論 文

MEOR を目的とした水溶性ポリマー生産微生物のスクリーニング

菅井 裕一*・洪 承燮**・池田修一郎***

千田 侑*・榎本 兵治*・矢澤 仁徳***

(Received August 30, 2001; accepted March 8, 2002)

Screening of water-soluble polymer producing microorganisms for MEOR

Yuichi Sugai, Chengxie Hong, Shuichiro Ikeda,
Tadashi Chida, Heiji Enomoto and Nintoku Yazawa

Abstract: In order to obtain highly talented microorganisms to be applied to Fuyu oilfield, PetroChina Company Limited Jilin Oilfield Company, where fractures and sedimentary anisotropy dominate the permeability of the reservoir, microorganisms which produce water-soluble polymer were searched for Microbial EOR by means of permeability modification.

Enterobacter sp. TU-7A and TRC-322 were found among talented microorganisms which had already been obtained as gas producers, and *Clostridium* sp. TU-15A was newly obtained. All of these three microorganisms showed the viscosity of their cultivated solution equivalent to or higher than that shown by SP018 reported by Oklahoma University. Particularly, TU-15A showed an outstanding increase of viscosity, ca. 70 cP at a shear rate of 40 s⁻¹.

For simulative application of strain TU-15A to Jilin oilfield, its optimal cultivation condition and dominant growth under competitive reservoir conditions were discussed. Results may be summarized as follows.

- 1) The viscosity of cultivated solution for TU-15A proportionally increases with the initial molasses concentration, which makes possible an estimation of economically efficient concentration of molasses for injection, and moreover, which may make possible the use of fluid of so high viscosity that its injection is impossible through a well.
- 2) The optimum pH range of TU-15A for polymer production is 7.0–9.0. Automatic adjustment of pH to the optimum range may be done in the reservoir of Fuyu oilfield by natural dilution with brine, the pH of which is 7.7.
- 3) Initial cell concentration of TU-15A in the culture solution for injection must be equal to or higher than 1.0×10^6 cells/ml for its dominant growth in the reservoir.

Key words: MEOR, polymer, screening, viscosity, permeability modification, *Clostridium* sp., *Enterobacter* sp.

* 東北大学大学院工学研究科 Graduate School of Engineering, Tohoku University

** 東北大学大学院工学研究科 Graduate School of Engineering, Tohoku University (現中国石油天然気股份有限公司吉林油田分公司)

*** 東北大学大学院工学研究科学生 Graduate Student of Engineering, Tohoku University (現国際石油開発(株) 石油公団石油開発技術センター Technology Research Center, Japan National Oil Corporation)

1. はじめに

MEOR (Microbial Enhanced Oil Recovery) は、特定の微生物を油層内で培養し、増殖した微生物自体あるいは培養による代謝産物 (ガス, ポリマー, 酸, サーファクタントなど) の効果により石油の増進回収を図る方法である。一般には特定の機能を有する微生物を栄養源とともに油層に圧入する方法をとっているため、油層の状況に応じて機能の異なる微生物を使い分けることに

よりさまざまな残存状態の石油の回収が可能であり、かつ、微生物の圧入や増進回収に、水攻法で使われている圧入・生産施設などがそのまま利用できることで高い経済性が期待できる、などの利点を有していると考えられている。

実際にどのような機能を有する微生物を用いるかは油層ごとに検討すべきことであるので、MEOR の実用化研究では油層の想定が重要である。本研究では、中国石油天然気股份有限公司吉林油田分公司の扶余油田を想定油層とすることにした。扶余油田についてはすでに報告されている^{1,2)}ので説明を省略するが、長年にわたって水攻法が実施されており、中温微生物が使用できる油層温度である。

同油田では、フラクチャーが発達し、また堆積環境による浸透率の異方性が強いことから、油層内の permeability modification が石油の増進回収に特に有効であると考えられている。これらの効果をもたらす微生物としては、バイオフィーム（非水溶性ポリマー）や水溶性ポリマーを生産する微生物が挙げられ、このうち本研究では、水溶性ポリマー生産微生物を油層内に圧入し、油層内でポリマー生産を行わせる MEOR を対象にすることとした。

水溶性ポリマー生産微生物を用いた MEOR は、ポリマー攻法と比較して以下の点で優れていると考えられる。

- 1) 圧入培地の粘度は水と同等なので、ポンプの動力費が水攻法と同等で済む。
- 2) 油層内でポリマーを生産させるため、ポリマー攻法で見られるような圧入時におけるポリマーの機械劣化がない。
- 3) 高機能微生物を用いることによって、ポリマー攻法では使用が困難な高粘度のポリマー溶液を使用できる。

さらに、水溶性ポリマー生産微生物が排出する二酸化炭素や有機酸などの副産物との複合的な効果も利点の1つとして挙げられる。

MEOR では、自然界への影響が未知である遺伝子組み替え微生物の使用が現在のところ難しい状況にあるため、目的とする高い機能をもつ微生物の取得が極めて重要である。

本研究では、扶余油田に適用することを想定して、水溶性ポリマー生産微生物のスクリーニングを行った。

2. MEOR に有用な水溶性ポリマー生産微生物の探索

一般に、単独の微生物を得るまでの手順としては、ま

ず水や土壌などの試料を取得した後、さまざまな種類の微生物を含むこれらの試料を液体培地に混合し、この培地で増殖可能な微生物を得るための集積培養を行う。さらに、その培養液を寒天平板培地上に塗布し、それぞれの微生物のコロニーを形成させる。微生物の種類によりコロニーの形状や色調などが異なるため、それらの観察によって異なると判断されたすべてのコロニーを個別に釣菌して再び寒天平板培地か液体培地に植菌し、培養する。この作業を最終的に一種類のコロニーのみが検出されるまで繰り返すと、単離微生物を得ることができる。本研究でもこの手順により微生物の単離を行った。

筆者らのグループ研究として、これまでに木下^{3~6)}、米林^{7~10)}らにより9回にわたる微生物の探索が行われ、80種類以上の微生物が単離されている。これらの微生物のうち、国内産モラセス（廃糖蜜）を基質とした培地を用いてスクリーニングした結果、MEOR に有効と考えられる微生物が数種類得られているが、その中に水溶性ポリマーの生産が認められた微生物はいなかった。また、石油公団がフィールドテストを目的としてスクリーニングを行い、数十種類の微生物の中から数種類の MEOR に有用な微生物を得ている¹¹⁾。この中にも、性能評価の基準として用いたオクラホマ大学より提供を受けた *Bacillus* sp. SP018 の示す粘度 (5.6cP) よりも高い値を示す微生物は得られていない。しかし、微生物の代謝は培養条件、特に培地成分の変化により大きく異なる場合がある。このことから、本研究においては、これまでに筆者らの研究グループにより得られてきた微生物のすべてと、石油公団から提供を受けた有用微生物を対象として、扶余油田の油層水中に含まれる主な無機塩類からなる模擬油層水（以下、合成油層水と称す）に中国産のビートモラセス（以下、中国産モラセスと称す）を4%となるように添加した培地を用い、水溶性ポリマーの生産能力について、機能検査を再度行った。合成油層水の組成を表1に、中国産モラセスの主な成分を表2に示す。なお、この培地の pH は8.2であり、本研究においては、以下特記しない限りすべての場合に、この合成油層水と中国産モラセスによる培地を用いた。これ以降、この培地を SB4CM (Synthetic Brine with 4% Chinese Molasses) 培地と略記する。

また上記以外に、10回にわたる微生物の探索を行った。この探索の年月日ならびに主な探索場所を表3に示す。一般に、微生物がポリマーを生産する理由の1つとして、水などの流れが存在する場所において自らを固定するためであることが考えられている。このようなことを考慮に入れ、特に河川の水や油層から生産される水などを対象に探索を行った。得られた試料から前述のよう

表1 合成油層水中の成分と添加濃度

成 分	添加濃度 (mg/l)
NaCl	1,210
KCl	23
NaHCO ₄	2,820
CaCl ₂ ・2H ₂ O	140
MgCl ₂ ・6H ₂ O	114
FeCl ₃ ・6H ₂ O	3.4
KH ₂ PO ₄	10
NaHSO ₄ ・H ₂ O	3.5

表2 中国産モラセスの成分分析結果

成 分	含 有 量
全窒素	1.18wt%
灰分	6.70wt%
揮発性塩基窒素	8.00wt%
アミノ態窒素	0.24wt%
リン	6.20mg/100g
鉄	7.89mg/100g
カルシウム	159mg/100g
ナトリウム	946mg/100g
カリウム	2.37wt%
マグネシウム	39.6mg/100g
塩素	853mg/100g
果糖	0.24wt%
ブドウ糖	0.14wt%
ショ糖	39.7mg/100g
直接還元糖	0.84wt%
全糖	41.8wt%
二酸化硫黄	7.00mg/kg
硝酸銀	2.10g/kg
銅	40.0 μg/100g
亜鉛	882 μg/100g
マンガン	979 μg/100g
ケイ酸 (SiO ₂ として)	100ppm
アルミニウム	44ppm

な処理によって単離微生物を得て、液体培地による純粋培養を行い、その培養液粘度の増加の有無により水溶性ポリマーの生産能力について評価した。

なお、以下特記しない限りすべての場合に、初期菌体濃度が 1.0×10^6 cells/ml となるように植菌し、培養温度30℃、嫌気性条件下で実験を行った。また、培養液粘度は、回転式 E 型粘度計の回転数 10 rpm (ずり速度にして $38.3s^{-1}$) での測定値を基準値として示すことにする。

この結果、表4に掲げる4種類の微生物について水溶

表3 探索年月日ならびに主な探索地域

探索 No.	探索年月日	主な探索地域
10	1996. 9. 5	宮城県岩沼市、名取市近辺の湖沼、河川地域
11	1996.10.24	福島県相馬市松川浦近辺の海、河川地域
12	1996.10.27	宮城県名取川流域
13	1996.11.14	秋田県八橋油田、申川油田
14	1997. 3.14	中国吉林省扶余油田
15	1997. 5.16	中国吉林省扶余油田、新木油田、大慶油田
16	1997. 6. 2	山形県島海山
17	1997. 8. 8	中国吉林省扶余油田
18	1997. 8.12	中国吉林省扶余油田
19	1997. 8.15	中国吉林省紅崗油田

表4 各水溶性ポリマー生産微生物の培養液粘度

菌株名	属	培養液粘度	
		$38.3s^{-1}$	$150s^{-1}$
TU-15A	<i>Clostridium</i> sp.	70.0	25.0
TRC-322	<i>Enterobacter</i> sp.	11.9	6.0
TU-7A	<i>Enterobacter</i> sp.	8.5	4.0
TU-13F1	Unknown	3.0	2.0
SP018*	<i>Bacillus</i> sp.		4.0

*オクラホマ大学より分与

性ポリマーの生産が示唆された。表中の粘度の値は数回の培養における最高値である。嫌気性高機能ポリマー生産細菌として報告されているSP018の培養液粘度の増加と比較するために、SP018について報告されているずり速度 ($150s^{-1}$) での値¹²⁾も表4に示した。SP018については室内研究用の培地で得られた値であり本研究のように経済性を考慮した実用培地での値ではないが、それにもかかわらずこれらの中で TU-13F1 以外の3種類の微生物は SP018 と同等もしくはより高い値を示した。特に TU-15A は、10rpm での測定で、純水の約70倍という極めて高い培養液粘度の増加が認められた。また、TRC-322 と TU-7A に関しては水溶性ポリマーとともに多量の炭酸ガスも生産し、その量は 50ml の培地で培養して約 120ml であった。これは TU-15A や TU-13F1 が生産する炭酸ガス量の約2倍であり、油層によっては複合的な効果が期待される量と考えられる。しかし、ここではその効果は考慮しないことにした。TRC-322 については、培養により粘度の値のばらつきが激しく、ポリマー生産が不安定であった。

このように、これまでに得られていた微生物の再検査と新たな探索により得られた微生物の中から、石油の増

進回収に有効と期待される水溶性ポリマー生産微生物を得ることができた。このうち、粘度の増加が2番目に大きかった TRC-322 は生産が不安定であったので、その安定生産条件について検討することとした。

3. TRC-322

3.1 微生物学的特徴

TRC-322 は元々炭酸ガスを多量に生産することから、MEOR に有用な微生物として取り上げられた。しかし、研究を進めていく過程で、培養液粘度の増加が認められるようになり、石油公団と中国石油天然気股分有限公司吉林油田分公司との国際共同研究における MEOR フィールドテストで Huff & Puff 方式による油層内への圧入が行われ、油層内での増殖による粘度の増加が確認されている微生物である¹³⁾。

TRC-322 は同定の結果、*Enterobacter* 属の細菌であることが明らかになっている。主な特徴として、長径約 1.0~1.5 μm 、短径約 0.5~1.0 μm の棒菌であること、グラム陰性細菌であること、運動性を有することなどが挙げられる。さらに、安全性試験により、この微生物の病原性や毒性について調べた結果、安全であることが確認されている。

3.2 ポリマーの安定生産に有効な添加物

3.2.1 寒天平板培養実験

TRC-322 はモラセスを主成分とした寒天平板培地上において培養すると粘稠なコロニーを形成し、さらに、このコロニーを蒸留水中に溶解させると高粘度の溶液が得られることから、このコロニーに見られる粘稠な物質が TRC-322 培養液粘度の増加に関連しているとみられる。そこで、この物質の生産に影響を及ぼす因子として無機塩類に着目し、以下のような実験を行った。

まず、寒天平板培地（モラセス 2% + 寒天 3%）上に種々の無機塩類水溶液を浸透させた紙片を置き、この上に TRC-322 の懸濁液を滴下して、3 日間培養する。そして、コロニーの大きさ（すなわち粘稠な物質の多さ）から粘性物質の生産性について評価した。実験の対象とする無機塩類として、モラセス中に微量に含まれているものや油層水中に微量に含まれているものなどから表 5 に示す 9 元素、14 種類の物質を選定し、実験に供した。なお、各無機塩類の添加濃度は、調査対象元素の濃度がすべて同一になるように調整した。

図 1 に、実験前後の寒天平板培地の変化を示す。各ろ紙片上に形成されたコロニーの大きさから、 K_2HPO_4 、 NaNO_3 、 NaHCO_3 、 NH_4NO_3 ならびに $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ の 5 種類の無機塩類と菌体希釈用緩衝溶液である HEPES（主要成分は $\text{C}_8\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$ ）について、TRC-322 の水溶

表 5 寒天平板培養実験に用いた無機塩類

試験対象元素	添加無機塩類	添加濃度 (mg/l)
Na	NaCl	13
	NaHCO_3	18
	NaNO_3	30
K	KCl	10
Ca	CaCl_2	14
P	K_2HPO_4	28
Mg	$\text{MgCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	20
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	51
Fe	$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	24
	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	15
Mn	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	18
S	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_3$	21
	$\text{NaHSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	30
N	NH_4NO_3	14

図 1 寒天平板培養実験結果（30℃で3日間培養後）

性ポリマー生産に影響を及ぼしている可能性があるかと判断した。

3.2.2 液体培養実験

次に、上述の寒天平板培養実験により選択した 6 種類の物質を添加した液体培地（モラセス 4%）を用いて TRC-322 の培養実験を行い、培養液粘度を測定することにより液体培地中でのポリマー生産能力を評価した。各添加物は、寒天平板培養実験で用いた水溶液濃度を基準として、その 5 倍ならびに 10 倍の濃度となるようにした。

8 日間培養した時点での各培養液粘度の測定結果を表 6 に示す。実験の結果、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ を添加した培地において安定的に培養液粘度の増加が認められ、その値は水の 10 倍程度であった。

さらに、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ の添加量を変化させて行った

培養実験では、図2に示すように、100ppm程度の濃度で十分な粘度増加を示しており、少量の $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ の添加がTRC-322のポリマー生産に有効であることがわかった。

また、図3に示すように、モラセス濃度を変化させた培養実験では、モラセス濃度2%の培地において最も高い粘度(13.2cP at 10rpm)が得られ、モラセス濃度3

表6 液体培養実験結果

添加無機塩類 (CM4に添加)	濃度 (mg/l)	培養液粘度 (cP)	
		100rpm	10rpm
K_2HPO_4	28	1.6	—
	140	1.2	—
	280	1.1	—
NaNO_3	30	1.1	—
	150	1.2	—
	300	1.1	—
NaHCO_3	18	1.5	—
	90	1.2	—
	180	1.2	—
NH_4NO_3	14	1.2	—
	70	1.1	—
	140	1.1	—
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	15	3.5	13.0
	75	3.1	10.7
	150	3.3	9.1
HEPES	—	1.5	—
無添加	—	1.6	—

(30℃で8日間培養。表中の“—”は粘度計測定範囲以下を示す)

図2 TRC-322 培養液粘度に及ぼす $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 添加量の影響

(30℃で8日間培養。粘度計測定範囲以下であった場合は1.0にプロットした)

図3 TRC-322 培養液粘度に及ぼすモラセス濃度の影響

(30℃で8日間培養。 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 添加量は1,000ppm)

%以上ではモラセス濃度によらず培養液粘度はほぼ一定であった。

このように、TRC-322の安定した水溶性ポリマー生産に関して、その誘導物質である $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ は少量の添加量で効果があること、ならびにモラセス濃度は約2%で十分であるという結果が得られ、元々炭酸ガスを多量に生産するTRC-322はさらにMEORへの有用性を高めたことになる。しかし、その最高値は13.2cPであり、またTU-7Aについても、本研究で得られたTU-15Aの値に比較してかなり小さい。これらのことから、ここではTU-15Aを取り上げ、TU-15Aをフィールドに用いることを想定して必要な検討を進めることとした。

4. TU-15A

TU-15Aは、新たなサンプリングにより得られた微生物であり、元々中国吉林省の新木油田油層内に棲息していた微生物である。図4に示すように、SB4CMに植菌すると速やかに増殖し、約24時間で菌体濃度が約 1.0×10^8 cells/mlに達する。その後、水溶性ポリマーの生産により培地の粘度が増加し、10日間の培養で培養液粘度を70cP以上に増加させる。このようにTU-15Aは、モラセスのみを基質とした培地で培養液粘度の著しい増加をもたらす、ポリマー生産能力とその扱いやすさにと秀でている微生物である。本研究では、TU-15Aについて室内培養実験による最適培養条件の検討と油層内環境への適応性の検討を行った。

4.1 微生物学的特徴

TU-15Aは*Clostridium*属の細菌であり、主な特徴として、長径 $2.0 \sim 6.5 \mu\text{m}$ 、短径 $1.0 \sim 1.5 \mu\text{m}$ の棒菌であること、 $0.5 \sim 1.0 \mu\text{m}$ の内生孢子(細胞内に形成され

る孢子)を形成すること、グラム陽性細菌であること、運動性を有することなどが挙げられる。さらに、安全性試験で病原性や毒性がないことを確認している。

一般に *Clostridium* 属の細菌は、酸素が存在しない環境でのみ生育できる偏性嫌気性細菌であることが多いが、中には極めて微量の酸素に対して耐性を有するものも存在し、TU-15 A は後者に属する。培養容器内の気相部の酸素濃度を変化させて行った培養実験により、酸素濃度が約0.7%以下であれば増殖可能であることを確認している。これを図5に示す。0.7%以上の酸素が存在する場合には10日間培養を継続しても増殖は認められなかった。

4.2 培養条件の検討

微生物の増殖ならびに代謝活動に影響を及ぼす培養条件パラメーターは多くあるが、MEORにおける圧入微生物の培養の場合は油層内であるため、人為的に調整可能な培養条件は限られる。本研究ではモラセス濃度ならびに培地の pH が増殖ならびに水溶性ポリマーの生産に及ぼす影響について検討した。培地の pH は、TU-15 A

図4 TU-15 A の増殖曲線と培養液 pH ならびに培養液粘度の経時変化

図5 TU-15 A の増殖に及ぼす酸素濃度の影響

自身が生成する有機酸のほかに、モラセス原液が希釈されて適度のモラセス濃度になったとき原液中に存在する微生物が急激に増殖し、そのとき生成する有機酸によって大きく変化する、あるいは油層内培養でその他の微生物が生成する有機酸によって変化することもある。

4.2.1 モラセス濃度の影響

モラセス濃度が0.5%から4.0%まで0.5%刻みで異なる培地を用いて TU-15 A の培養実験を行った。10日間培養した後の培養液粘度の測定結果を図6に示す。モラセス濃度の増加により培養液粘度も直線的に増加している。この実験における各モラセス濃度での TU-15 A の最大菌体濃度は、モラセス濃度が高くなるほど高くなっていることから、モラセス濃度の増加によって TU-15 A の絶対数が増加し、生産されるポリマーの総量が増加したため、培養液粘度が増加したものと考えられる。さらに、モラセス濃度の増加により TU-15 A の増殖とポリマーの生産が速まることも明らかとなった。

以上の結果は、TU-15 A をフィールドに適用する場合に、圧入する培地のモラセス濃度によって油層内で得られる水相粘度が決まり、極めて高い水相粘度を得ることも可能であることを示している。また、対象となる油層における水相粘度と増進回収効果との関係が把握されれば、経済性を考慮した最適な圧入モラセス濃度を決定することができることになる。

4.2.2 培地 pH の影響

SB4CM に塩酸あるいは水酸化ナトリウムを添加し、初期 pH を4.0から9.5まで0.5刻みで変化させた培地を用いて TU-15 A の培養実験を行った。10日間培養した後の培養液粘度の測定結果を図7に示す。

設定した pH が5.5から9.0の培地で培養液粘度の増加が認められ、なかでも pH が7.5の培地の場合に培養液粘度が最高となった。設定 pH が5.0以下ならびに9.5の培地においては TU-15 A の増殖も認められなかった。

図6 TU-15 A の培養液粘度に及ぼすモラセス濃度の影響

図7 TU-15 A の培養液粘度に及ぼす培地の初期 pH の影響

これらのことから、TU-15 A が増殖するための pH 範囲は5.5～9.0であり、ポリマー生産に最も適した pH は約7.5、適正 pH 範囲は7.0～9.0であることがわかった。したがって、TU-15 A を植菌する段階で培地の pH を7.0～9.0とすることが重要である。

扶余油田の場合、水攻法で使用している圧入水で作成した4%モラセス培地の pH は7.7であるので、モラセス原液中に存在する微生物が TU-15 A を植菌する前に増殖をしないように配慮する（希釈後速やかに植菌する）だけで十分であることになる。

また、一般には、油層内に存在する他の微生物が代謝する有機酸などによる培地 pH の低下が懸念される場合もあり得ると考えられる。しかし、扶余油田の油層水に関しては、油層水自体が pH の緩衝作用を有している。その一例を示すと、油層水中に存在する微生物を培養して pH が低下した培養液 (pH=6.1) に、その 1/5 量の扶余油田産油層水（生産水、pH=7.7）を添加すると、pH が7.3にまで回復した。油層内ではこの程度の希釈は十分に起こり得るものと推測される。したがって、扶余油田および油層水が同様の pH の緩衝作用を有する油田では、油層内で微生物が生成する有機酸による pH 低下の影響は小さいものと考えられる。

4.3 油層内環境への適応性に関する検討

油層内環境への適応性に関する検討とは、圧入微生物が油層環境（微小孔隙内、油層内棲息微生物との競合などの環境）のもとで増殖し、機能を発現できるかどうかの検討である。TU-15 A は前述の通り、元々油層内に棲息していた微生物であるが、MEOR において培地とともに油層内へ圧入された場合に、油層内で優先的に増殖して水溶性ポリマーを生産するかどうかについては検討の必要がある。本研究では、微小孔隙内環境、原油の存在ならびに油層内棲息微生物との競合環境が TU-15 A の増殖と水溶性ポリマーの生産に及ぼす影響について検

討した。

4.3.1 微小孔隙内環境の影響

微小孔隙内環境の影響は、珪砂（市販の7号珪砂、平均粒径：150 μ m）を充填して作製した珪砂充填層内での菌体濃度の変化により評価した。珪砂充填層は、前培養で対数増殖期にある TU-15 A を SB4CM に植菌し、攪拌して菌体を均一に分散させた後、振動を与えながら速やかに珪砂を充填して作製した。

菌体濃度と培養液粘度を経時的に測定した結果を図8に示す。約100時間の増殖の遅れ（誘導期）が生じていることが分かる。また、培養液粘度の増加も培養開始から約200時間後になって認められている。通常の液体培地での培養で、増殖が活発な状態にある細菌を接種した場合、図4に示したように、増殖の遅れはほとんど認められない。したがって、遅れが見られたここでの結果は、微小孔隙内環境の影響が現れたものと考えられる。

しかし、油層内で TU-15 A が増殖を開始する前に、圧入培地を利用して油層内に存在する他の微生物が増殖して優先種になってしまうと、TU-15 A の増殖が妨げられることが懸念されるため、誘導期間は可能な限り短時間であることが好ましい。そのための対策として、前述した圧入する培地のモラセス濃度を増加させる方法、あるいは初期菌体濃度を高めて圧入する方法が考えられるが、経済性を考慮した場合、初期菌体濃度を高める方法が好ましい。そこで、次に、模擬油層内での培養実験を行い、初期菌体濃度を高めた場合における TU-15 A の増殖への影響について検討した。

4.3.2 模擬油層内培養実験

実験に用いた模擬油層は、長さ300mm、内径40mmのアクリルパイプ内に珪砂ならびに扶余油田産原油を充填したものである（孔隙率37.1%、油飽和率28.9%）。SB4CM に TU-15 A を初期菌体濃度がこれまでより一桁高い 1.0×10^6 cells/ml となるように植菌した液を模

図8 微小孔隙内環境における TU-15 A の増殖曲線と培養液粘度の経時変化

擬油層内に 2.0 PV 圧入した後、30℃で静置培養した。なお、この実験で使用した器具等は滅菌処理したものである。TU-15 A は増殖すると水溶性ポリマーとともにガスを生産するので、培養系内の圧力が上昇する。そこで、培養中の圧力変化から模擬油層内での TU-15 A の増殖を評価した。

図 9 に、培養中の模擬油層内圧力の変化を示す。圧力は培養開始から約 24 時間後に上昇し始めている。TU-15 A のガス生産は水溶性ポリマーの生産と同様に、菌体濃度が最高値に達した後から認められるため、模擬油層内において TU-15 A が 24 時間以内に増殖を開始したことが示された。

この結果から、TU-15 A をフィールドへ適用する場合に懸念された増殖の遅れは、圧入する TU-15 A の初期菌体濃度を 1.0×10^6 cells/ml 以上に調整することにより、解決できるものと考えられる。

また、本実験は原油が存在する充填層内での増殖をみたものであり、この結果から、TU-15 A の増殖に原油の存在が影響を与えないことも確認できた。

4.3.3 油層内棲息微生物との競合

当該油田の油層内には総計で数十種の微生物が棲息している¹⁴⁾ことが明らかにされているが、それらのすべてに対する競合性を個々に検討することは極めて困難である。そこで、本研究では、油層水中に共存しているそのままの状態の微生物との競合について検討した。

実験に用いた競合微生物が存在する培地は、扶余油田の 1 つの生産井からの生産水（非滅菌）に滅菌したモラセスを 4 % となるように加えて調整したものである。この培地に TU-15 A を初期菌体濃度が 4.0×10^5 cells/ml となるように植菌し、実験を開始した。なお、藤原¹⁵⁾による PCR-RFLP 法を用いた分析の結果、実験に用いた油層水中には 6 種類の微生物が存在しており、その総菌体濃度は 5.0×10^5 cells/ml であった。したがって、

図 9 模擬油層内培養実験における油層内圧力の経時変化

実験開始時の条件は、TU-15 A の初期菌体濃度 4.0×10^5 cells/ml、油層水中の微生物の初期菌体濃度は培地調整のための希釈によって低下し、 1.0×10^5 cells/ml であった。培養液粘度ならびに pH を経時的に測定した結果を図 10 に示す。

実験の結果、培養液粘度の増加は 50 時間以降停止しており、その値は TU-15 A を純粋培養した場合に比べて低く、約 10 cP であった。また、pH の変化についてみると、実験開始から 1 日で 6.1 にまで低下しており、TU-15 A を純粋培養した場合（実験開始 5 日目で 6.1 に達する）に比して急激な低下である。これは主に油層水中の微生物が生産した有機酸によるものと考えられる。すでに述べたように、TU-15 A は pH により大きく影響を受けることから、この pH の急激な低下が培養液粘度の増加を停滞させた主な原因と推定される。

しかし、前述したように、油層内では油層水が有する pH の緩衝作用により pH の低下はこの実験結果ほど急激にはならないものと推測される。ただし、pH の経時変化から、油層水中の微生物の増殖は TU-15 A の増殖と比較して速いということが推測され、その分 TU-15 A が利用可能な糖が他の微生物に奪われていることになる。したがって、圧入した培地の効率的な利用を目指すためには TU-15 A の増殖を速める必要があり、これには、TU-15 A を高い初期菌体濃度 (1.0×10^6 cells/ml 以上) で油層内に圧入することで対応できるものと考えられる。

5. おわりに

本研究では、高能力水溶性ポリマー生産微生物を得るために、筆者らの研究グループがこれまでに採取した微生物と新たに採取した微生物についてスクリーニングを行った。これらの結果をまとめると以下のようなものである。

(1) これまでに当研究グループが得た約 80 種類の微生物

図 10 油層内棲息微生物との競合環境における培養液 pH ならびに培養液粘度の経時変化

物の中から、水溶性ポリマー生産微生物として TRC-322 と TU-7A を得た。また、新たな探索により、TU-15A と TU-13F1 を得た。このうち前三者はオクラホマ大学の SP018 と同等あるいはより高い値を示した。特に TU-15A は水の約70倍もの培養液粘度の増加をもたらす、能力の高い水溶性ポリマー生産微生物である。

- (2) 得られた水溶性ポリマー生産微生物のうち、2番目に高い粘度を示した TRC-322 に関して、安定して水溶性ポリマーを生産させるための条件について調べた。その結果、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ の添加が必要であることがわかった。また、その添加量は約 100 ppm 程度で十分であり、モラセス濃度も 2% 程度で十分であることがわかった。TRC-322 は水の十数倍の培養液粘度の増加をもたらす。
- (3) TRC-322 は炭酸ガスを多量に生産する微生物であるが、水溶性ポリマーも生産する条件下で用いられ、これらの複合効果が期待される有用な微生物である。
- (4) TU-15A は、モラセス濃度に比例して培養液粘度を増加させるので、適用するフィールドに応じた必要十分な培養液粘度がわかれば、経済性を考慮した最適圧入モラセス濃度を決定できる。また、ポリマー攻法では困難なほど水相を高粘度にすることも可能である。
- (5) TU-15A の水溶性ポリマー生産の至適 pH 範囲は 7.0~9.0 で、最適 pH は約 7.5 である。
- (6) 想定油層とした扶余油田の油層水は pH が 7.7 であり、pH の緩衝作用を有している。このような油層は、pH に関して TU-15A の水溶性ポリマー生産に適した環境にある。
- (7) TU-15A は初期菌体濃度を 1.0×10^5 cells/ml とすると、微小孔隙内環境ならびに油層内棲息微生物との競合により影響を受けることが示唆された。しかし、TU-15A を油層内へ圧入する際に、初期菌体濃度を 1.0×10^6 cells/ml 以上に設定すると油層内で優先増殖種となることが期待される。

謝 辞

(株)関西新技術研究所・藤原和弘博士には、TU-15A の同定、微生物学的特徴に関する各種分析ならびに油層水中に棲息する微生物の分析において貴重な助言を賜りました。ここに記して感謝いたします。

SI 単位換算係数

$$\text{kgf/cm}^2 \times 9.80655^* \quad \text{E}+04 = \text{Pa}$$

$$\frac{\text{cP} \times 1.0^*}{\text{rpm} \times 1.0^*} \quad \text{E}-03 = \text{Pa} \cdot \text{s} = \text{min}^{-1}$$

* は正確な値

引 用 文 献

- 1) 米林英治・田口 充・藤原和弘・吉田信一郎・榎本兵治, 1996: 微生物攻法に関する研究の現状とフィールドテストへの展望. 石技誌, **61** (6), 487-493.
- 2) Yonebayashi, H., Ono, K., Enomoto, H., Chida, T., Hong, C. X., Fujiwara, K., 1997: Microbial Enhanced Oil Recovery Field Pilot in a Waterflooded Reservoir, *Society of Petroleum Engineers*, **38070**.
- 3) 木下 睦・榎本兵治・鴻巣 彬・千田 信, 1992: 石油の増回収を目的とした炭化水素利用菌の集積培養に関する研究 (第 1 報)—炭化水素利用菌の探索と代謝機能によるスクリーニング—. 石技誌, **57** (2), 125-132.
- 4) 木下 睦・榎本兵治・鴻巣 彬・千田 信, 1992: 石油の増回収を目的とした炭化水素利用菌の集積培養に関する研究 (第 2 報)—単離菌に対する金属イオンの影響—. 石技誌, **57** (2), 133-141.
- 5) 木下 睦・榎本兵治・千田 信, 1994: 石油の増回収を目的とした炭化水素利用菌の集積培養に関する研究 (第 3 報)—酵母エキスの添加の影響—. 石技誌, **59** (2), 174-179.
- 6) 木下 睦・榎本兵治・千田 信, 1994: 石油の増回収を目的とした炭化水素利用菌の集積培養に関する研究 (第 4 報)—2F-NW8901 菌種の利用に関する研究—. 石技誌, **59** (2), 180-186.
- 7) 米林英治・洪 承燮・木下 睦・榎本兵治・千田 信, 1996: 嫌気性菌の油層内培養による石油の増進回収法に関する基礎的研究—菌の採取と集積培養菌のスクリーニング—. 石技誌, **61** (4), 311-318.
- 8) 米林英治・洪 承燮・木下 睦・榎本兵治・千田 信, 1996: 嫌気性菌の油層内培養による石油の増進回収法に関する基礎的研究—単離菌の機能性評価—. 石技誌, **61** (5), 443-451.
- 9) 米林英治・洪 承燮・木下 睦・榎本兵治・千田 信, 1997: 嫌気性菌の油層内培養による石油の増進回収法に関する基礎的研究—サンドバックを用いた MEOR の評価実験—. 石技誌, **62** (3), 195-202.
- 10) 米林英治・洪 承燮・木下 睦・榎本兵治・千田 信, 1997: 嫌気性菌の油層内培養による石油の増進回収法に関する基礎的研究—9A 菌を用いた油増進回収実験における排油挙動の検討—. 石技誌, **62** (4), 304-310.
- 11) Yonebayashi, H., Yoshida, S., Ono, K., Enomoto, H., 2000: Screening of Microorganisms for Microbial Enhanced Oil Recovery Processes, "*Sekiyu Gakkaishi*", **43** (1), 59-69.
- 12) Pfiffner, S. M., McInerney, M. J., Jenneman, G. E., Knapp, R. M., 1986: Isolation of halotolerant, the-

- motolerant, facultative polymer-producing bacteria and characterization of the exopolymer, *Applied Environment Microbiology*, **51**(2), 1224-1229.
- 13) Ohno, K., Maezumi, S., Sarma, H. K., Enomoto, H., Hong, C. X., Zhao, S. C., 1999 : Implementation and Performance of a Microbial Enhanced Oil Recovery Field Pilot in Fuyu Oilfield, China, *Society of Petroleum Engineers*, **54328**.
- 14) 藤原和弘・田中信治・大塚牧子・中谷一記・前角繁之・矢澤仁徳・洪 承燮・千田 侑・榎本兵治, 2000 : 微生物攻法 (MEOR) フィールドテストのための油層内細菌活動に関する調査. 石油学会誌, **43** (4), 274-284.
- 15) Fujiwara, K., Tanaka, S., Ohtuka, M., Ichimura, N., Yonebayashi, H., Hong, C. X., Enomoto, H., 1999 : Evaluation of the Use of Amplified 16SrRNA Gene-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis to Detect *Enterobacter cloacae* and *Bacillus licheniformis* for Microbial Enhanced Oil Recovery Field Pilot, "*Sekiyu Gakkaishi*", **42** (5), 342-351.
- 16) Sugai, Y., Kishita, A., Hong, C. X., Enomoto, H., Chida, T., Zhou, S. C., 1999 : Laboratory Investigation of Polymer Producer TU-15A for MEOR Field Tests, *Society of Petroleum Engineers*, **54381**.