

ふじわら かずひろ

氏名	藤原 和弘
授与学位	博士(工学)
学位授与年月日	平成12年3月8日
学位授与の根拠法則	学位規則第4条第2項
最終学歴	平成2年3月 信州大学大学院繊維学研究科機能高分子学専攻修士課程修了
学位論文題目	微生物石油増進回収法の技術開発における遺伝子工学的検出法の 利用に関する研究
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 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

これまでの微生物を利用した石油の増進回収(MEOR)に関するフィールド研究は、原油の回収率の向上結果のみに注目した研究がほとんどであり、安定した原油増進回収効果を得るための圧入微生物の適切な利用方法の確立や原油増進回収機構の解明を目的とした学術的な検討は極めて不十分であった。

そこで、研究段階にあるMEOR技術を実用技術として確立することを目的として、1996年よりプロジェクト研究「MEORフィールドテスト」が東北大学の協力のもとに石油公団と中国吉林石油集团公司との間で開始された。本プロジェクト研究は、中国吉林石油の主力油田である扶余油田をテストフィールドとしており、第1、第2フェーズ各3カ年の計画で進められている。

本研究は、当該プロジェクト研究の第1フェーズの一部として実施したものであり、MEOR技術の確立のため、微生物を対象とした遺伝子工学的検出法を利用して、これまで学術的な検討が不十分であった油層内の微生物やMEORプロセスに参与する微生物に関する情報、およびこれらの結果から得られる油層の地質的特徴に関する情報を収集するとともに、圧入微生物を含めたMEORに関係する微生物の油層内での活動状況を推定しうる遺伝子工学的モニタリング法を提案することを目的としている。

本研究では、まず、細菌の類別手法としてPCR-RFLP法を構築し、本PCR-RFLP法および細菌と他の真菌類や酵母類とを識別可能なPCR法を用いて、フィールドテストで使用するモラセス(麩糖蜜)を利用して増殖可能な油層岩に棲息する微生物の生存濃度や分布を解明する。また、これらの結果から推定される油層の地質的特徴および圧入微生物の増殖に対する影響等について考察する。次に、モラセス水溶液を油層に圧入する実験を実施し、油層内でモラセスを利用して活発に増殖する細菌群を明らかにするとともに、それらのモラセスを利用した増殖性やMEOR機能の観点から、圧入微生物に要求される競合増殖性およびテスト油層において原油増進回収効果を効果的に得るための要因について考察する。さらに、第2フェーズにおいて実施予定の大規模なフラッディング攻法によるフィールドテストにおいて、油層内でモラセスを利用して高濃度に増殖する細菌群や圧入微生物の動態を迅速かつ簡便に推定しうるモニタリング法として、2種の遺伝子工学的検出法の基本的概念を提案する。

第2章 PCR-RFLP法による対象油層の油層岩内に棲息する微生物の調査と油層の地質的特徴に関する考察

まず、油層岩常在細菌の類別に対してPCR-RFLP法を有効に利用できることを明らかにした。

次に同法を用いて、テスト油層の油層岩に棲息する微生物の群集構造を、フィールドテストで使用するモラセス培地で生育可能な微生物に着目して解明した。まず、断層で分断された2区域の中心部に位

置する生産井の近傍にそれぞれ検15井と検16井を開削し、深度340m～470mの油層コアを得た。検15井および検16井の各油層岩コアより分離された細菌群をRFLP profileによって類別した結果、それぞれ59種、47種もの細菌の存在が明らかになった。また、これらの細菌を一般の土壌細菌とともにRFLP profileに基づいて系統解析した結果、これらの細菌は一般の土壌細菌と異なることがわかった。さらに、テスト対象油層の油層岩内には、細菌類以外に酵母類も棲息していることがわかった。

また検15井および検16井の油層岩から分離された細菌の棲息分布を整理し、特にRFLP profileが一致した細菌の棲息分布から油層の地質的特徴を推定した。その結果、同一のRFLP profileを示す細菌の存在は限定されていることがわかった。また、同一のRFLP profileを示す細菌が複数確認された油層が比較的浸透性の高い油層であったこと、および浸透性の高い油層岩や破碎帯付近の油層岩からのみ大型の酵母類が検出されたこと等から、水攻法による圧入水の影響が生産井の近傍油層にまで及んでいて、テスト油層には水平方向に浸透性の比較的高い領域が存在する可能性もあることが示唆された。また、これらのことから、MEORフィールドテストで圧入するモラセスと圧入微生物は、圧入水の流路となっている水平方向の破碎帯等の高浸透性領域にまず入り込むと推測されるが、高浸透性領域では、水攻法により油の回収が進行して水飽和率が高くなっており、モラセス培地で高濃度に生育可能な多種の微生物群が棲息しているため、フィールドテストに先立って、圧入微生物との競合増殖性について検討することが必要と考えられる。

さらに、両コアリング坑井から分離した油層岩常在微生物について、モラセスを栄養源とした増殖性やMEOR機能について検討し、これらの微生物の原油増進回収効果発現の可能性について考察した。その結果、特筆すべきMEOR機能はみあたらず、これらの油層岩常在微生物が原油増進回収に対して効果を発揮する可能性は低いことが明らかになった。

第3章 油層内における細菌の動態解明を目的としたモラセス水溶液の圧入実験

MEORのテスト対象油層において、モラセスの圧入によって油層内で活性化される細菌群の調査を目的とし、モラセス水溶液を油層内に圧入する実験を行った。まず、圧入実験実施前にMEORフィールドテストで使用する原水（圧入水）やモラセスおよびテスト坑井の油層水に棲息する細菌群をPCR-RFLP法によって調査したところ、細菌の群集構造はそれぞれ異なり、さらに油層水に棲息する細菌群の群集構造も坑井毎に異なることがわかった。次いで、圧入実験後に採取された生産水中に棲息する細菌群を解析した結果、原水由来の腸内細菌かそれに近縁な種が優勢増殖種として高頻度に検出され、これらは油層内でモラセスを利用して優勢に増殖することが明らかになった。

次に、圧入微生物に要求される競合増殖性について考察することを目的として、原水やモラセス、油層水や生産水から分離された細菌群のモラセスを利用した増殖性について検討した。その結果、特に原水中に棲息する腸内細菌に近縁な種はモラセスを利用して 10^8 CFU/ml以上にまで増殖することが示され、前述の結果と一致した。これらのことから、まず、MEORフィールドテストにおいて油層に圧入される圧入微生物は、原水由来の腸内細菌かそれに近縁な種に対して優勢に増殖することが必要であることが明らかになった。また、圧入流体の流れの卓越性の観点から、圧入微生物は、破碎帯等の高浸透性領域に存在する油層水由来の特定の細菌群やモラセスを利用して増殖する油層岩常在細菌に対して優勢に増殖することも必要であることが示された。

また、これらの分離した細菌群のMEOR機能について検討し、テスト油層において原油増進回収効果を効果的に得るための要因について考察した。モラセスや油層水にはMEOR機能を有する細菌は存在しなかったが、原水由来の腸内細菌かそれに近縁な種は、ガス生産能およびエマルション形成能等のMEOR機能を有していることがわかった。またモラセス水溶液圧入後の生産水から検出された原水由来の腸内細菌かそれに近縁な種も、ガス生産能およびエマルション形成能等のMEOR機能を有していた。しかし、本圧入実験において原油増進回収効果はみられなかった。これは、油層内で活性化された細菌群の中に、例えば高浸透性領域を選択的に閉塞させて圧入水の掃攻状態を改善するなどの、テスト坑井の近傍油層での原油増進回収に対して必要とされるMEOR機能を有する細菌が存在しなかったことによるものと推察された。

第4章 微生物挙動のモニタリングのための遺伝子工学的手法の適用に関する検討

MEORフィールドテストにおいて、圧入微生物やこれに関与する細菌群の動態をモニタリング可能な手法の開発を面的として、迅速な遺伝子工学的検出法の適用について検討を行った。まず第3章で述べ

たモラセス水溶液の圧入実験において最優勢増殖種として生産水中から検出された*K. pneumoniae* CJF-003株を検討対象とし、油層サンプル中の標的細菌を迅速に検出するため、平板培養を介さないMPN-Direct-PCR法の適用性を検討した。その結果、DNAを効率よく抽出・回収する目的で開発されたChelex 100溶菌法、および標的細菌の定量化を目的としたMPN法を組み合わせたMPN-Direct-PCR法は、DNA抽出からPCR反応および電気泳動による増幅確認までを5時間以内に完了できることがわかった。

また、本プロジェクト研究における圧入候補微生物である*E. cloacae* TRC-322および*B. licheniformis* TRC-18-2-aを検討対象とし、標的細菌の迅速な活性モニタリングに対するFISH法の有用性について検討した。FISH法は細胞の固定化、ハイブリダイゼーション反応、蛍光顕微鏡下での検出・計数等の工程で構成されるが、本研究では、FISH法の律速段階となる菌体の固定化時間を3時間に短縮することによって、迅速化を図った。その結果、グラム陰性細菌およびグラム陽性細菌の両方に対して効果的な菌体の固定化条件を確立することができ、またこの条件を適用することによって、ハイブリダイゼーション反応を含めて6~7時間以内に標的菌体を検出できることが明らかになった。

さらに、油層サンプルを対象とした標的細菌の検出実験を行い、本研究で構築したMPN-Direct-PCR法およびFISH法は、油層サンプルに含まれる多様な成分の影響を限定し、MEORフィールドテストにおいて必要とされる検出感度で、標的細菌を検出できることがわかった。

第5章 結論

本研究では、MEOR技術の確立のため、微生物を対象とした遺伝子工学的検出法を利用して、油層内の微生物やMEORプロセスに関与する微生物に関する情報、およびこれらの結果から得られる油層の地質的特徴に関する情報を収集した。遺伝子工学的検出法の一つであるPCR-RFLP法の適用により、油層岩内にはモラセス培地で生育可能な多種の微生物が棲息し、それらの分布は石油開発の経緯や地質的特徴に依存していることを明らかにした。また、モラセス水溶液の圧入実験において、油層内で優勢に活性化される細菌を明らかにし、さらに確実な原油増進回収効果を期するには、MEOR実施対象油層の特徴や微生物が有するMEOR機能に応じて、微生物の機能とその発現場所を制御することが極めて重要であることを検証した。

また本研究では、MEOR技術の確立に有用なモニタリング法と、圧入微生物を含めたMEORに関係する微生物の油層内での活動状況を迅速に推定しうる遺伝子工学的モニタリング方法を提案した。本研究で検討したMPN-Direct-PCR法やFISH法の基本的概念は、本フィールドテストにおける多様な細菌のモニタリングにおいて有効であり、また、他油田に対しても適用可能と考えられる。

論文審査結果の要旨

微生物を利用した石油の増進回収法(MEOR)は、多様な機能を有する微生物の中からそれぞれの油層に適した微生物を使用することによって、汎用性の高い効果的な技術となる可能性を有している。それには、油層の特徴、特に微生物に関連する油層内状況の把握が基本となり、必要技術の確立が求められる。このため、著者は、微生物を対象とした遺伝子工学的検出法の利用について検討し、油層内に生息する微生物の分布および動態に関する情報、ならびに、これらの結果を解析することによって油層の地質的特徴に関する情報を得ている。さらに、標的微生物の油層内での活動状況を迅速に推定するための遺伝子工学的モニタリング法として、2種類の手法を構築し、その有効性を検証している。本論文は、これらの研究成果についてまとめたもので、全文5章よりなる。

第1章は緒論で、本研究の背景および目的を述べている。

第2章では、遺伝子工学的検出法の一つであるPCR-RFLP法の適用により、MEORテストフィールドの油層岩内に生息する多種多様な微生物を類別し、それらの分布が油田開発の経緯や油田の地質的特性に依存していることなど、これまで学術的な検討が不十分であった油層内微生物に関して有用な知見を得ている。また、これによって、PCR-RFLP法の有用性を示している。

第3章では、使用微生物の栄養源となる培地の油層への圧入実験を行い、栄養源の圧入によって油層内で活性化される微生物をPCR-RFLP法により解明している。また、この結果から、使用微生物に要求されるこれらの微生物との競合増殖性に関する必要条件を明らかにしている。さらに、高い増進回収効果を得るには、油層の特性と微生物のMEOR機能に応じて、微生物の機能の発現場所を制御することが極めて重要であることを検証している。これらは、MEORの設計指針の確立のために重要な成果である。

第4章では、使用微生物や栄養源の圧入によって新たな培養条件下となった油層内の微生物群の中から、使用微生物などの標的微生物を選択的に検出し、その動態を迅速に把握するための方法を提案している。まず、MPN-Direct-PCR法とFISH法の利用について検討し、その手法を構築している。さらに、油層サンプルを対象とした検出実験を行い、これらの方法が必要とされる検出感度で標的微生物を検出できることを示している。これは、MEOR実施過程の監視・評価方法の開発において有用な成果である。

第5章は結論である。

以上要するに本論文は、油層内に生息する微生物やMEORプロセスに関与する微生物の検知ならびに特定微生物の油層内での活動状況の推定に、微生物を対象とした遺伝子工学的検出法を利用し、これらがMEORの技術開発に必要な情報を得る手段として有用であることを示したもので、石油開発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。