

## [Regular Paper]

# Characterization of a Water-insoluble Polymer Producing Bacterium *Enterobacter* sp. CJF-002 for MEOR

Makiko OTSUKA<sup>†1)</sup>, Kazuhiro FUJIWARA<sup>†2)</sup>, Yuichi SUGAI<sup>†3)\*</sup>, Atsushi KISHITA<sup>†4)</sup>,  
Heiji ENOMOTO<sup>†4)</sup>, Tadashi CHIDA<sup>†4)</sup>, Nintoku YAZAWA<sup>†5)</sup>, Keiji NAGASE<sup>†5)</sup>,  
Chengxie HONG<sup>†6)</sup>, and Cui Ji<sup>†6)</sup>

<sup>†1)</sup> KRI Inc., Kyoto Research Park, 134 Chudoji Minami-machi, Shimogyo-ku, Kyoto 600-8813, JAPAN

<sup>†2)</sup> Chugai Technos Co., Ltd., 9-12 Yokogawa Shinmachi, Nishi-ku, Hiroshima 733-0013, JAPAN

<sup>†3)</sup> Venture Business Laboratory, Akita University, 1-1 Tegatagakuen-machi, Akita 010-8502, JAPAN

<sup>†4)</sup> Graduate School of Environmental Studies, Tohoku University, 01 Aoba, Aramaki, Aoba-ku, Sendai 980-8579, JAPAN

<sup>†5)</sup> Technology Research Center, Japan National Oil Corp., 1-2-2 Hamada, Mihama-ku, Chiba 261-0025, JAPAN

<sup>†6)</sup> Jilin Oilfield Co., PetroChina Co., Ltd., Ningjiang District Songyuan, Jilin 138001, CHINA

(Received December 3, 2003)

In the MEOR field test project conducted in Fuyu Oilfield, Jilin Province, China, *Enterobacter* sp. CJF-002 which produces water-insoluble polymer was injected into the reservoir. As a result, the volume of oil production in the test area increased by more than twice because the high permeable zones were plugged with the water-insoluble polymer produced by CJF-002, and the water channeling in the reservoir was reduced.

CJF-002 is a facultative anaerobe isolated from the rock of the oil reservoir in the Fuyu Oilfield. This microbe was identified as belonging to the genus *Enterobacter* based on 16S rRNA gene phylogenetic analysis. Cells are gram-negative, motile rods. The isolate was grown with 1% Chinese molasses as substrate and produced water-insoluble polymer *ca.* 180 mg·dw/l. This water-insoluble polymer could absorb water at 200 times the dry weight, and formed a gel in the culture medium. This water-insoluble polymer was a cellulose derivative which consisted mainly of glucose.

The effect of cultivation conditions, such as concentration of molasses, temperature, pH, salinity, sugar, oxygen, pressure and initial concentration of bacterium, were evaluated for the growth and production of water-insoluble polymer by CJF-002. CJF-002 was suitable for the MEOR process in the Fuyu Oilfield, because this microbe could grow and produce adequate polymer under the conditions of the test field. Moreover, CJF-002 could be applied widely to a broad range of reservoirs, because growth and production of the water-insoluble polymer were observed under various reservoir conditions except the condition of greater than 1% salinity.

## Keywords

MEOR, *Enterobacter* sp., Cellulose derivative, Reservoir environment, Field test

## 1. はじめに

MEOR (Microbial Enhanced Oil Recovery: 微生物 EOR) は、石油の増進回収に有用な性質や機能を有する微生物を油層内で培養し、増殖する際の微生物反応を利用して石油の増進回収を図る方法である。一般に MEOR では、増殖した微生物細胞自体による油層内高浸透領域の閉そく効果、石油資化性微生物による石油粘度の低下効果、ならびに微生物の代謝産物（ガス、ポリマー、有機酸、界面活性物質など）による油や水の流動性の改善効果などが期待されている。したがって、異なる機能を有する微生物を対象油層の状況に応じて使い分けることにより、幅広い様々な油層において増進回収が可能であることが利

点の一つとして挙げられる。そのため、MEOR の適用を検討する際には、対象油層の微生物学および油層工学的条件ならびに残油状況を把握し、その油層に最も効果的な微生物を選定して研究を進めることが重要となる。

筆者らの研究グループが参画した石油公団と中国石油天然气股份有限公司吉林油田分公司との MEOR 国際共同研究<sup>1,2)</sup> では、バイオフィーム（非水溶性ポリマー）を生産する *Enterobacter* sp. CJF-002（以下、CJF-002 と略称する）を用いた MEOR フィールドテストが行われた。この MEOR フィールドテストの実施と増油効果については既に報告<sup>3)</sup> されているので詳細な説明を省略するが、CJF-002 とモラセス（中国吉林省産の甜菜由来、Table 1）とを油層内に圧入して油層内培養し、生産された非水溶性ポリマーが、当該フィールドである同分公司の扶余油田で顕著に発達しているフラクチャーやたい積環境によって生じた高浸透領域を閉そくし、油層内流体の流れのプ

\* To whom correspondence should be addressed.

\* E-mail: ysugai@ipc.akita-u.ac.jp

Table 1 Contents of CM<sup>a)</sup>

Contents		
Total nitrogen	[%]	1.32
Ash	[%]	7.2
Volite basic nitrogen	[ppm]	200
P	[ppm]	62
Fe	[ppm]	366
Ca	[ppm]	1458
Na	[ppm]	11220
K	[ppm]	23800
Mg	[ppm]	286
Cl	[ppm]	11020
Fructose	[%]	0.54
Glucose	[%]	0.96
Sucrose	[%]	40
Direct reducing nitrogen	[%]	2.3
Total sugar	[%]	44.4
Amino nitrogen	[ppm]	2600
Sulfur dioxide	[ppm]	10
Nitrate	[ppm]	3400
Cu	[ppm]	0.62
Zn	[ppm]	9.24
Mn	[ppm]	12.72
SiO <sub>2</sub>	[ppm]	34
Al	[ppm]	3

a) Lot. June 12, 1998.

ロファイル・モディフィケーションをもたらした結果、オイルカットが試験前に比べて2倍以上にまで回復するという極めて高い石油増進回収効果が得られている。

筆者らの研究グループのほかにも、非水溶性ポリマーを生産する微生物を利用した MEOR に関する研究は数例報告されている。Jenneman<sup>4)</sup>は、油層内に栄養源のみを圧入して、油層内に棲息（せいそく）している土着の微生物を活性化させ、菌体自身ならびに微生物が生産する非水溶性ポリマーによって、特に垂直方向の圧入プロファイルの改善を図るフィールドテストを行っている。この研究では、栄養源の圧入後、油層内の微生物が生産したと見られる有機物（アセテート）を生産井から検出しており、圧入プロファイルの改善も認められている。しかし、油層内には多くの微生物が棲息しているにもかかわらず、同一油層であっても全体に広く棲息する微生物は予想外に少ない<sup>5)</sup>。したがって、ある特定の機能を発揮させる場合に油層内の微生物相を変化させずに広く効果を発揮させるのは極めて困難であると考えられる。また、油層内の微生物が生産した有機物の分析結果と圧入プロファイルの改善との関連が明確にされていない。一方、Lee<sup>6)</sup>は、地上から非水溶性ポリマー生産微生物（*Bacillus licheniformis*）を胞子の状態で油層に圧入し、その後栄養源を圧入して油層内で発芽、増殖ならびに非水溶性ポリマーを生産させる MEOR プロセスについて検討している。この研究では、室内実験による圧入条件の検討からフィールドテストまでを行っており、特にフィールドテストでは極めて効果的な圧入プロファイルの改善が実証されている。しかし、多くの土着微生物が棲息する油層内で、圧入した胞子の発芽、増殖、ポリマー生産が期待通りに進化したことの証明が不十分で、それらの挙動解析と圧入プロファイルの改善との関連が明確で

ない。

これらの研究に対し、前述した筆者らの MEOR フィールドテストは、油層内における圧入微生物やその他の微生物の挙動、特にそれらの競合関係を把握し、油層のプロファイル・モディフィケーションと圧入微生物ならびにその微生物が油層内で生産した非水溶性ポリマーとの関連性を明らかにすることに重点をおいた研究である。すなわち、油層内に棲息する土着の微生物相の調査<sup>5),7)</sup>、当該フィールドへの適用を目的とした有用微生物の選択と土着微生物との競合に関する検討、CJF-002の効果的な利用を目的とした圧入操作条件の検討、油層内における CJF-002 の増殖・代謝挙動の追跡、ならびに非水溶性ポリマーの生産に伴う油層内流体の流動挙動変化の解析などを行い、最終的に油層内における微生物の挙動と石油増進回収との関連性を明らかにすることを目的としたものである。

このうち本報では、CJF-002 に関する基礎的特性について検討を行った結果を報告する。まず、CJF-002 の微生物学的な特徴と CJF-002 が生産する非水溶性ポリマーの化学的特徴を明らかにした。また、培養温度や培地の初期 pH などの基本的な培養条件が CJF-002 の増殖ならびに非水溶性ポリマーの生産に及ぼす影響を明らかにして、CJF-002 を MEOR に用いる場合に考慮すべき基本的な条件に関して検討した。

なお、本研究で得られた成果は、前述した MEOR フィールドテストにおける CJF-002 の圧入操作条件を決定する際に、極めて重要な役割を果たした。

## 2. 実験方法

### 2.1. CJF-002 の微生物学的特徴に関する解析

#### 2.1.1. 生理学的性状の判定方法

各種の生理学的性状の判定にはブドウ糖発酵性桿菌（かんきん）の同定キットである ID テスト・EB-20（日水製薬製）を用いた。

#### 2.1.2. 16S rRNA 配列による解析方法

16S rRNA 遺伝子のクローニングを行い、CJF-002 の塩基配列を解析した。まず、InstaGene Matrix 法<sup>8)</sup>（BIO-RAD 社製）を用いて CJF-002 の染色体 DNA を抽出し、鋳型 DNA とした。また、5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' と 5'-AAAG-GAGGTGATCCAGCC-3' を各々上流側および下流側プライマーに用い、Taq DNA ポリメラーゼ（宝酒造製）で PCR 増幅した。PCR 反応はサーマルサイクラー（Perkin-Elmer 製）を用い、Denaturation（94℃×1分）、Annealing（52℃×2分）ならびに Extension（72℃×2分）の反応サイクルを 30 回繰り返した。プラスミドベクターへの PCR 増幅断片のクローニングには pMOS Blue T-vector Kit（Amersham International plc 製）を、宿主菌には大腸菌（*Escherichia coli*）JM109 を用いた。大腸菌の形質転換は Sambrook らの方法<sup>10)</sup>により、L 培地（トリプトン 10 g/l、酵母エキス 5 g/l、NaCl 5 g/l、グルコース 1 g/l、pH 7.2）を用い、抗生物質を添加する場合は 100 µg/ml アンピシリンを用いた。クローニングした 16S rRNA 遺伝子は自動解析装置 ABI DNA Sequencer と ABI PRISM Dye Cycle Sequencing Kit（いずれも Perkin-Elmer 社製）を用いて解析した。相同性解析には BLAST search program<sup>11)</sup> を使用し、また解読した CJF-002 の 16S rRNA 遺伝子の塩基配列を日本 DNA データバンク（DDBJ）

Table 2 Analysis Conditions

GC (Hewlett Packard, HP5890A)	
Column	SPB-5 (Supelco Japan Ltd., fused silica capillary, 25 m × 0.25 mm I.D.)
Carrier	Helium
Oven	60°C (1.0 min) to 280°C (0 min) at 8°C/min
Injection	Splitless, 1 µl; inlet at 250°C
MS (JEOL, JMS DX-303)	
Ionization method	EI
HPLC (Shimadzu Corp., LC-9A)	
Column	TSK-gel Sugar AXG (Tosoh Corp., 150 mm × 4.6 mm I.D., for analysis of neutral sugar) Shimpak ISA-07 (Shimadzu Corp., 250 mm × 4.6 mm I.D., for analysis of uronic acid)
Eluent	0.5 mM (1 M = 1 mol·dm <sup>-3</sup> ) K <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> (pH = 8.7)
Flow rate of eluent	0.4 ml/min (for analysis of neutral sugar), 0.8 ml/min (for analysis of uronic acid)
Column temperature	70°C
Postcolumn marker	1% arginine/3% boric acid
Flow rate of postcolumn marker	0.5 ml/min
Reaction temperature	150°C
Injection	10 µl
Detector	Fluorescence Recording Spectrophotometer (Shimadzu Corp., RF-535)
Wavelength	Ex. 320 nm, Em. 430 nm

に登録した (アクセッション番号: BD091017)。

## 2.2. CJF-002 が生産する非水溶性ポリマーの化学的性質の分析

一般に、微生物が生産するポリマーは多糖であることが多く、CJF-002 が生産する非水溶性ポリマーも多糖であると考えられる。そこで、このポリマーを構成する糖とその結合様式について把握するために以下の分析を行った。

### 2.2.1. 構成糖の分析方法

まず、CJF-002 を中国産モラセス 4% の培地 (以下、この培地を CM4% 培地と略称する) で 3 日間培養して生産された非水溶性ポリマーを回収し、蒸留水で洗浄した後、凍結乾燥する。この凍結乾燥試料を、0.01 M (1 M = 1 mol·dm<sup>-3</sup>) のクエン酸-リン酸二ナトリウム緩衝液 (pH 5.0) 中で懸濁し、セルラーゼ TRL (*Tricoderma viride* 由来) を終濃度 0.1% となるように添加して、50°C で 3 日間の加水分解処理を行った。処理後の溶液を HPLC (high performance liquid chromatography) (島津製作所製, LC-9A) 分析に供し、構成糖を調べた。HPLC の詳細な分析条件は Table 2 に示す。

### 2.2.2. メチル化分析による構成糖の結合様式の分析

CJF-002 が生産した非水溶性ポリマーの凍結乾燥試料を用いて、粉末水酸化ナトリウム法により糖成分を完全メチル化して、生成したメチル化多糖をトリフルオロ酢酸で加水分解して単糖にする。これを無水酢酸-ピリジン溶液で還元アセチル化して、部分メチル化糖アルコールのアセチル誘導体 (部分メチル化アルジトールアセテート) とし、GC-MS (gas chromatography mass spectroscopy) による分析を行った。GC-MS による分析条件も Table 2 に示す。

## 2.3. CJF-002 の増殖と非水溶性ポリマーの生産に及ぼす培養条件の影響に関する実験方法

CJF-002 を MEOR に適用する際に考慮すべき最も基本的な条件として、原油の存在、モラセス濃度、温度、初期 pH、塩分濃度、炭素源種、酸素、圧力ならびに初期菌体濃度を取り上げ、これらの諸条件が CJF-002 の増殖ならびに非水溶性ポリマ

ーの生産に及ぼす影響について検討した。以下にそれぞれの実験における実験方法を述べる。

### 2.3.1. 基本的な培養条件

実験では、炭素源種の影響に関する実験を除いて、CM1% 培地を基本培地として用いた。前述した培地 30 ml を公称容量 50 ml のバイアル瓶に入れ密封し、高圧蒸気滅菌 (121°C, 20 分) 後、気相部分を窒素置換する。この培地に、普通寒天培地で培養して形成された CJF-002 の 1 コロニーを釣菌して植菌し、30°C で 2 日間静置培養する。これを前培養とし、この前培養液を新規の培地 (中国産モラセス濃度は前培養と同じ) に所定の初期菌体濃度となるように接種して、30°C にて培養実験を開始する。なお、この培地の初期 pH は 6.7 であった。

### 2.3.2. 微生物数の計数方法および非水溶性ポリマー生産量の測定方法

CJF-002 の菌体濃度を CFU (colony forming unit) として算出した。すなわち、培養液を滅菌蒸留水で 10<sup>1</sup>~10<sup>6</sup> 倍などに段階的に希釈後、その希釈液を普通寒天培地平板上に 100 µl 塗布する。これを 30°C で 24 時間培養した後、平板上に形成されたコロニーを計数し、培養液 1 ml 中の菌体濃度を算出した。また、非水溶性ポリマーの生産量は、実験後の培養液に浮遊する非水溶性ポリマーを回収し、蒸留水に浸漬して 121°C で 15 分間の高圧蒸気滅菌処理を行った後、培地成分を水洗浄によって除去し、凍結乾燥して重量を測定した。

### 2.3.3. 培養諸条件の設定

#### (1) 原油の存在の影響に関する実験条件

培地に CJF-002 を 6.0 × 10<sup>5</sup> cells/ml となるように接種した後、扶余油田産原油を 5 ml 重層し、気相部を窒素置換して培養実験を行った。なお、後述するが、本研究では油飽和率の低い領域において CJF-002 に非水溶性ポリマーの生産を行わせることを目的としていることから、以降の実験では原油を重層しない培地を用いることとした。

#### (2) モラセス濃度の影響に関する実験条件

培地のモラセス濃度を 0.01, 0.1, 1, 5 ならびに 10% に設定

Table 3 Composition of Polysaccharide Production Medium

Contents	[mg/l]
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1500
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1000
Sodium citrate	1000
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	500
FeCl <sub>3</sub> ·nH <sub>2</sub> O	10
NaCl	10
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	10
CaCO <sub>3</sub>	3000
Thiamine-HCl	5
Biotin	5

し、それぞれの培地に CJF-002 を  $1.0 \times 10^6$  cells/ml となるように植菌して実験を行った。

#### (3) 温度の影響に関する実験条件

培養温度を 5~30℃ の間で 5 段階に変化させて実験を行った。また、CJF-002 の初期菌体濃度は  $8.5 \times 10^6$  cells/ml とした。

#### (4) 初期 pH の影響に関する実験条件

CM1% 培地に塩酸および水酸化ナトリウムを添加して、培地の初期 pH を 3.0~12.0 の間で 13 段階に調整した。CJF-002 の初期菌体濃度は  $1.0 \times 10^6$  cells/ml とした。

#### (5) 塩分濃度の影響に関する実験条件

CM0.1% 培地に NaCl を 0 (無添加), 0.01, 0.1, 1, 2% となるように添加した。また、CJF-002 の初期菌体濃度は  $1.0 \times 10^6$  cells/ml とした。

#### (6) 炭素源種の影響に関する実験条件

ポリマー生産微生物の培養によく用いられる合成培地である Polysaccharide production medium<sup>12)</sup> (以下、PPM 培地と称する) に、スクロース、グルコースならびにフルクトースを添加した培地を用いた。PPM 培地の組成を Table 3 に示す。スクロース、グルコースならびにフルクトースの添加濃度を、それぞれ 1, 2, 4, 6% に変化させた。CJF-002 の初期菌体濃度は  $1.2 \times 10^6$  cells/ml となるように接種した。

#### (7) 酸素の影響に関する実験条件

酸素条件として、好気条件、微好気条件ならびに嫌気条件を設定した。好気条件はバイアル瓶口にアルミホイルを被せて封をすることで設定し、微好気条件は密封したバイアル瓶内の気相部分のみを窒素置換することで設定した。また、嫌気条件は密封したバイアル瓶内の水相部分に窒素を吹き込むことにより設定した。CJF-002 の初期菌体濃度は  $1.0 \times 10^5$  cells/ml とした。

#### (8) 圧力の影響に関する実験条件

耐圧シリンダーに CJF-002 を植菌した培地を充填後、30 atm に加圧して、圧力の影響を評価した。培地のモラセス濃度を 0.1% および 1% とし、CJF-002 の初期菌体濃度を  $5.0 \times 10^5$  cells/ml とした。

#### (9) 初期菌体濃度の影響に関する実験条件

CJF-002 の濃度が  $1.0 \times 10^3$  cells/ml,  $1.0 \times 10^6$  cells/ml ならびに  $1.0 \times 10^8$  cells/ml となるように培地に接種して培養実験を行った。

### 3. 結果と考察

#### 3.1. CJF-002 の微生物学的特徴

CJF-002 は、前述した MEOR 国際共同研究における有用微生物の探索の過程で、扶余油田の油層岩より分離された微生物である。この CJF-002 の主な特徴および ID テスト・EB-20 による生理学的性状の判定結果を Table 4 に示す。これらの結果を Bergey's Manual of Systematic Bacteriology<sup>9)</sup> に記載されている *Enterobacter cloacae* の生化学的性状と比較した結果、Table 4 に示すように Strain CJF-002 の性状は D-ラフィノースからの酸生成能を欠くほかは *Enterobacter cloacae* ATCC と全く同様の性状を示した。さらに、16S rRNA 遺伝子の塩基配列 (1533 bp) を解読し相同解析を行った結果、*Enterobacter cloacae* ATCC1304<sup>T</sup> との相同性が 98.8% であり、これらの結果から、CJF-002 は *Enterobacter* 属に属することが示された。

CJF-002 は油層内に広く棲息していた微生物ではないが、元々油層内に棲息していた微生物であるため、MEOR において油層内での増殖が可能であると考えられる。また、CJF-002 は普通寒天培地で培養すると、白色・しわ状の特徴的なコロニーを形成するため (Fig. 1)、複数種の微生物との混合の培養において、他の微生物との判別が比較的容易であるという特徴も有する。なお、実験動物を用いた安全性試験により、CJF-002 の安全性についても確認されている。

#### 3.2. CJF-002 が生産する非水溶性ポリマーの特徴

CJF-002 が生産する非水溶性ポリマーの写真を Fig. 2 に示す。Fig. 2(a) において横転させたバイアル瓶口から出ているゲル状の物質が、培養液を包含した非水溶性ポリマーである。このポリマーを電子顕微鏡で観察すると、微細な網の目状の構造が認められた (Fig. 2(b))。これは、各菌体から産出されるポリマーが相互に絡み合って形成されたものと考えられる。なお、このポリマーを純水で洗浄し、凍結乾燥前後での重量変化を評価することにより、このポリマーが自重の 200 倍程度の水を包含できることが分かった。このことは、CJF-002 が生産する非水溶性ポリマーは油層内流体のプロファイルを改善するのに必要な閉そく効果をもたらす可能性が高いことを示唆している。

この非水溶性ポリマーについて分析した結果、その構成糖は、大部分がグルコース (97.3%) であり、その他に、アラビノース (1.3%)、ガラクトース (1.0%) ならびにマンノース (0.4%) が検出され、ウロン酸は検出されなかった。また、メチル化分析の結果、1,4,5-ジ-*o*-アセチル-2,3,6-トリ-*o*-メチルグルシトールのピークが最も大きなピークとして検出された。このピークの面積は、非還元末端グルコース (1,5-ジ-*o*-アセチル-2,3,4,6-テトラ-*o*-メチルグルシトール) のピーク面積を 1 とした場合に 29.22 であり、その他に検出されたピークの面積 (すべて 0.5 未満) に比して極めて大きかった。この結果から、非水溶性ポリマーの主要な結合様式は 1,4 結合であると推定した。さらに、この非水溶性ポリマーは、 $\alpha$ -1,4 結合を切断するアミラーゼでは分解されず、 $\beta$ -1,4 結合を切断するセルラーゼで分解されることを確認しており、 $\beta$ -1,4 結合であると推定される。

以上の分析結果から、CJF-002 が生産する非水溶性ポリマー

Table 4 Morphological, Biochemical, and Phenotypic Features of CJF-002<sup>9)</sup>

Characteristic	CJF-002	<i>Enterobacter cloacae</i>
Morphology		
Cell shape	Straight rod	Straight rod
Cell size [ $\mu\text{m}$ ]	0.5-1.0 $\times$ 1.5-3.0	0.5-1.0 $\times$ 1.5-3.0
Color of colony	White	White
Gram stain	-	-
Motility	+	+
Temp. range for growth [ $^{\circ}\text{C}$ ]	4 > ~ 45	20-30 (environmental strains)
Suitable temp. range for growth	25-35	37 (clinical strains)
pH range for growth	2.2-9.53	2.2-9.53
Suitable pH range for growth	4.11-9.30	4.11-9.30
Aerobic growth	+	+
Anaerobic growth	+	+
Fermentation analysis		
Catalase	+	+
Oxidase	-	-
Urease	-	d
Carbon source utilization		
O-F test (glucose fermentation)	F	F
Gas production from glucose	+	+
Acid production from glucose	+	+
Inositol	-	[-]
Sorbitol	+	+
Arabinose	+	+
Rhamnose	+	+
Mannitol	+	+
Adonitol	-	[-]
Raffinose	-	+
Sucrose	+	+
Lactose	+	+
Test for <i>Enterobacter</i>		
Indole production	-	-
Citrate utilization	+	+
Lysine decarboxylase	-	-
Arginine dehydrolase	+	+
Ornithine decarboxylase	+	+
Phenylalanine deamination	-	-
H <sub>2</sub> S production	-	-
Additional properties		
Gelatinase	-	-
Malonate	+	[+]
ONPG	+	+
Esclin	+	d

“+”: positive, “-”: negative, “[+]”: majority of strains positive (generally more than 89%), “[-]”: majority of strains negative (generally more than 89%), “d”: differ among strains (generally from 11-89% positive).



Fig. 1 Colonies of CJF-002 on Nutrient Agar Plate

はセルロースの誘導体であると考えられる。そのため、物理的な強度も高いことが予想され、MEORにおいて油層内流体の流れが卓越した部分に対しても強固な閉そく効果が期待できる。

### 3.3. CJF-002の増殖と非水溶性ポリマーの生産に及ぼす培養条件の影響

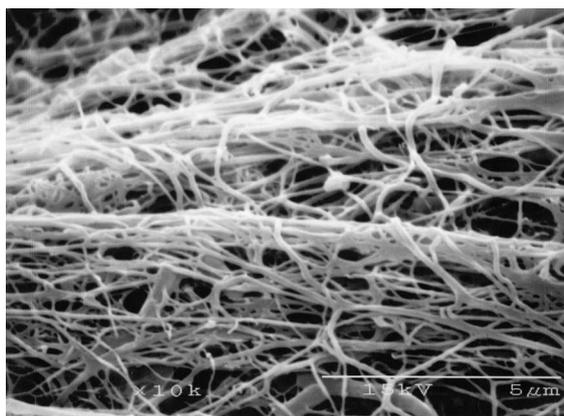
#### 3.3.1. 基本的な培養条件下での増殖ならびに非水溶性ポリマーの生産挙動

まず、基本的な培養条件下におけるCJF-002の増殖ならびに非水溶性ポリマーの生産挙動について検討した。培養実験結果をFig. 3に示す。

CJF-002は、通常の微生物の増殖時に認められる誘導期（初期菌体濃度で推移する期間）が短く、培地に植菌後速やかに対

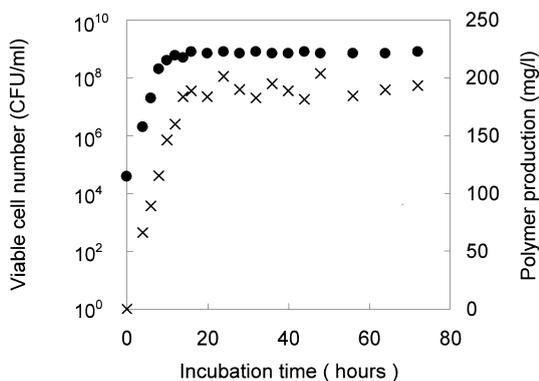


(a)



(b)

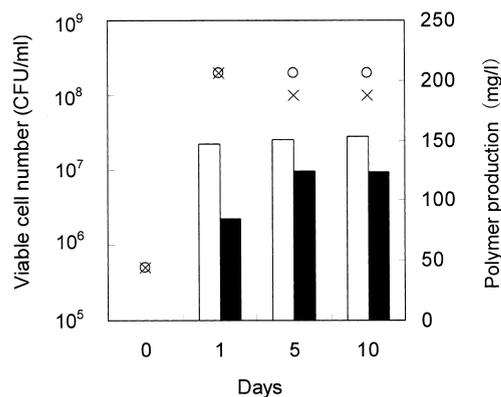
Fig. 2 (a) Polymer Production of C.J.F.-002 with CM4% Medium and (b) SEM Image of the Polymer Produced by C.J.F.-002



●: Viable cell number, ×: Polymer production.

Fig. 3 Growth Curve and Polymer Production of C.J.F.-002 with CM4% Medium at 30°C

数増殖期へと移行する。培養開始から約 8 時間で  $10^8$  cells/ml オーダーに達した後、約 16 時間程度で最大菌体濃度に達し、以降一定の菌体濃度で推移する定常期となる。対数増殖期における C.J.F.-002 の平均倍加時間（細胞が次に分裂するまでの平均時間）は約 40 分であった。これは大腸菌の平均倍加時間（20～



○: Viable cell number (without oil), ×: Viable cell number (with oil), □: Polymer production (without oil), ■: Polymer production (with oil).

Fig. 4 Effect of Oil Addition on Growth and Polymer Production of C.J.F.-002

30 分) に匹敵するもので、C.J.F.-002 が増殖の速い微生物であることを示している。このことは、多種の微生物が共存する油層内で、C.J.F.-002 はより優位に増殖・代謝活動を行う可能性が高いことを示唆している。

一方、ポリマーの生産挙動についてみると、菌体濃度の増加と同様に、培養開始から速やかに増加し、約 16 時間で一定値に収束している。本実験条件下では約 180 mg/l の非水溶性ポリマーが生産された。また、ポリマーの生産挙動から、C.J.F.-002 は増殖する過程で非水溶性ポリマーを生産することも明らかになった。さらに、データには示していないが、室内実験によって、生産された非水溶性ポリマーは少なくとも C.J.F.-002 自身によって分解されることはないことも明らかになっている。

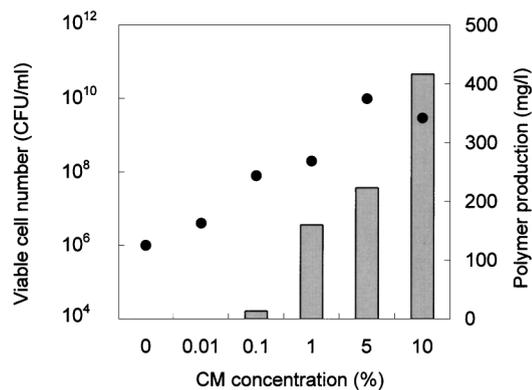
一般に、微生物による代謝活動は対数増殖期（一次代謝）および定常期以降（二次代謝）に行われるが、C.J.F.-002 のように対数増殖期にポリマーが代謝生産されることは、C.J.F.-002 が油層内で優占種にならずとも、必要な非水溶性ポリマーの生産が終了することも考えられ、早期のプロファイル・モディフィケーションを設計する立場からも有利な結果である。

### 3.3.2. 各培養条件の検討

#### (1) 原油の存在の影響

原油の存在下における菌体濃度ならびに非水溶性ポリマー生産量の変化を Fig. 4 に示す。菌体濃度に関しては原油の有無に関わらずほぼ同等であったが、非水溶性ポリマーの生産量については、原油を重層した培地の方が低く、基本的な培養条件下の場合に比して培養 1 日目で約 40% 程度、培養 10 日目で約 20% 程度低い値であった。これは、原油を培地に重層することにより、原油中の揮発性成分が C.J.F.-002 の非水溶性ポリマーの生産性に悪影響を及ぼしたためと考えられる。

以上の結果から考察すると、油層内において、油飽和率が高い領域では非水溶性ポリマーの生産量が減少し、油飽和率が低いほど非水溶性ポリマーの生産量が増加するものと考えられる。本研究では、油層内の水の流れが卓越した領域の開そくを目的としており、このような領域は一般に油飽和率が低いと考



●: Viable cell number, ■: Polymer production.

Fig. 5 Effect of CM Concentration on Growth and Polymer Production of CJF-002 after 24 h of Incubation at 30°C

えられるため、CJF-002の非水溶性ポリマー生産への原油の影響は少ないものと考えられる。さらに、油飽和率の高い領域にはより水を流れ込ませて油の回収を促進するため、この領域における非水溶性ポリマーの生産量は少ない方が好ましい。したがって、本実験結果から油層内の油飽和率の不均一性によって、より選択的なプロファイル・モディフィケーションが生じる可能性が示唆された。

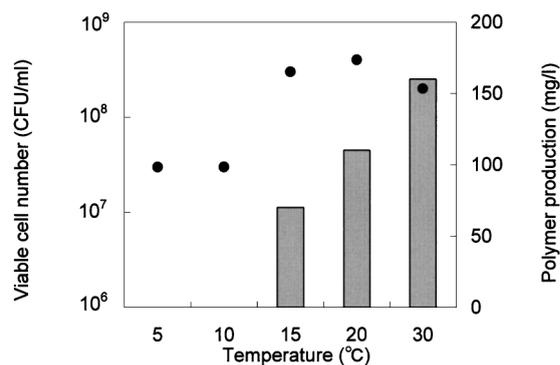
#### (2) モラセス濃度の影響

各モラセス濃度において24時間培養した結果をFig. 5に示す。CJF-002はモラセス濃度が0.1%以上の場合に増殖し、非水溶性ポリマーの生産を行うことが分かった。菌体濃度についてはモラセス濃度が5%以上の場合で特に高い値を示した。また、非水溶性ポリマーの生産量については、モラセス濃度が1%まではモラセス濃度に比例してポリマー生産量も増加する。しかし、モラセス濃度が1%以上ではモラセス濃度と非水溶性ポリマーとの間の比例関係はなくなり、モラセス濃度を10%としても1%の場合の約2.5倍の生産量に止まった。

以上の結果から、CJF-002の増殖性ならびに非水溶性ポリマーの生産性はモラセス濃度により調整可能であることが分かった。特に、油層内における他の微生物との競合を考慮して、モラセス濃度の高い溶液を圧入し、CJF-002の増殖性を高めることが可能であることが示唆された。また、モラセス濃度が1%を超えると、非水溶性ポリマー生産性とモラセス濃度とが比例関係でなくなることから、対象油層における経済性を考慮したモラセス濃度の設定が重要であることが分かった。

#### (3) 培養温度の影響

CJF-002が属する*Enterobacter*属は一般に35°C付近に至適温度を有する中温菌であるが、フィールドテストを予定している扶余油田では、地下埋設パイプラインを利用して圧入井までCJF-002の懸濁液を輸送することを計画していることから、油層内温度のみならず、圧入前の温度環境下における生育も検討の対象になる。すなわち、地下埋設パイプライン内の温度は年間を通じて5~10°C程度であり、このような低温環境下での生育状態も把握しておく必要がある。Fig. 6に示すように、CJF-002は5~30°Cの培養温度において初期菌体濃度よりも高い菌



●: Viable cell number, ■: Polymer production.

Fig. 6 Effect of Temperature on Growth and Polymer Production of CJF-002

Table 5 Effect of pH on Growth and Polymer Production of CJF-002

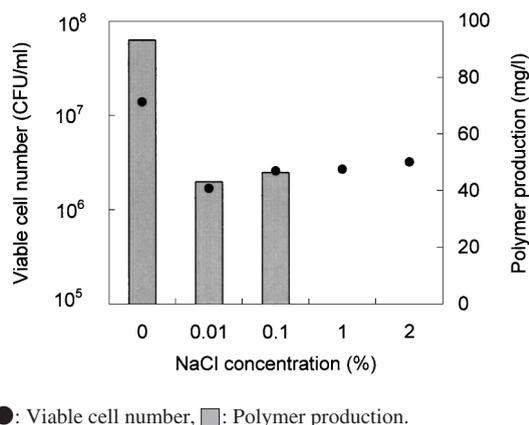
Setting pH	Viable cell number [CFU/ml]	Polymer
3	1.0 × 10 <sup>7</sup>	-
4	1.0 × 10 <sup>7</sup>	-
5	5.0 × 10 <sup>7</sup>	+
5.4	1.0 × 10 <sup>8</sup>	+
6	1.0 × 10 <sup>8</sup>	+
6.64	2.2 × 10 <sup>8</sup>	+
(No regulation)		
8.0	1.4 × 10 <sup>8</sup>	+
9.0	1.3 × 10 <sup>8</sup>	+
9.5	7.4 × 10 <sup>3</sup>	-
10.0	10 <sup>1</sup> >	-
12.0	10 <sup>1</sup> >	-

“+”: polymer present, “-”: no polymer.

体濃度を示したため、この温度範囲において生育が可能であることが示された。しかし、非水溶性ポリマーの生産についてみると、5°Cおよび10°Cではその生産が認められず、30°Cで最も高い生産量が認められた。このことは、当該フィールドにおいて、温度の低い地下埋設パイプライン内や圧入井内では非水溶性ポリマーの生産が抑制され、温度の高い油層内では活発に生産されることを示している。特に、5~10°Cの低温下で非水溶性ポリマーが生産されないという結果は、当該フィールドにおける圧入障害（パイプライン内や圧入井内の閉そく）を避ける点で有利な結果である。

#### (4) 初期 pH の影響

培養液の初期 pH を変化させて48時間培養した場合の菌体濃度ならびに非水溶性ポリマー生産性をTable 5に示す。初期 pH が3.0~9.0の場合、CJF-002は初期菌体濃度よりも高い濃度にまで増殖したが、非水溶性ポリマーの生産は初期 pH が5.0~9.0の間で観察された。特に、初期 pH が5.5~9.0の範囲では目視で概ね一定の非水溶性ポリマーが生産され、CJF-002が非水溶性ポリマーを生産しうる初期 pH の範囲は比較的広範囲であることが分かった。



●: Viable cell number, ■: Polymer production.

Fig. 7 Effect of NaCl with CM0.1% on Growth and Polymer Production of CJF-002 at 30°C

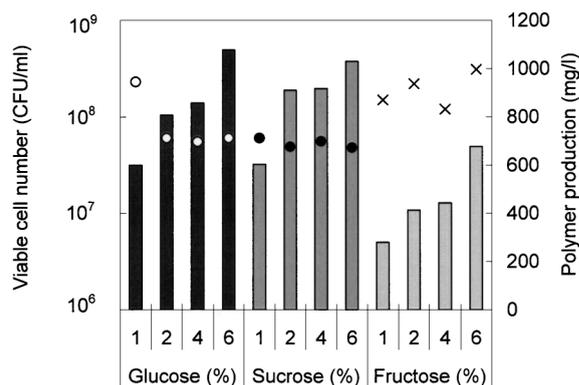
扶余油田の油層水の pH は 7.0 程度であることから、同油田の pH は CJF-002 の増殖ならびに非水溶性ポリマーの生産に影響を及ぼさないものと考えられる。また、多くの油田の油層水 pH は概ね前述した pH 範囲内にあり、CJF-002 を MEOR に利用する際の pH による適用制限は少ないものと考えられる。

#### (5) 塩分濃度の影響

油層水中に含まれる主要無機物として塩分 (NaCl) が CJF-002 の非水溶性ポリマーの生産に及ぼす影響を調べるために、培地中の塩分濃度を変化させて CJF-002 の培養実験を行った。ここで、油層マトリックス内ではモラセスが油層水によって著しく希釈されることを考慮して、実験ではモラセス濃度の低い培地 (CM0.1% 培地) に NaCl を添加した。各塩分濃度で 42 時間培養した後の各培地における非水溶性ポリマーの生産量を Fig. 7 に示す。NaCl 無添加の場合において非水溶性ポリマー生産量が最も多く、NaCl を 0.01% および 0.1% 添加すると、無添加の場合の約半分の生産量に減少した。さらに、NaCl を 1% 以上含む培地では、非水溶性ポリマーの生産が認められなかった。これらの結果および扶余油田の油層水中には約 0.12% の NaCl が含まれていることを考慮すると、扶余油田の NaCl 濃度であれば CJF-002 は非水溶性ポリマーを生産するものと考えられるが、NaCl 濃度が 1% 以上の油層を対象とした場合には適用が困難であることが示唆された。

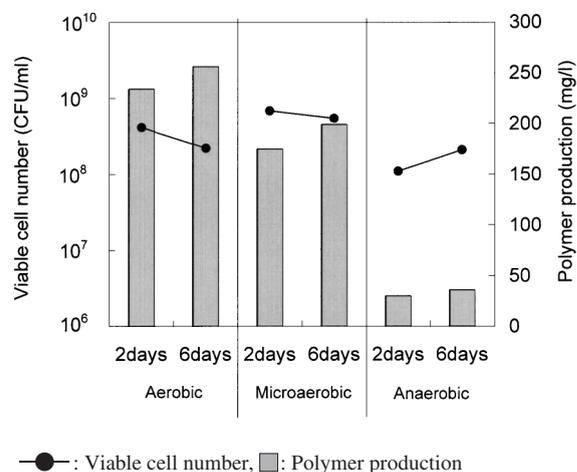
#### (6) 炭素源種の影響

本研究で用いている中国産モラセスの主要炭素源であるスクロースと、そのスクロースを構成している単糖であるグルコースならびにフルクトースの 3 種について検討した。各炭素源を添加した培地で 3 日間培養した後の菌体濃度と非水溶性ポリマーの生産量を Fig. 8 に示す。まず、CJF-002 の増殖についてみると、フルクトースを炭素源とした培地において最も高い菌体濃度を示した。しかし、他の糖を炭素源とした培地における菌体濃度も概ね  $5.0 \times 10^7$  cells/ml 以上に達している。また、非水溶性ポリマーの生産性についても、すべての糖種において生産が認められ、糖濃度が高いほどその生産量も増加する傾向であった。しかし、フルクトースを炭素源とした培地においては、他の糖に比して半分程度のポリマーの生産量に止まった。この



Plot: Viable cell number, Bar: Polymer production.

Fig. 8 Effect of the Sugars on Growth and Polymer Production of CJF-002 at 30°C



●: Viable cell number, ■: Polymer production

Fig. 9 CJF-002 Growth and Polymer Production under Aerobic or Anaerobic Condition at 30°C

ことから、CJF-002 はグルコースを出発物質としてより多くの非水溶性ポリマーを生産できるものと考えられる。さらに、CJF-002 はスクロースからもグルコースと同等以上の量のセルロース誘導体を生成可能である。このことは、CJF-002 を用いる MEOR において、利用可能な栄養源の選択範囲を広げることにつながり、本フィールドテストのように、安価で安定供給が可能なモラセス (スクロースが主成分) の利用を可能としている。

#### (7) 酸素条件の影響

各酸素条件下で 2 日間および 6 日間培養した後の菌体濃度ならびに非水溶性ポリマーの生産量を Fig. 9 に示す。いずれの酸素条件下においても培養 2 日目でも  $10^8$  cells/ml 以上に達しており、増殖に関しては酸素条件の影響は少ないものと考えられる。すなわち、CJF-002 は通性嫌気性の微生物である。一方、非水溶性ポリマーの生産量については、好気条件下で最も多く、培養 6 日目で 256 mg/l であった。微好気条件下では好気条件の場合の 3/4 程度であり、嫌気条件下では 33 mg/l と好気

条件に比して生産量が著しく低下した。

CJF-002は酸素の有無に関わらず良好に増殖することから、フィールドテストにおける地上培養から油層内での培養までのプロセスにおいて、酸素条件に留意する必要がなく、扱いやすい微生物と考えられる。

また、当該フィールドにおいては、油層内に水を圧入する際に圧入水の脱酸素処理を行っていないため、油層内の水中には溶解酸素が存在するものと考えられる。したがって、当該フィールドの油層内は本実験における微好気条件に近い環境にあるものと思われる。本実験の結果、微好気条件下でも、好気条件の場合に匹敵する量の非水溶性ポリマーの生産が認められたことから、油層内においてCJF-002の非水溶性ポリマーの生産が十分に期待できると考えられる。

#### (8) 圧力の影響

当該フィールドの油層内圧力と同様の30 atmで実験を行った。その結果、24時間および72時間(CM1%培地の場合のみ)培養した後のCJF-002の増殖に関しては、CM0.1%培地ならびにCM1%培地ともに良好な結果を示し、圧力の影響は少ないものと考えられる。しかし、非水溶性ポリマーの生産量は常圧下の場合と大きく異なる結果となった。CM1%培地の場合と比較すると、Fig. 3に示したように常圧下では培養開始から約20時間で非水溶性ポリマーの生産が終了し、その量は約180 mg/lであった。これに対して高圧下においては、増殖は24時間で終了するものの、ポリマー生産は24時間以降においても行われており、24時間で39 mg/l、72時間で68 mg/lであった。これらの結果から、高圧下においては、増殖とポリマー生産との関係が変化したと考えられる。すなわち、圧力の増加によってポリマーの生産が遅れ、対数増殖期のみならず定常期においてもポリマー生産が行われるものと考えられる。

また他方で、本実験の結果から、菌体細胞あたりの非水溶性ポリマーの生産量が減少していることも考えられる。しかし、これに関して油層内の状況はバイアル瓶内とは異なっており、総量としては多量のポリマーを生産させることが可能と考えられる。すなわち、フィールドテストでは、油層内に新鮮な栄養源を連続的に圧入し、かつそのモラセス濃度を増加させることも可能である。さらに、CJF-002等の増殖に伴って生産される老廃物による増殖抑制も、油層水による希釈等の作用により低減することも期待できる。

本実験の結果から、当該フィールドの油層圧力下ではCJF-002の非水溶性ポリマーの生産速度が多少低下すると考えられ、実際のフィールドオペレーションでは前述のようにモラセス溶液の圧入濃度を高くする、あるいは圧入期間を長くする等の処置が必要と考えられる。しかし一方で、油層内に圧入されたCJF-002が、圧入井からより離れた場所で非水溶性ポリマーを生産するような制御も新たに期待できることになる。すなわち、圧入井近傍の閉そくによる圧入障害を避けると同時に、より選択的なプロファイル・モディフィケーションが可能となることが示唆された。

#### (9) 初期菌体濃度の影響

各初期菌体濃度で24時間培養した後の菌体濃度については初期菌体濃度が高いほど高くなり、非水溶性ポリマーの生産量は初期菌体濃度が低いほど多くなった。特に、初期菌体濃度

$1.0 \times 10^3$  cells/mlの場合において、初期菌体濃度  $1.0 \times 10^8$  cells/mlの場合の約1.8倍の非水溶性ポリマー生産量を示した。前述したように、CJF-002は増殖する過程で非水溶性ポリマーを生産するため、初期菌体濃度が低い方が定常期に達するまでの時間が長く、ポリマー生産量が増加したものと考えられる。

また、各実験条件下で生産された非水溶性ポリマーを観察すると、初期菌体濃度が  $1.0 \times 10^6$  cells/ml および  $1.0 \times 10^8$  cells/ml の場合は、これまでの実験でも見られたような、多量の水分を包含したゼリー状の非水溶性ポリマーであった。しかし、 $1.0 \times 10^3$  cells/ml の場合はこれとは異なり、直径1~3 mmの粒状および短繊維状の非水溶性ポリマーが培地中に分散しているという状態であった。この理由については明らかでないが、初期菌体濃度が高い場合は菌体間の距離が近いこと、個々の菌体から産出された非水溶性ポリマーが絡み合っただけで前述したゼリー状の非水溶性ポリマーを形成したものと考えられる。一方、初期菌体濃度が低い場合は、菌体間の距離が離れているため、各菌体間での非水溶性ポリマーの絡まりは生じず、一つの菌体細胞から産出された非水溶性ポリマーが菌体の自走やブラウン運動などにより自身の菌体細胞に絡まり、粒状になったものと推察した。

このように、初期菌体濃度によって生産される非水溶性ポリマーの量と形状が異なるということは、圧入水中の菌体濃度が調整可能な油層の場合において、油層内における多様な場所での閉そくが可能であることを示している。たとえば、初期菌体濃度を高くした場合に観察されるような非水溶性ポリマーは多くの水を保持できるため、フラクチャーのような水の流れが極めて卓越した部分の閉そくに有効であると考えられる。また、初期菌体濃度が低い場合に観察された粒状の非水溶性ポリマーは油層内で流動しやすい形状と考えられ、たい積環境による浸透率の異方性の改善などに有効であると考えられる。

## 4. ま と め

本報では、非水溶性ポリマー生産微生物であるCJF-002をMEORに適用する際に必要な基礎データの取得を目的として、その微生物学的特徴、CJF-002が生産する非水溶性ポリマーの化学的特徴、ならびに基本的な培養諸条件がCJF-002の増殖ならびに非水溶性ポリマーの生産に及ぼす影響を明らかにした。その結果をまとめると、以下のようである。

- (1) CJF-002は長径1.5~3.0  $\mu\text{m}$ 、短径0.5~1.0  $\mu\text{m}$ の桿菌であること、グラム陰性であること、運動性を有しているなどの特徴を有する微生物である。
- (2) CJF-002が生産する非水溶性ポリマーは、グルコースが $\beta$ -1,4結合したセルロース誘導体であると推測され、極めて高い水分保持能力を有していることから、油層内の高浸透率部の閉そくに有効である。
- (3) CJF-002は増殖速度の高い微生物であり、増殖する過程で非水溶性ポリマーを生産する。このことから、油層内における他の微生物との競合条件下においてCJF-002が優占種となる可能性が高いこと、ならびに早期のプロファイル・モディフィケーションが可能であることが考えられる。
- (4) 原油の存在によりCJF-002による非水溶性ポリマーの生産量が低下する。このことは、油飽和率が不均一な油層内におい

て、より選択的なプロファイル・モディフィケーションを生じさせるのに有効である。

(5) モラセス濃度によって CJF-002 の増殖性ならびに非水溶性ポリマーの生産性を調整可能である。したがって、対象油層における経済性を考慮したモラセス濃度の設定が重要である。

(6) CJF-002 を MEOR に適用する場合、適用油層温度は 30℃ 程度が好ましい。また、5℃ においても生存が認められたため、当該フィールドにおける地上培養から油層への圧入に至るまでのプロセスにおける温度変化に対しても適用可能である。

(7) CJF-002 の非水溶性ポリマー生産に好ましい初期 pH 範囲は 5.5~9.0 であり、生存可能な初期 pH 範囲は 3.0~9.5 であった。非水溶性ポリマーを生産する初期 pH 範囲が広いいため、多くの油層に対して適応可能である。

(8) CJF-002 は NaCl 濃度が 0.1% までは増殖して非水溶性ポリマーを生産する。ただし、1.0% 以上になると増殖しないため、CJF-002 の適用にあたって油層の塩分濃度は重要である。

(9) CJF-002 はグルコースならびにスクロースを出発物質とした代謝経路において多くの非水溶性ポリマーを生産する。したがって、CJF-002 を用いる MEOR においては、これらの糖を主成分とする栄養源を選択することが好ましい。

(10) CJF-002 は酸素の有無に関わらず良好に増殖する通性嫌気性微生物であるため、MEOR の一連のプロセスにおいて酸素条件に留意することなく、扱いやすい微生物である。また、当該フィールドのように、微好気に近い油層環境下では、多量の非水溶性ポリマーの生産が期待できる。

(11) 当該フィールドの油層圧力下では、CJF-002 による非水溶性ポリマーの生産が遅くなる。このことから、圧入井よりも離れた場所での非水溶性ポリマーの生産が予想され、より選択的なプロファイル・モディフィケーションが可能である。

(12) 初期菌体濃度が低い場合と高い場合で生産される非水溶性ポリマーの形状が異なる。油層内の状況に応じた効率良いプロファイル・モディフィケーションを生じさせるために、初期

菌体濃度を使い分ける方法も一つの可能性としてあり得る。

## 謝 辞

本論文をまとめるにあたり貴重なデータの公表を許可していただいた石油公団（現 独立行政法人石油天然ガス・金属鉱物資源機構）および中国石油天然気股份有限公司吉林油田分公司の皆様に深く感謝申し上げます。

## References

- 1) Yonebayashi, H., Ono, K., Enomoto, H., Chida, T., Hong, C. X., Fujiwara, K., *Society of Petroleum Engineers (SPE)*, Paper No. 38070 (1997).
- 2) Ono, K., Maezumi, S., Sarma, H. K., Enomoto, H., Hong, C. X., Chao, Z. S., *Society of Petroleum Engineers (SPE)*, Paper No. 54328 (1999).
- 3) Nagase, K., Zhang, S. T., Asami, H., Yazawa, N., Fujiwara, K., Enomoto, H., Hong, C. X., *J. Japanese. Assoc. Petrol. Technol.*, **68**, (4), 271 (2003).
- 4) Jenneman, G. E., Moffitt, P. D., Young, G. R., *Society of Petroleum Engineers (SPE) Production & Facilities*, February, 11 (1996).
- 5) Fujiwara, K., Tanaka, S., Otsuka, M., Nakaya, K., Maezumi, S., Yazawa, N., Hong, C. X., Chida, T., Enomoto, H., *Sekiyu Gakkaishi (J. Jpn. Petrol. Inst.)*, **43**, (4), 274 (2000).
- 6) Lee, O. H., Bae, H. J., Hejl, K., *Society of Petroleum Engineers (SPE)*, Paper No. 49074 (1998).
- 7) Fujiwara, K., Tanaka, S., Otsuka, M., Ichimura, N., Yonebayashi, H., Hong, C. X., Enomoto, H., *Sekiyu Gakkaishi (J. Jpn. Petrol. Inst.)*, **42**, (5), 342 (1999).
- 8) Lamballerie, X., Zandotti, C., Vignoli, C., Bollet, C., Micco, P., *Res. Microbiol.*, **143**, (8), 785 (1992).
- 9) "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology," Vol. 2, Williams & Wilkins, Baltimore (1986).
- 10) "Molecular Cloning: A Laboratory Manual," 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Pr, New York (1989).
- 11) Altschul, F. S., Gish, W., Miller, W., Meyers, W. E., Lipman, J. D., *J. Mol. Biol.*, **215**, 403 (1990).
- 12) Shimada, A., *Viva Origino*, **23**, (1), 52 (1995).

## 要 旨

## MEOR に有用な非水溶性ポリマー生産微生物 CJF-002 の特性

大塚牧子<sup>†1)</sup>, 藤原和弘<sup>†2)</sup>, 菅井裕一<sup>†3)</sup>, 木下 睦<sup>†4)</sup>, 榎本兵治<sup>†4)</sup>,  
千田 信<sup>†4)</sup>, 矢澤仁徳<sup>†5)</sup>, 永瀬圭司<sup>†5)</sup>, 洪 承燮<sup>†6)</sup>, 崔 吉<sup>†6)</sup>

<sup>†1)</sup> (株)KRI, 600-8813 京都市下京区中堂寺南町 134 京都リサーチパーク

<sup>†2)</sup> 中外テクノス(株), 733-0013 広島市西区横川新町 9-12

<sup>†3)</sup> 秋田大学ベンチャー・ビジネス・ラボラトリー, 010-8502 秋田市手形学園 1 番 1 号 VBL 棟 1 階

<sup>†4)</sup> 東北大学大学院環境科学研究科, 980-8579 仙台市青葉区荒巻字青葉 01

<sup>†5)</sup> 石油公団 石油開発技術センター, 261-0025 千葉県美浜区浜田 1-2-2

<sup>†6)</sup> 中国石油天然气股份有限公司吉林油田分公司, 138001 中国吉林省松原市守江区

中国吉林省扶余油田において実施された MEOR フィールドテストでは, 非水溶性ポリマー生産微生物である *Enterobacter* sp. CJF-002 が用いられ, オイルカットを試験前の 2 倍以上にまで回復させるなど, 極めて高い石油増進回収効果をもたらした。本研究では, この CJF-002 の基礎的な特性について検討した。

CJF-002 は, 油層内より単離された通性嫌気性微生物であることから, MEOR (microbial enhanced oil recovery) に利用しやすい微生物である。この微生物を中国産モラセスを基質として培養すると非水溶性ポリマーを生産し, そのポリマーは自重の

約 200 倍もの水を保持する能力を有し, グルコースを主構成糖としたセルロース誘導体であった。

また, 基本的な培養条件 (モラセス濃度, 温度, 初期 pH, 塩分濃度, 炭素源種, 酸素, 圧力, 初期菌体濃度) について, CJF-002 の増殖と非水溶性ポリマーの生産に及ぼす影響を検討した結果, MEOR フィールドテストで想定されるプロセスにおいては十分に増殖して非水溶性ポリマーの生産を行うことが示唆された。また, 塩分濃度を除けば, 幅広い油層への適応性も示された。