

令和 4 年 6 月 29 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05347

研究課題名(和文)石油のメタン発酵による石油増進回収 - CO₂フリー水素供給源創出の可能性の検証研究課題名(英文)Enhanced Oil Recovery by Methane Fermentation of Petroleum - Verification of the Potential for Creating a CO₂-Free Hydrogen Source

研究代表者

中村 浩平 (Nakamura, Kohei)

岐阜大学・応用生物科学部・准教授

研究者番号：40456538

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：混合アルカン溶液と軽油を用い、石油分解メタン発酵微生物群を構築した。そこには酢酸資化性メタン生成アーキアとアルカン分解細菌2種が優占種として存在した。この2種の細菌は、それぞれが有するAssを用いて、鎖長の異なるアルカンを代謝した可能性が示された。この他に存在した従属栄養性細菌はメタゲノム解析等から、アルカン分解に直接関わるのではなく、系内の有機物を利用してメタン発酵に寄与した可能性が考えられた。高圧CO₂条件下における石油のメタン発酵微生物群への影響評価を達成できなかった。CO₂中酸素の除去、長期間の培養に対応する培養器の選定、及び培養時間を短縮できる工夫が必要であると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アルカン分解メタン発酵は、油田に残存する石油エネルギーを回収する手法として提唱されている。嫌気性アルカン分解菌のいくつかが分離されているが、メタン生成アーキアと共生できるアルカン分解菌は1株のみである。一方、メタゲノム解析によってアルカン分解菌の性状が明らかになりつつある。本研究の科学的成果は、アルカン分解菌のメタゲノム解析等からアルカン分解に関わるAss遺伝子の多様性を明らかにしただけでなく、アルカン分解細菌に代謝可能なアルカン鎖長スペクトラムが存在することを明らかにしたことである。

研究成果の概要(英文)：A petroleum-degrading methanogenic microbial community was established using a mixed alkane solution and diesel oil. There were three dominant species, an acetate-utilizing methanogenic archaea and two species of alkane-degrading bacteria. These two bacteria may have metabolized alkanes of different chain lengths by using their own alkylsuccinate synthase. Metagenomic analysis and literature reviewing indicated that heterotrophic bacteria may have contributed to methane fermentation by utilizing organic matter in the system, rather than being directly involved in alkane degradation. We were unable to evaluate the effects of petroleum on the methane fermenting microbiota under high-pressure CO₂ conditions, suggesting that removal of oxygen in CO₂, selection of cultivation vessels for long-term incubation, and measures to shorten incubation time are needed.

研究分野：応用微生物学 微生物生態学

キーワード：メタン発酵 MEOR 難培養性微生物 嫌気的アルカン分解 メタゲノム

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

原油は主に油田地下の油層圧力により自噴させて回収するが、様々な既存技術を用いても原油の半分以上が油層に採り残される。原油資源には限りがあるうえ、新たな油田開発にも様々な問題がある。2010年のメキシコ湾沖で起きた原油流出事故は、新たな油田が沖合、海底に残されている現状を反映し、開発に伴うリスクの大きさを示している。そのため、油田埋蔵原油の新たな回収技術の開発が必要とされており、『メタン発酵による原油分解 原油の粘度低下 & 産生メタンで油層圧力上昇 埋蔵原油と天然ガス(メタン)の回収』が可能となる。

我が国の温室効果ガスの排出削減対策のひとつとして、CO₂フリー水素を輸送用燃料・熱需要、原料利用、発電燃料に幅広く用いる水素社会構想がある(水素基本戦略、第2回再生可能エネルギー・水素等閣僚会議)。そのCO₂フリー水素の供給法として、化石燃料の水素改質と発生CO₂を長期間貯留するCCSの複合技術が注目されている。上述の石油のメタン発酵によるEORで油田の可採年数が延長されれば、長期的な水素供給源の確保につながる。同時に、石油からのCO₂フリー水素の供給にはCCSが必須であることから、CCSの石油のメタン発酵に及ぼす影響評価が必要である。

これまでの研究から、枯渇油田の再生や石油汚染の環境浄化といった課題に対する実学的側面と、石油の嫌氣的代謝や地下環境での微生物代謝に関する研究の学術的新規性に触れ、嫌気性微生物が有する様々な潜在性に注目するに至った。特に、メタン発酵条件下の石油分解発酵菌の分離報告は1例しかなく、その分離を目指し、本微生物群の獲得と維持を行ってきた。申請者の本微生物群には既報と同様の石油分解発酵菌が存在したため、メタゲノム解析から予想された基質代謝能を基に石油分解発酵菌の分離培養を試みたが、未だ為し得ていない。石油分解発酵菌の分離培養を試みつつ、石油のメタン発酵に必要なコア生物群の特定を行ってきた。これは、『石油のメタン発酵は石油分解発酵菌とメタン菌のみで起こる』と当初予想したが、申請者の全ての石油メタン発酵集積培養系において遍在する、亜優占細菌の存在を見いだしたためであった。本遍在亜優占細菌は、石油分解発酵菌に生育因子の供給を行うなどして石油のメタン発酵能を維持する、コア生物群の一員である可能性が考えられた。そのため、本微生物群の集積と大規模メタゲノム解析により培養系内微生物群の機能を解明し、石油のメタン発酵コア生物群を特定する必要があると考えている。また、石油のメタン発酵による油田のEORとCO₂フリー水素供給の可能性に注目し、未だ報告例が無い、CCS(高圧CO₂条件)の石油のメタン発酵に及ぼす影響評価は極めて重要と考えた。

2. 研究の目的

石油のメタン発酵は培養自体が困難とされ、有意なメタン発酵が確認できるまでに1年近くの培養期間を要する。先行研究にて、複数の分離源から得た微生物組成が異なる石油メタン発酵微生物群を獲得・維持できていること自体、学術的独自性が高い。また、前例のないCCS(高圧CO₂)環境下での石油メタン発酵能評価の試みは極めて独自性が高い。本研究により、石油メタン発酵微生物群からコア生物群が特定され、更にCCS環境下での石油メタン発酵能が実証されれば、石油のメタン発酵コア生物群によりEORを加速化する、CO₂フリー水素供給源の創出に向けた新たな技術革新にも繋がると考えられる。本研究は、申請者が有する石油メタン発酵微生物群を用い、そのコア生物群の特定を進め、高圧CO₂が及ぼす石油メタン発酵微生物群への影響評価を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 石油のメタン発酵微生物群のコア生物群の特定

アルカン分解メタン発酵系の構築

先行研究にて、日本各地から油田跡地などの土壌や生産水試料を、アルカン混合物(オクタン、ドデカン、ヘキサデカン、ヘプタメチルノナン(HMN)等をモル含む)や軽油(にHMNを混合)を唯一のエネルギー、炭素源とする嫌気無機塩培地に植菌した。ガラスバイアル瓶に入った培地をテフロンコートされたプチルゴム栓とアルミキャップで密栓した。植菌後、バイアル瓶の口を下向きにした水封状態にて、30℃で静置培養した。アルカン混合物または軽油を添加しない培養系(非添加コントロール)を更に準備し、すべての培養系を3連で実験した。

メタン量の測定にはGC-TCDを用いた。定期的にバイアル内の気相をサンプリングして、GC-TCDに供した。アルカン量の測定はGC-FIDを用いた。経時的に油層を採取し、ヘキサンを適当に希釈し、GC-FIDに供しアルカン分解を生分解されないHMNのピーク高さに対する相対値で各アルカン分子の分解を確認した。

微生物群集構造解析

微生物群集構造解析には16S rRNA遺伝子を標的としたMiSeqによるアンプリコン解析を用いた。MiSeqから得られた結果は、Mothur (Schloss et al, 2009)によって配列の整理(キメラ配列の除去など)や系統分類等を行い、RのPhyloseqやVegan Packageなどを用いて多様性解析を行った。嫌氣的アルカン分解細菌のアルカン分解初発酵素の一つと考えられる

Alkylsuccinate synthase の多様性と発現解析を MiSeq 用いて行った。アルカン分解メタン発酵系から Total RNA を抽出し、ランダムヘキサマーと逆転写酵素を用いて cDNA を調製し、それを鋳型に Alkylsuccinate synthase の サブユニット遺伝子 (*assA*) の部分配列を標的とした特異的 PCR を行い、MiSeq に供した。

メタゲノム解析

各培養系から得られたアルカン分解メタン発酵系から抽出した DNA から Nextera DNA Flex Library Prep (illumina) を用いて DNA ライブラリーを調製し、MiSeq Reagent Kit v3(600cycle) と MiSeq (illumina) で解析した。得られた配列を各種プログラムでリードの質管理を行い、SqueezeMeta (Tamames & Puente-Sánchez, 2018) と Albertson らの方法に基づいて Metagenome Assembled Genome (MAG) を取得した。MAG について Prokka (Torsten Seemann, 2014) や SqueezeMeta で CDS の抽出、アノテーションを行った。

分離培養実験

の解析で得られた推定代謝経路に基づいて、*Aminicenantes* 門細菌の分離培養を試みた。

(2) 高圧 CO₂ 条件下における石油のメタン発酵微生物群への影響評価

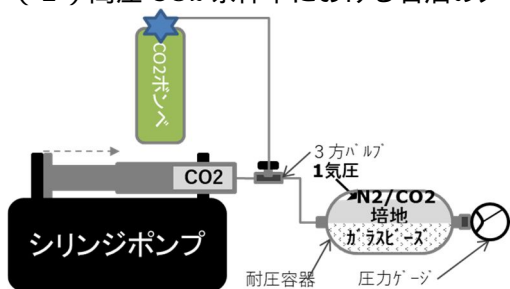


図1. 高圧 CO₂ 培養装置

高圧 CO₂ 条件を再現するために図1のような装置を組み立てた。耐圧容器内に培地(既得の本発酵微生物群)と基質および N₂/CO₂ 混合ガスを入れ、CO₂ ガスボンベから 3 方バルブでシリンジポンプのシリンジに CO₂ を注入後、バルブを切り替え培地容器の中に CO₂ を注入した。注入する CO₂ の体積で、容器内 CO₂ 圧力を調整し、圧力ゲージで培養器内圧力を確認した(～約 15 気圧@室温)。軽油を石油のモデル物質として培養容器に添加した。シリンジと CO₂ ボンベから容器を取り外し、既得の本微生物群の培養温度(30)で培養した。高圧 CO₂ が石油メタン発

酵に及ぼす影響について、(a) GC-TCD によるメタン濃度測定と(b)培養液中微生物のメタゲノム解析から評価を試みた。

4. 研究成果

(1) 石油のメタン発酵微生物群のコア生物群の特定

アルカン分解メタン発酵系の構築と微生物群集構造解析

先行研究で構築した軽油分解メタン発酵系の継代培養を続け、短鎖アルカン (n -C₁₅H₃₂ 以下の n -アルカン) と長鎖アルカン (n -C₁₆H₃₄, n -C₂₀H₄₂, n -C₂₄H₅₀) を分解するメタン発酵系 (AM, LA と A3) の構築に成功した(図2)。これら3つの培養系は、全て同じ新潟県新津川から採取した土壌を植菌源にしたものであるが、継代培養のタイミングを工夫することで、短鎖アルカン分解系と長鎖アルカン分解系を構築できた。これらの培養系を使って、16S rRNA/rDNA に基づくアンプリコン解析からコア生物群の特定を試みた(図3)。短鎖、長鎖アルカン分解系で共通して全体の5%以上の存在比率で存在する優占種として *Methanosaeta* 属アーキア (OTU0001), *Syntrophaceae* 科細菌 (OTU0002) が挙げられた。*Methanosaeta* 属アーキアは酢酸資化性メタン生成アーキアとして知られており、また近年直接電子伝達で発酵細菌から有機物からの余剰電子を受け取り CO₂ を還元してメタン生成する可能性が示されている (Morita et al, 2011)。*Syntrophaceae* 科細菌はアルカン分解細菌と考えられている。また、長鎖アルカン分解系の AM において、全体の20%以上(cDNA では40%)の存在率で *Smithella* 属細菌が存在した。*Smithella* 属細菌も *Syntrophaceae* 科に属する細菌で、アルカン分解に係わると考えられている。このほかに、*Anaerolineaceae* 科細菌 (Otu0005) や *Longilinea* 属細菌 (Otu0007), *Lentimicrobiaceae* 科細菌 (Otu0012), *Aminicenantes* 門細菌 (Otu0004), “*Candidatus Hydrogenedens*” (Otu0017) が共通して低割合であるが存在した。これらの細菌の機能は不明な点が多いが、

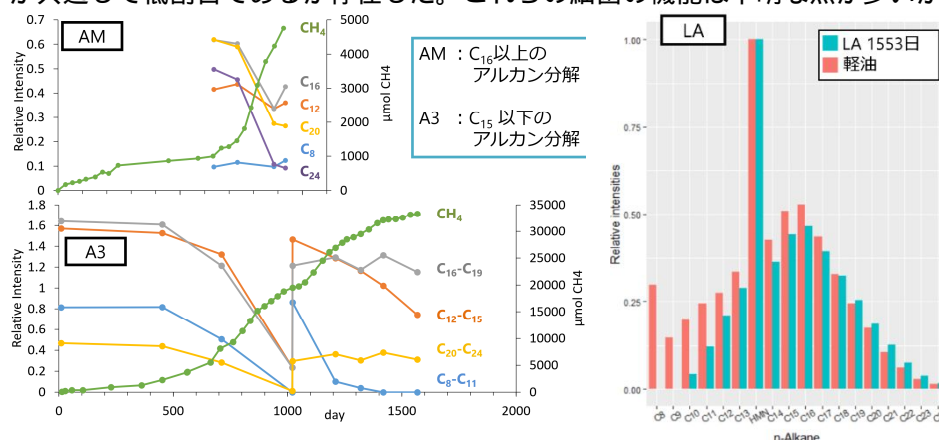


図2. アルカン分解メタン発酵系のメタン発酵, アルカン分解プロファイル AM には n -アルカン混合物, A3, LA 系には軽油を添加した. LA 系は培養 1553 日後のアルカン分解を GC-FID で測定した(右).

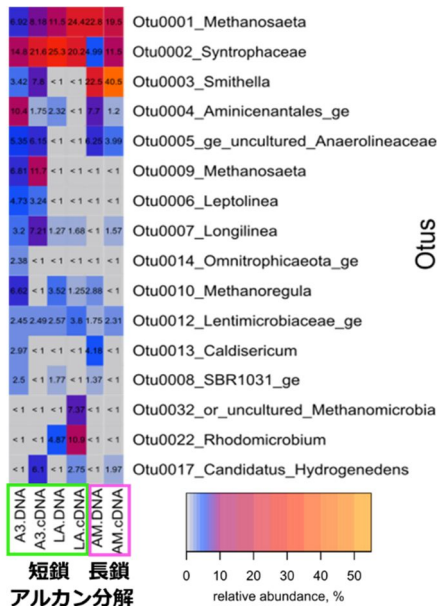


図3. 16S rRNA/DNAに基づくアンプリコン解析. 短鎖系(A3, LA)と長鎖系(AM)から抽出したRNAからの逆転写産物cDNAも鋳型に用いた.

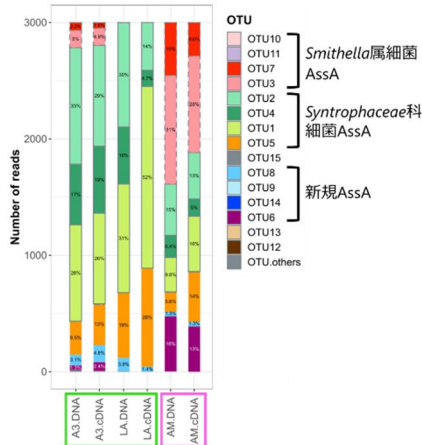


図4. assAに基づくアンプリコン解析. 短鎖系(A3, LA)と長鎖系(AM)から抽出したRNAからの逆転写産物cDNAも鋳型に用いた.

コン解析によって、多様な AssA 遺伝子の存在と MAG 解析からその由来となる生物種が明らかとなった。同じ Syntrophaceae 科細菌の中でも属レベルで異なる細菌が異なる鎖長のアルカンを代謝している可能性が示唆される非常に興味深い結果であった。

メタゲノム解析と分離培養実験メタゲノム解析によって、アルカン分解メタン発酵系をはじめとする様々な炭化水素影響環境下(原油汚染土壌, 油田等)に遍在する *Aminicenantes* 門細菌について調査した。*Aminicenantes* 門細菌は未培養細菌であり、炭化水素影響環境だけでなく多くの嫌気環境からも検出されており、本菌の詳細な性状解析には分離株の取得が有効である。そこで、*Aminicenantes* 門細菌の MAG をアルカン分解メタン発酵系から回収し、そのゲノム解析に基づく生化学性状を基に分離培養を試みた。取得した *Aminicenantes* 門細菌 MAG は contig 数 53, contig 最大塩基長 267,287 bp, 総塩基数 2,146,593 bp, GC 含量 47.71% であり, CheckM による完全性と汚染率はそれぞれ 92.77, 4.27% と良好な MAG が取得できた。この MAG から *Aminicenantes* 門細菌の代謝を予想した(図5)。

アルカン分解メタン発酵系内に存在する *Aminicenantes* 門細菌は従属栄養性の発酵細菌であり、好気呼吸能を含め、嫌氣的呼吸能を有さなかった。また、一部アミノ酸の合成能が欠けていた。この細菌は、死細胞から放出される多糖やタンパク質・ペプチドの分解能を持ち、そこから得られる種々の糖やアミノ酸を発酵し、生じる還元力を水素に還元して水素資化性メタン生成アーキアに、発酵で生じた酢酸を酢酸資化性メタン生成アーキアにそれぞれ提供することで間接的に系内のメタン発酵に寄与している可能性が考えられた。これは、他の炭化水素影響環境下から回収された *Aminicenantes* 門細菌 MAG と同様の性状であった (Robbins et al. 2016, Kadnikov

Anaerolineaceae 科細菌や *Longilinea* 属細菌はアルカン分解メタン発酵系を含めメタン発酵系で頻出し、糖やアミノ酸を代謝して従属栄養的に生育する細菌群であることが分離株から知られている。*Lentimicrobiaceae* 科細菌の一つである *Lentimicrobium* 属細菌は UASB メタン発酵槽から分離されており、これも従属栄養生物である。*Aminicenantes* 門細菌は多くの炭化水素影響環境で検出されている未培養細菌であり、本菌については MAG 解析によってその性質の解明と分離を試みた。“*Candidatus Hydrogenedens*” については、詳細はほとんど分かっていないものの、cDNA レベルでのみ検出されたことから、本系において活性の高い状態で存在していることが示唆された。一般的なメタン発酵系に存在する水素資化性メタン生成アーキア (*Methanoregula* 属アーキア Otu0010) は、本系のいずれでも *Methanosaeta* 属アーキアより比率が低く、cDNA レベルでは割合が小さい、または検出されなかったことが特徴的であった。

このように異なる鎖長のアルカン分解メタン発酵系の 16S rRNA 遺伝子に基づくアンプリコン解析から、共通するメタン生成アーキアやアルカン分解菌と考えられる細菌が存在した。また、従属栄養性の細菌もいくつか共通して存在していることから、これらの間接的なメタン発酵への関与も考えられた。アルカン分解細菌において、少なくとも2種類の細菌がアルカン分解に関与しており、この2種類がそれぞれ別々に鎖長の異なるアルカンを分解している可能性が示唆された。次いで、嫌氣的アルカン分解のマーカー遺伝子となる *assA* に基づくアンプリコン解析を行った(図4)。

AssA 遺伝子に基づくアンプリコン解析から、アルカン分解メタン発酵系には多様な嫌氣的アルカン分解初発酵素が存在することが明らかとなった。メタゲノム解析から *Smithella* 属細菌と *Syntrophaceae* 科細菌の MAG を解析し、AssA の OTU (3, 7, 10, 11) が *Smithella* 属細菌に由来し、また、OTU (1, 2, 4, 5) が *Syntrophaceae* 科細菌に由来した。短鎖アルカン分解系では *Syntrophaceae* 科細菌由来の AssA が発現し、一方長鎖アルカンでは *Smithella* 属細菌の AssA が主に発現した。16S rRNA 遺伝子に基づくアンプリコン解析で *Smithella* 属細菌が検出されなかった LA 系では、*Smithella* 属細菌 AssA は検出されなかった。さらに由来が判明しなかった OTU (6, 8, 9, 17) は分子系統樹解析から新規の AssA である可能性が示唆された。AssA 遺伝子に基づくアンプリ

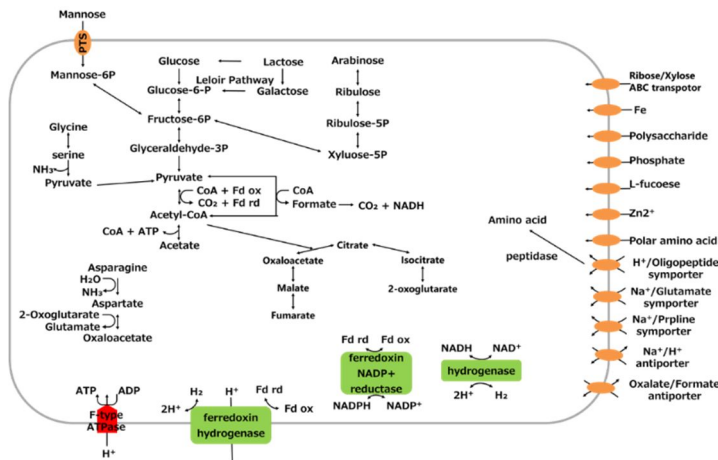


図5. *Aminicenantes* 門細菌のMAGによる代謝予想

et al. 2019)。さらにアルカン分解メタン発酵系内に存在する *Aminicenantes* 門細菌 MAG には、 γ -ラクタマーゼ (Class A, C) が検出された。

これらの結果から、アルカン分解メタン発酵系内に存在する *Aminicenantes* 門細菌の分離培養のために、生合成できないアミノ酸、基質となる糖 (リボース、マンノース、グルコース)、他の従属栄養性細菌の抑制のためのアンピシリン (終濃度 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、および糖の発酵で生じる水素の除去に水素資化性メタン生成アーキア *Methanospirillum*

hungatei JF-1 株培養液を加えた限外希釈培養系と、Deep アガー培地培養系を作成し 37 $^{\circ}\text{C}$ で培養を行った。アンピシリンを添加した系においては、培地濁度の増加やコロニーの形成は確認できなかった。一方アンピシリンを添加しなかった培養系においては、*Aminicenantes* 門細菌ではない従属栄養性細菌 (ホモ酢酸生成菌, *Sporomusa* 属細菌) が増殖した。アンピシリンにより一部の *Sporomusa* 属細菌の生育は抑制される。今回培地に添加したアンピシリン濃度では *Aminicenantes* 門細菌の生育も抑制したか、 γ -ラクタマーゼは MAG では検出されたものの機能 (発現) しない可能性も考えられた。MAG に基づく *Aminicenantes* 属細菌の分離培養には至らなかった。

(2) 高圧 CO₂ 条件下における石油のメタン発酵微生物群への影響評価

耐圧容器を用いた高圧 CO₂ 条件下での培養を試みた。計画時は 50 atm 程度の高圧 CO₂ での実験を想定したが、CO₂ による殺菌効果の可能性も考えられたため、10 atm 程度の CO₂ から実験を行った。(1) で構築したアルカン分解メタン発酵を植菌源に CO₂ (開始時 15~18 atm) で 1 年間培養した結果、圧力は 7~10 atm まで低下した。容器からの CO₂ の漏出が考えられた。容器内のガス組成を GC-TCD で解析した結果、メタンは発生せず水素が検出された。メタンが生成しなかったため、培養容器の増し締め等を行い、CO₂ の漏出の軽減を図り、更に培養を継続したがメタンは検出されなかった。CO₂ による殺菌の可能性もあるが、CO₂ を 1 気圧で添加した系においてもメタン生成が確認できなかったことから、CO₂ による殺菌以外 (CO₂ ボンベに含まれる酸素等) の影響が考えられた。また、培養後の菌体を回収し DNA 抽出を試みたが、培地に含まれていた軽油の影響か抽出した DNA 濃度は低く、その後の DNA 解析に供することができなかった。高圧 CO₂ 条件下において、アルカン分解メタン発酵微生物群に与える影響を評価する目標は達成できなかった。

【総括】

(1) 石油のメタン発酵微生物群のコア生物群の特定

石油の代替として、混合 n-アルカン溶液と軽油を用い、石油分解メタン発酵微生物群の構築とその微生物群について明らかとした。新潟県新津川の石油湧出地から採取した試料を基に得られた微生物群には酢酸資化性メタン生成アーキアとアルカン分解細菌と考えられる Proteobacteria 門細菌 2 種が存在した。この Proteobacteria 門細菌は *Syntrophaceae* 科に属する異なる種であると考えられ、それぞれで異なる Alkylsuccinate synthase 遺伝子を複数有することをメタゲノム解析によって明らかにした。また、これらのアルカン分解細菌は鎖長の異なる n-アルカンを、それぞれがもつ Alkylsuccinate synthase 遺伝子を利用して別々に代謝している可能性が示された。酢酸資化性メタン生成アーキアはどの鎖長のアルカン分解系でも優占種として存在した。一方、水素資化性メタン生成アーキアの存在率は酢酸資化性に比べ小さかった。これらアルカン分解、メタン生成に関わる微生物の他に、いくつかの従属栄養性嫌気性細菌が存在した。文献やメタゲノム解析から、これらはアルカン分解に直接かかわるのではなく、系内の有機物 (死細胞由来のアミノ酸や糖) を利用し、間接的にメタン発酵に寄与している可能性が考えられた。

(2) 高圧 CO₂ 条件下における石油のメタン発酵微生物群への影響評価

本目的について目的を達成できなかった。高圧 CO₂ (少なくとも 10 atm 程度) での培養を開始することは可能であった。ただし、用いる CO₂ の純度を考慮して、CO₂ ガス中の酸素を除去する必要があった。また、アルカン分解メタン発酵には長期間の培養が必要なことから、長期間の培養に対応する培養器の選定が必要であり、培養時間を短縮できる工夫 (例えば、海砂を培養系に加えるなどして油と微生物の接触面積を増やす) が必要であると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 杉本 岳人, 佃 怜奈, 中村 浩平
2. 発表標題 原油湧出地由来の異化的硫酸塩還元トルエン分解細菌の分離およびゲノム解析
3. 学会等名 2019年度日本生物工学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 竹田 玲奈, 棚橋 優花, 伏屋 里茄子, 中村 浩平
2. 発表標題 軽油分解メタン発酵には多様な嫌氣的アルカン分解酵素が関与する
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中村 浩平, 竹田 怜奈, 伏屋 里茄子, 高橋 三四郎
2. 発表標題 軽油メタン発酵系内アルカン分解細菌のalkylsuccinate synthase 遺伝子の発現解析
3. 学会等名 日本微生物生態学会第34回大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------