

氏名	よねばやし ひではる 米林 英治
授与学位	博士(工学)
学位授与年月日	平成10年4月8日
学位授与の根拠法規	学位規則第4条第2項
最終学歴	平成5年3月 東北大学大学院工学研究科資源工学専攻前期課程修了
学位論文題目	微生物を利用した石油の増進回収フィールドテストにおける基礎的研究
論文審査委員会	主査 東北大学教授 榎本 兵治 東北大学教授 千田 侑 東北大学教授 洪 承燮 東北大学教授 西野 徳三 東北大学助教授 井上 千弘

論文内容要旨

第1章 緒論

石油の増進回収を図る手法の一つに微生物を地下油層内に圧入して、微生物のもつ様々な機能を利用する微生物攻法 (MEOR: Microbial Enhanced Oil Recovery) と呼ばれる技術がある。これまで数多くのフィールドテストが実施されているが、その原油増回収メカニズム、もしくは失敗した原因にまで言及した報告はほとんどなされていない。つまり、地下に圧入した微生物が油層内でどのような増殖状況にあり、どのような代謝活動が行われているのか、そしてその結果どのような増回収機構が働いたのかを解明したものは見当たらない。そこで、中国扶余油田における MEOR フィールドテストのための基礎的研究として、テスト対象油層への圧入微生物の選定と、それらの MEOR 機能強化に関する検討を行うとともに、選定した有用微生物の中からガス生産機能、特に二酸化炭素を主に生産する微生物を取り上げ、それらの油層内における代謝活動を推定する手法の構築を目的とした。

第2章 微生物の探索と収集微生物の MEOR 機能の評価

MEOR フィールドテストに使用することを目的として、国内の油・ガス田等の油が常在する環境および河川・湖沼等の油が常在しない一般自然環境から微生物を探索・分離し、さらに原油回収に有用な代謝物の生産能力の観点から MEOR 機能を評価した。その結果、14 種類の集積培養について、珪砂を充填した微小孔隙内での嫌気培養により 11 種類が増殖を示した。特に珪砂充填系内の培養実験において、増殖およびガス生産が良好であった 3H-1、4D、6B、7A-1、7A-2、8L、9A の各株について、発生ガスの主成分を分析したところ、概ね二酸化炭素および水素であった。特に 4D 株、集積培養 7A、7A-1 株、9A 株の 4 種類は二酸化炭素の発生が顕著であり、有用な機能を有していると判定された。さらに、7A-1 株および 9A 株は、経済性を考慮したモラセスのみを用いた培地においても微小孔隙系内で増殖し、且つ、高いガス生産能力を保

持したことから、MEORへの有用な性質を備えていると考えられる。

さらに、珪砂充填模擬油層を用いた油回収実験により油回収能力を評価したところ、3H-1株、集積培養3H、7A-1株、7A-2株、9A株の5種類は増回収率（対初期油量）が6%を越え、高いMEORの性能を示した。この結果とバイアル瓶を用いた培養実験を総合的に検討した結果、最終的に、二酸化炭素生産能に優れ、M培地でも増殖・ガス生産を示した7A-1株を次章以降のフィールドテスト適用のためのスクリーニング対象とすることにし、これをTU-7A株と改称した。なお、TU-7A菌株を同定したところ、*Enterobacter cloacae*であった。さらに、相異なる機能を有する微生物として、TRC-322株、TRC-18-2-a株、TRC-4118株およびTRC-4126株、JF-2株およびSP-018株をフィールドテストの技術評価に供することとした。

第3章 フィールドテスト対象油田の油層先住微生物の調査および圧入対象微生物の油層条件への適応性の検討

テストフィールドの調査を行い、当該油田の油層水中に生息する油層先住微生物を明らかにするとともに、それらの中でも特にモラセスを資化する能力を有するものを明らかにした。

扶余油田産油層水試料の分析の結果、多くの油層先住微生物を検出した。それらのうちフィールドテストで問題となるモラセス資化微生物について、集積培養およびPCR-RFLP法を用いて分析した結果、計28種類を単離することができた。これらについて、現地産モラセスおよび油層水を模擬したブラインを用いて、当該油層温度で培養したところ、活発な増殖を示したため、MEORの圧入微生物との間の競合性に関する検討が必要との結論を得た。また、油層水成分を基に模擬した合成油層水とフィールドテストに使用する現地産モラセスを用いて、第2章において選定された7株について、油層条件への適応性を検討した結果、増殖性についてはTRC-4126株を除く全てに同油田への適応性があると判断された。

本章における、モラセス資化微生物の調査において、各単離株の同種・異種の判定には、微生物の16SrRNA遺伝子配列を分析して行うPCR-RFLP法を導入した。その結果、遺伝子レベルにおける、より正確な菌種の判定をすることができた。

第4章 油層先住モラセス資化細菌と圧入対象細菌の競合性に関する検討および油回収能力の評価

フィールドテストの候補として選定された微生物を、油層先住微生物との競合性および油回収能力の検討により、さらに選別した。油層先住微生物との競合性の検討では、*Enterobacter*属のTRC-322株とTU-7A株、および*Bacillus*属のTRC-18-2-a株とTRC-4118株を油層先住微生物と混合培養した結果、前者の*Enterobacter*属が競合対象微生物の影響を受けることなく増殖し、後者の*Bacillus*属は競合対象菌微生物を抑えながら増殖した。したがって、これら4株を当該フィールドに適用した場合、油層内においても十分に増殖することが期待できる。

さらに、扶余油田産の原油、合成油層水およびベレア砂岩を用いた油回収実験を実施した結果、

水攻後の残油に対して TRC-322 株が 15.5% S_{or} 、TRC-4118 株が 14.0% S_{or} 、TRC-18-2-a 株が 13.7% S_{or} 、TU-7A 株が 7.0% S_{or} の増回収率を示した。

これらの結果および第 2 章において検討した油層条件への適応性の観点から、最終的に TRC-322 株、TRC-18-2-a 株、TRC-4118 株および TU-7A 株を圧入用微生物として選定した。

第 5 章 圧入対象細菌の機能強化のための培地・培養条件の検討

圧入用微生物として選定した TU-7A 株、TRC-322 株、TRC-18-2-a 株および TRC-4118 株の計 4 種類について、代謝産物生産最適化に関する検討を行った。

これらのうち、ガス生産微生物である *Enterobacter* 属の 2 種について、ガス生産能力強化に関して検討した結果、リン酸塩を添加することによりガス生産量を無添加時の 3 倍程度に増加させることができた。さらに、TRC-322 株の場合、リン酸塩を加えることにより、水攻後の残油に対する油回収率を 9.6% S_{or} から 19.4% S_{or} まで増加させることができた。

一方、2 種類の *Bacillus* 属の TRC-18-2-a 株および TRC-4118 株については、硫酸マンガンを培地に添加することで界面活性物質を増産させることができた。そして、界面活性物質の生産に関係する培養期間については、TRC-18-2-a 株の場合は増殖が定常期に到達するまで、また、TRC-4118 株の場合は定常期に達した後もしばらくは培養期間を保持すべきと判断され、本検討から得られた必要最小限の培養期間は両株とも、約 1 週間であった。

第 6 章 フィールドテストにおける *E. cloacae* TU-7A 株の代謝活動の推定法

ガス生産能力に秀でた TU-7A 株について、その代謝物量を間接的に推定する新たな手法を構築することを試みた。その結果、TU-7A 菌は代謝物の分析によりブタンジオール発酵を行うことが確認され、これにより、生産される二酸化炭素量を水相の 2, 3-ブタンジオール量の定量によって推定できる可能性が示唆された。

さらに、機能強化を図ったリン酸塩添加培地の場合にも、二酸化炭素量の推定値と実測値はよく一致した。また、フィールドテストに使用するモラセスおよび対象油層中に存在する先住微生物の中には、ブタンジオール発酵を行うものはおらず、定量した 2, 3-ブタンジオールは全て TU-7A 株によるものと判断できることがわかった。さらに、油層内における 2, 3-ブタンジオールの岩石への吸着について検討した結果、その影響はほとんどみられないことがわかった。したがって、フィールドテストにおいて、本章で提案した手法による、二酸化炭素の生成量の推定が可能であると考えられる。

第 7 章 結論

本章では、本研究を通じて得られた成果を総括し、要約した。

審査結果の要旨

既存の技術では地下に賦存する石油の約70%が取り残される。その増進回収を図る方法として、微生物を地下油層内に圧入して培養し、微生物が有する様々な機能を利用する微生物攻法（MEOR：Microbial Enhanced Oil Recovery）が検討されている。本論文は、MEOR フィールドテストのための基礎的研究として、圧入微生物の選定と機能強化に関する詳細な検討により実施指針を得るとともに、選定した有用微生物の中から二酸化炭素を主に生産する微生物を取り上げ、油層内におけるその微生物の増殖・代謝活動状況を推定する方法を提案したもので、全7章からなる。

第1章は緒論である。第2章では、広くMEORに使用することを目的として、国内の油・ガス田等の油が常在する環境および河川・湖沼等の油が常在しない一般自然環境から微生物を探索・分離し、さらに原油回収に有用な代謝物の生産能力の観点からそれらのMEOR機能を評価し、有用微生物を得ている。

第3章では、テスト対象油層の微生物相と油層水成分の分析、および圧入候補微生物の一次選定について詳述している。すなわち、一次選定により5種類の微生物を得るとともに、当該油層における多くの非油層先住微生物の常在および使用栄養源のモラセスの資化能力を有する微生物の存在を明らかにし、これらの微生物と選定した圧入候補微生物との競合性試験の必要性を指摘している。また、油層常在微生物の調査では遺伝子解析技術により遺伝子レベルでの細菌の分離を行って、その有用性を明示している。これは重要な成果である。

第4章では、第3章で選定した微生物を、油層常在微生物との競合性および油回収能力の検討により、さらに選別している。油層常在微生物との競合性の検討では、油層常在微生物との混合培養により、*Enterobacter* 属の2株が競合対象微生物の影響を受けることなく増殖すること、および *Bacillus* 属の2株が競合対象微生物を抑えながら増殖することを明らかにしている。さらに、当該油田産の原油、合成油層水およびベレア砂岩を用いた油回収実験の結果、これらの候補細菌はそれぞれ高い増回収率を示した。これらの結果から、最終的に、TU-7A株、TRC-322株、TRC-18-2-a株およびTRC-4118株を圧入微生物として選定している。

第5章では、選定した4種類の圧入微生物について、代謝産物生産最適化に関する検討を行っている。これらのうち、ガス生産微生物である *Enterobacter* 属の2株のガス生産能力強化に関して検討した結果、微量のリン酸塩を添加することによりガス生産量を無添加時の3倍程度に増加させることができ、特にTRC-322株の場合、室内実験で水攻後の残油に対する油回収率を2倍以上にまで増加させることができた。また、*Bacillus* 属のTRC-18-2-a株およびTRC-4118株については、硫酸マンガンを培地に添加することで界面活性物質を増産させることができることを明らかにした。これらは有用な成果である。

第6章では、ガス生産能力に秀でたTU-7A株の油層内における増殖・代謝活動の程度と有用な二酸化炭素の生産量を、その代謝物量から間接的に推定する新たな手法について検討している。その結果、TU-7A株がブタンジオール発酵を行うことを明らかにし、その代謝経路の解明から、二酸化炭素生産量を水相の2, 3-ブタンジオール量の定量によって推定する方法を提案している。これは、油層内における目的微生物の活動度の新たなモニタリング手法の可能性を示唆するもので、その意義は大である。第7章は、結論である。

以上要するに、本論文は、石油の増進回収法として期待の高いMEOR法について、テストフィールドとして選定された油田での実施に関して油層工学ならびに微生物工学の観点から検討を行い、その指針を与えたもので、地球工学ならびにエネルギー資源工学の発展に寄与するところが少なくない。

よって、本論文は博士（工学）の学位論文として合格と認める。