活化の微生物的背景を知るために、培養サンプル内に存在する微生物種を決定した。検出されたメタン菌種は全て水素資化性メタン菌種であった。また、油成分を添加した培養サンプル中では、メタン菌と共生することが知られている細菌種 *Coprothermobacter proteolyticus* と *Thermacetogenium phaeum* の近縁種の優占化が示唆された。これら結果から、水素資化性メタン菌とこれらの細菌の共生的代謝によってメタンが生成されていることが示唆された。

(3) 以上の結果から、以下の結論が得られた。原油表面に多種の微生物の吸着が見られ、油田内で原油が微生物代謝に関与している可能性が示唆された。しかし、天然の油田内での原油生分解に関与する微生物群の特定は培養や菌叢解析では困難であった。このプロセスの産業利用には微生物活性の賦活化が必須であるが、複合栄養分(酵母エキス)がメタン生成代謝を活性化することが示された。今後の研究では、別種のアプローチ(原油分解性活性を持つ微生物の添加等)により油田内での原油の生分解を増幅させる方法の開発が必要である。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計2件)

- ① 小林肇、遠藤啓太、坂田将、眞弓大介、川口秀夫、五十嵐雅之、宮川喜洋、前田治男、佐藤光三、Phylogenetic diversity of microbial communities associated with the crude-oil, large-insoluble-particle and formation-water components of the reservoir fluid from a non-flooded high-temperature petroleum reservoir.、Journal of Bioscience and Bioengineering、査読有、113巻、2012、360-366、DOI: 10.1016/j.jbiosc.2011.09.015.
- ② 小林肇、川口秀夫、遠藤啓太、眞弓大介、坂田将、五十嵐雅之、宮川喜洋、前田治男、佐藤光三、Analysis of methane production by microorganisms indigenous to a depleted oil reservoir for application in Microbial Enhanced Oil Recovery.、Journal of Bioscience

and Bioengineering、査読有、113巻、2012、84-87、DOI: 10.1016/j.jbiosc.2011.09.003.

[学会発表] (計5件)

- ① 小林肇、川口秀夫、佐藤光三、眞弓大介、坂田将、五十嵐雅之、宮川喜洋、前田治男、地下油田内微生物によるメタン生産、第2回メタンハイドレート総合シンポジウム、2010年12月2日、産業技術総合研究所臨海副都心センター(東京)
- ② 小林肇、遠藤啓太、坂田将、眞弓大介、川口秀夫、五十嵐雅之、宮川喜洋、前田治男、佐藤光三、Study to enhance methanogenesis by subsurface microorganisms within petroleum reservoirs、日本微生物生態学会第26回大会、2010年11月25日、筑波大学(茨城)
- ③ 小林肇、遠藤啓太、川口秀夫、佐藤光三、前田治男、坂田将、枯渇油田における微生物を利用した原油分解メタン生成に関する研究、石油技術協会春季講演会、2010年6月9日、福岡国際会議場(福岡)
- ④ 小林肇、遠藤啓太、川口秀夫、五十嵐雅之、宮川喜洋、前田治男、佐藤光三、地下微生物圏の二酸化炭素への応答、日本微生物生態学会第25回大会、2009年11月22日、広島大学(広島)
- ⑤ 遠藤啓太、小林肇、川口秀夫、五十嵐雅之、宮川喜洋、前田治男、佐藤光三、天然ガス de novo 生産へ向けた地下微生物群の研究、日本微生物生態学会第25回大会、2009年11月21日、広島大学(広島)

[その他]

ホームページ等

<http://escr.frccr.t.u-tokyo.ac.jp>

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

小林肇 (Kobayashi Hajime)  
東京大学・大学院工学系研究科・助教  
研究者番号: 50549269

##### (2) 研究分担者

無し ( )

研究者番号:

##### (3) 連携研究者

無し ( )

研究者番号: