

技術論文

# 統計手法を用いた微生物腐食にかかわる重要微生物同定の試み

## Statistical Approaches for Identifying Key Microorganisms Associated with Microbiologically Influenced Corrosion

福島 寿和\* 塚本 真里奈  
Toshikazu FUKUSHIMA Marina TSUKAMOTO

### 抄 録

本報告では、これまでに開発した重要因子同定手法である Lasso + Bootstrap 法を活用し、微生物腐食にかかわる重要微生物およびその機能の同定を試みた。その結果、早期腐食の指標となり得る自然電位の変化に関与する重要微生物および機能を同定することができた。検出された数千種の微生物種および遺伝子機能を数種まで絞り込むことが可能であり、統計学的ならびに微生物学的考察の両面から、結果の妥当性が支持された。今後、さまざまな試験条件やデータに対して Lasso + Bootstrap 法を適用することで、微生物腐食にかかわる微生物および機能の全体像がより明確になるとともに、得られた知見が微生物腐食の診断技術や対策提案へと発展していくことが期待される。

### Abstract

In this study, our previously developed important factor identification method, the “Lasso + Bootstrap method,” was applied to identify key microorganisms and their functions involved in microbiologically influenced corrosion. As a result, important microorganisms and functions associated with changes in open-circuit potential, which can serve as an indicator of early-stage corrosion, were successfully identified. Although several thousand microbial species and gene functions were detected, they were reduced to a small number of key factors using the proposed method. The validity of the results was supported from both statistical and microbiological perspectives. In further studies, the Lasso + Bootstrap method will be applied to a wider range of experimental conditions and datasets. This is expected to provide a more comprehensive understanding of microorganisms and functions involved in microbiologically influenced corrosion. The resulting insights are anticipated to contribute to the development of diagnostic techniques and mitigation strategies for microbiologically influenced corrosion.

## 1. 緒 言

金属材料の腐食・劣化は外観の問題だけでなく機能の損失にもつながり、腐食にかかわる経済的なコストは、日本国内だけでも年間 6 兆円と試算されている<sup>1)</sup>。金属腐食は、酸素や酸などの化学的要因によって進行することが広く知られているが、これらに加えて微生物の関与によって腐食反応が著しく加速される場合があることも報告されている。この微生物が関与する金属腐食の影響については、すでに 100 年以上前から指摘されており<sup>2)</sup>、金属設備における年間腐食損失・コストの約 20% に微生物が関与している可能性があるとも考えられている<sup>3)</sup>。

このように、微生物による金属腐食（以下、微生物腐食：

Microbiologically Influenced Corrosion, MIC) の存在自体は広く認識されている一方で、その原因となる微生物の特定や、微生物が関与する腐食反応メカニズムの詳細については未解明な点が多く、研究はまだまだ途上段階にある。そのため、現場で適用可能な診断技術や評価手法は十分に確立されていないのが現状である。さらに、一度腐食が進行した材料は元の健全な状態に回復することがなく、構造材料としての機能を確保するためには母材交換などの大規模な対策が必要となる。このことから、微生物腐食が顕在化する前段階での予防的な管理・マネジメントの重要性は極めて高い。

近年、微生物培養技術および遺伝子解析技術の著しい進展により、微生物活動と金属腐食との関係性が、従来よ

\* 先端技術研究所 環境基盤研究部 上席主幹研究員 博士(環境学) 千葉県富津市新富 20-1 〒293-8511

りも高い解像度で、遺伝子レベルから明らかにされつつある<sup>4)</sup>。例えば、淡水環境下においてステンレス鋼に異常に高い速度(約8mm/y)で進行する孔食現象が観測され、その腐食部位に電気化学活性を有する微生物が有意に集積していることが明らかにされている。この知見に基づき、微生物が関与する電気化学反応を考慮した腐食モデルが提唱されている<sup>5)</sup>。また、微生物を個々の種としてではなく、集団(微生物群集)として捉えて解析するアプローチにより、長年ブラックボックスとされてきた微生物腐食の進行過程における微生物群集構造の変化を捉えることにも成功している<sup>6)</sup>。このように、微生物培養技術と遺伝子解析技術を融合した研究が進展し、微生物腐食に関与する微生物に関する情報が体系的に蓄積されれば、実用的な診断技術の開発につながり、微生物腐食という課題の解決に一步近づくことが期待される。

日本製鉄(株)ではこれまでに、膨大な種類の微生物が混在する排水処理プロセスを対象として、運転データおよび微生物データの解析を通じ、水処理性能に本質的に寄与する重要微生物を客観的に同定する新規統計手法の開発に取り組んできた。この研究は、産学連携の枠組みのもと、微生物学と数理・統計学の学融合により推進されてきたものである。生物学的排水処理法の代表例である活性汚泥法(activated sludge process)は、都市下水から工場排水に至るまで幅広く利用されており、鉄鋼業においても、コークス製造工程でコークス炉から発生する、通称“安水”と呼ばれる排水の処理に適用されている。この処理プロセス内には多様な微生物群が存在しており、遺伝子解析技術である次世代シーケンス技術の導入によって、微生物群集の遺伝子情報を網羅的に取得・解析することが可能となった。その結果、数千から一万種規模の微生物が混在していることが明らかとなったが、このような極めて複雑かつ多様な情報の中から、水処理性能に実質的な影響を及ぼす重要微生物を同定することは、従来手法では困難であった。

これに対し、Lasso+Bootstrap法<sup>7,8)</sup>を開発・適用することで、コークス炉排水中に含まれるフェノールやチオシアンなどの汚濁物質の分解に関与する重要微生物を特定することに成功し、これらの微生物を指標とした水処理高度化に向けた研究開発が進展している。本手法は、多数の説明変数が存在する複雑系データから、本質的な寄与因子を抽出可能であることから、腐食現象においても、腐食に深く関与する重要微生物を効率的に同定できる可能性を有している。

そこで本報告では、Lasso+Bootstrap法を微生物腐食分野へ適用し、微生物腐食に関与する重要微生物同定の可能性について検討した。自然土壤中に存在する微生物を起源とした培養系を用いて、長期間にわたる腐食再現試験を実施し、自然電位を腐食挙動の指標としてモニタリングするとともに、試験期間中における微生物群集の変化を遺伝子

解析により把握した。得られた微生物群集データと腐食挙動との関係を、Lasso+Bootstrap法により解析することで、腐食に寄与する重要微生物の同定を試みた。

## 2. 本 論

本研究<sup>9)</sup>では、自然土壌より回収した微生物を用いることで、自然環境に近い多様な微生物群集を含む試験系を構築し、ステンレス鋼を対象とした腐食試験を長期間にわたり実施した。一般に、金属材料の腐食評価には、試験片表面の外観観察や腐食に伴う鉄の溶出量測定などが用いられている。しかしながら、これらの手法は測定時点ごとの評価が中心であり、腐食挙動の経時的な変化を連続的に把握することは必ずしも容易ではない。そこで本検討では、腐食との関連性がこれまでに報告されており、時間変化を比較的容易に評価できる指標である自然電位に着目した。自然電位は腐食傾向を反映する電気化学的パラメータ<sup>10-12)</sup>であり、腐食挙動を早期に把握できる可能性があることから、本研究では試験期間を通じて継続的に測定を行った。

次に、微生物腐食にかかわる重要微生物を同定することを目的として、試験期間中に採取した試料液を用い、16S rRNA 遺伝子領域に基づく遺伝子解析<sup>13)</sup>を実施し、微生物群集構造を把握した。また、得られた微生物群集データを活用し、各微生物が有する代謝機能や生理機能を推定するため、既存の機能予測ツールを用いて機能遺伝子の推定を行った。これにより、微生物群集の構成情報に加え、各微生物が担う可能性のある機能情報を取得した。

以上の微生物群集データおよび予測された機能情報を基に、これらを説明変数とし、腐食挙動を表す指標として自然電位を目的変数とした統計解析を実施した。具体的には、前章で述べた開発済みの統計手法“Lasso+Bootstrap法”を適用することで、微生物腐食にかかわる重要微生物および機能の同定を試みた。

### 2.1 実験方法

腐食試験は、自然電位測定試験および腐食再現性試験の2種類の試験系を並行して実施した。自然電位測定試験では自然電位を腐食傾向の指標として継続的にモニタリングを行い、定期的に微生物解析用の試料を採取した。これに加えて、試験片表面における腐食状態を直接観察することを目的として腐食再現性試験を実施した。いずれの試験系においても、自然の土壌より回収した微生物液1に対し、表1に示す培地成分を体積比3で混合し、同一組成の試験溶液を用いた。

試験片にはSUS304ステンレス鋼を用いた。自然電位測定試験では、20mm×20mmの板材を切り出し、試験片にリード線をハンダ付けした後、エポキシ樹脂を用いて溶接部を被覆した。一方、腐食再現性試験では、同材質の35mm×35mmの試験片を用いた。

自然電位測定試験に用いた装置を図1に示す。試験片を設置した容器内に試験溶液を充填し、自然電位の測定を行った。自然電位測定にはAg/AgClダブルジャンクション参照電極を使用した。ダブルジャンクション電極を採用した理由は、長期間にわたる測定において、内部電解液中のCl<sup>-</sup>が漏出し試験溶液の化学組成に影響を及ぼすことを回避するためである。このため、外管には一般的に用いられる3 M NaCl溶液の代わりに超純水を充填した。なお、電位測定値は試験片ごとに初期電位が異なることから、すべて初期電位との差分を相対値として評価した。

腐食再現性試験では、28および84日間培養した後に試験片を取り出し、付着物質および腐食傾向を観察した。

微生物群集解析に用いる試料は、自然電位測定試験中の0, 3, 5, 7, 14, 35, 60および64日目に、試験液1 mLを採取して解析に供した。採取した試料は遠心分離により微生物画分を回収し、得られた画分からDNAを抽出した。DNA抽出にはISOIL for Beads Beating (ニッポンジーン)を用い、物理的破碎を伴う方法により、土壌由来抽出液中に存在する多様な微生物から効率的にDNAを回収した。

抽出したDNAを鋳型として、16S rRNA遺伝子VI-2領域<sup>13)</sup>を対象としたシーケンス解析を、Ion GeneStudio S5 (Thermo Fisher Scientific)を用いてマニュアルに従って実施した。得られた配列データは、NCBI (National Center for Biotechnology Information) のBLAST (Basic Local Alignment

Search Tool)<sup>14)</sup>を基盤とする分類手法により解析し、微生物群集構造を決定した。さらに、得られた微生物群集解析結果に基づき、PICRUST2<sup>15)</sup>を用いて試料中に存在する遺伝子機能を推定した。

試験開始後、同じ日に取得した自然電位を目的変数、微生物種または遺伝子機能を説明変数として、既報<sup>7)</sup>に従いLasso+Bootstrapによる重要因子同定を実施した。

## 2.2 結果および考察

試験期間中における自然電位の測定結果を図2に示す。自然電位は試験開始直後から上昇傾向を示し、約20日付近で一度定常状態に達した。その後、50日付近で低下が認められ、70日付近以降では低位で安定した。海水や河川水などの水環境中に浸漬されたステンレス鋼の腐食挙動については、①腐食発生過程、②腐食進展過程の二つの段階が存在することが報告されている<sup>12)</sup>。①の段階では、付着した好気性微生物の酸素呼吸に伴い発生する過酸化水素の作用により電位が貴化し、Cl<sup>-</sup>共存下で不動態被膜が破壊され腐食が発生する。続く②の段階では、腐食発生後に電位は急降下し腐食が進展するとされている。本検討において観測された自然電位の変化も、これら既報の挙動と概ね一致しており、試験期間中に腐食が進行していた可能性が示唆された。

腐食の進行状況を目視で確認するため、腐食再現性試験において28および84日目に試験片を取り出し、表面状態の観察を行った。その結果、いずれの試験片においても広範囲に茶色の付着物が認められた(図3)。84日目の試験片について、付着物を剥離して観察したところ、腐食の起点と考えられる表面の黒ずみや、腐食が開始していると考えられる多数の孔状欠陥が確認された(図4)。念のため、自然電位測定に供していた試験片についても、試験終了後88日目に同様の観察を行ったところ、腐食再現性試験と同様の黒ずみおよび孔状欠陥が認められた(図4)。これらの結果から、試験期間中に腐食が発生していたことが目視に

表1 培地成分の組成  
Composition of the culture medium

Macro elements	g/L
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	3.00
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.50
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.50
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0.014
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	44.22
Micro elements	mg/L
Na <sub>2</sub> B <sub>2</sub> O <sub>7</sub> ·10H <sub>2</sub> O	0.10
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	0.05
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	10.00
MnSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	15.97



図1 自然電位測定試験に用いた装置写真

Photograph of the laboratory setup used for the open-circuit potential measurement

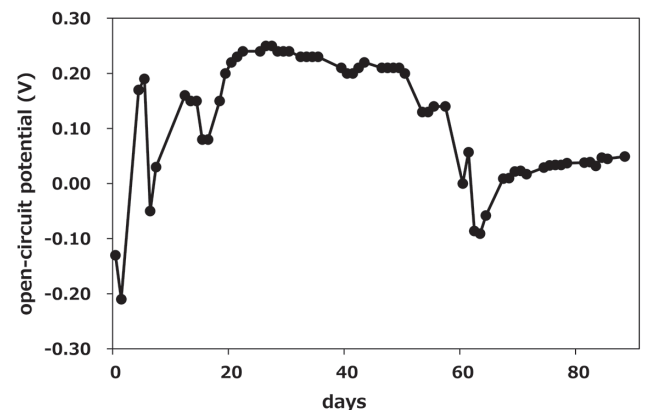


図2 自然電位測定試験の電位変化

Potential variation during the open-circuit potential measurement test

より確認され、自然電位の変化が①腐食発生過程および②腐食進展過程を経て生じていたことが支持された。

次に、腐食に起因すると考えられる自然電位変化が認められた試験系から採取した微生物試料を用いて、微生物群集解析を実施した。図5に、0, 3, 5, 7, 14, 35, 60および64日目に採取した試験液の微生物群集解析結果を示す。試験の進行に伴い、微生物群集構造には大きな変化が認められ、試験期間中に群集組成が動的に変遷していることが明らかとなった。

さらに、得られた微生物群集解析結果を基に PICRUST2 を用いて遺伝子機能の推定を行ったところ、合計 9374 種の遺伝子機能が推定された。

上述の微生物群集データまたは推定された遺伝子機能を説明変数、自然電位を目的変数として、Lasso+Bootstrap

法による自然電位変化に関与する重要因子の同定を試みた。微生物群集を説明変数とした解析では、3日目から64日目までのデータを対象としたが、自然電位が外れ値となる可能性が考えられた5日目のデータは除外した。その結果、3393種の微生物の中から2種が重要微生物として同定され、交差検証法による決定係数は0.986と非常に高い値を示し、高精度な回帰モデルが得られた(図6)。同定された2種は、*Solidesulfovibrio magneticus* および *Acidibacter ferrireducens* に近縁な種であった。*Solidesulfovibrio magneticus* に近縁な種は14および35日目に検出され、35日目で最大値を示したが60および64日目は検出されなかった。一方の *Acidibacter ferrireducens* に近縁な種は試験期間を通じて検出されたが、後期に増加し64日目に最大となった。

*Solidesulfovibrio magneticus*<sup>16)</sup> と微生物腐食との直接的な関係はこれまでに報告されていないものの、本微生物は硫酸還元能を有しており、属する *Solidesulfovibrio* 属は硫酸塩還元菌として、微生物腐食の代表的な原因微生物群であることが知られている<sup>17)</sup>。このことから、本試験系におい

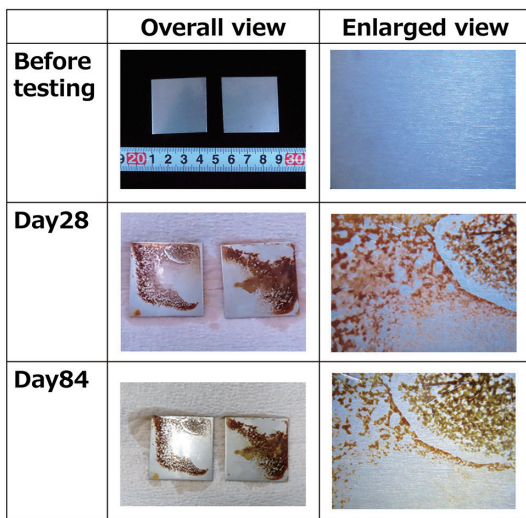


図3 腐食再現試験における試験片の観察結果  
Observation results of stainless steel specimens in the corrosion reproducibility test

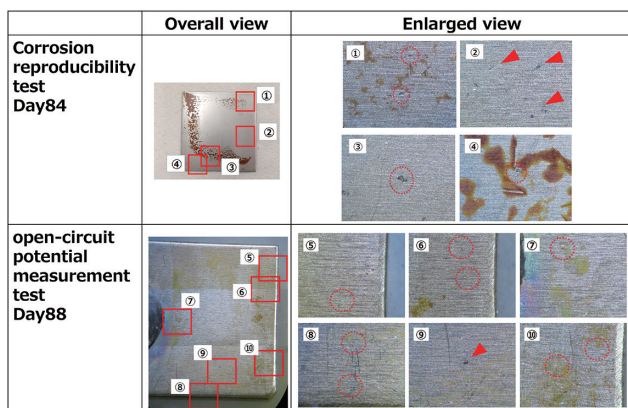


図4 腐食再現試験および自然電位測定試験における付着物および被膜剥離後の試験片の観察結果  
Observation results of stainless steel specimens with surface deposits and after film removal in the corrosion reproducibility test and the open-circuit potential measurement test  
In the figure, the red arrows indicate black discoloration, and the red circles indicate pits.

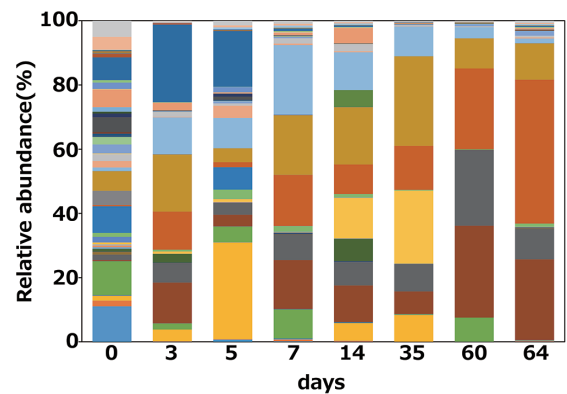


図5 自然電位測定試験における微生物群集の変化  
Microbial community dynamics during the open-circuit potential measurement test  
The relative abundance is shown at the order level.

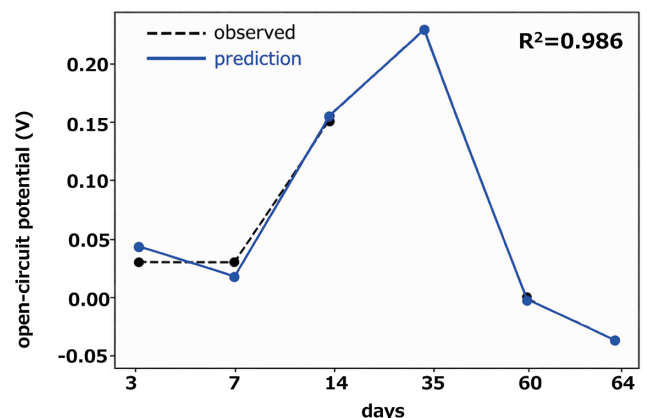


図6 Lasso + Bootstrap 法により同定された重要微生物種を用いた線形回帰モデルによる交差検証法の結果  
Results of cross-validation using a linear regression model based on key microbial species identified by the Lasso + Bootstrap method

でも、電子の供給源あるいは消費源として、腐食反応の初期段階に寄与した可能性が考えられる。一方、*Acidibacter ferrireducens* および当該微生物が属する *Acidibacter* 属については、これまで微生物腐食との関連を示唆する報告はなされていない。しかしながら、*Acidibacter ferrireducens* は酸性環境を好み、かつ鉄(III)還元能を有することが報告されている<sup>18)</sup>。試験後期に増加したため、腐食反応の進行に伴って溶出した鉄イオンを代謝の一環として利用した可能性が考えられる。このように詳細なメカニズムは不明であるものの、微生物腐食と何らかの形で関与する未知の微生物である可能性が示唆された。

遺伝子機能を説明変数とした解析では、0日目から64日目までのデータを対象としたが、微生物群集解析と同様に5日目のデータを除外し、さらに3日目のデータも除外することで、最も高い決定係数が得られた(図7)。その結果、9374種の遺伝子機能のうち4種が重要因子として選択された。

重要因子として同定された4種のうち1種は、微生物が鉄を効率的に捕捉するために生産・放出する代謝産物であるシデロフォア<sup>19)</sup>に関連する遺伝子であった。この遺伝子は、解析対象とする試料採取日を変更して解析した場合においても一貫して重要因子として同定されており、自然電位との関連性が示唆された。さらに、鉄輸送に関与する遺伝子も重要因子として同定された。これらの結果から、遺伝子機能を説明変数とした解析においても、腐食との関連が示唆される結果が得られた。

以上より、自然電位の変化を微生物腐食の指標とした自然電位測定試験により、腐食傾向を比較的早期に評価できる可能性が示された。また、試験期間中に取得した微生物群集データおよびそこから推定された遺伝子機能を説明変数とし、Lasso+Bootstrap法を適用することで、腐食に関与する重要微生物種および機能を同定することに成功し

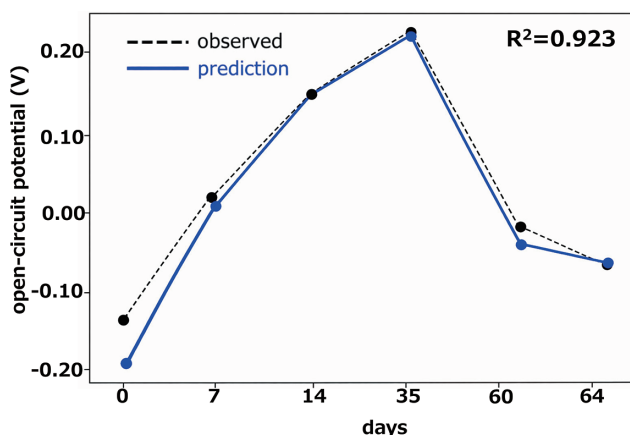


図7 Lasso + Bootstrap法により同定された重要微生物種を用いた線形回帰モデルによる交差検証法の結果  
Results of cross-validation using a linear regression model based on key gene functions identified by the Lasso + Bootstrap method

た。交差検証法による決定係数は高く、統計学的にも高精度な解析結果が得られたと考えられる。さらに、生物学的観点からも、同定された微生物および機能の一部は微生物腐食との関連が報告されており、結果の妥当性が支持された。一方で、腐食との関係がこれまで明らかにされていない微生物や機能も同定されており、新たな腐食関連微生物や腐食メカニズムに関与する機能の存在が示唆された。ただし、Lasso+Bootstrap法を微生物腐食分野に適用した事例は本研究を含めても限られているため、今後は解析事例を蓄積し、その有効性をさらに検証していく必要がある。

### 3. 結 言

本研究では、製鉄所排水処理プロセスを対象として開発した重要因子同定手法であるLasso+Bootstrap法を活用し、微生物腐食にかかわる重要微生物およびその機能の同定を試みた。自然環境由来の微生物を用いた試験系において、SUS304ステンレス鋼の腐食挙動を自然電位により評価するとともに、微生物群集構造および遺伝子機能の変動との関係性について解析を行った。

その結果、早期腐食の指標となり得る自然電位の変化にかかわる重要微生物およびその機能を同定することができた。微生物種および遺伝子機能はいずれも数千種が検出されたが、本手法により数種まで絞り込むことが可能であり、交差検証による決定係数も高い値を示したことから、統計学的に妥当な解析結果であったと考えられる。また、同定された重要因子の一部については、既報の文献において微生物腐食との関係性が示唆されており、微生物学的観点からも結果の妥当性が支持された。一方で、これまで報告のない未知の腐食関連微生物や機能が同定された可能性も示されており、今後の詳細な検証により、それらの関係性を明らかにしていく必要がある。

以上より、Lasso+Bootstrap法は水処理分野にとどまらず、微生物腐食分野にも適用可能であることを本報告により示すことができた。今後、さまざまな試験条件やデータに対して本手法を適用することで、微生物腐食にかかわる微生物および機能の全体像がより明確になるとともに、得られた知見が微生物腐食の診断技術や対策提案へと発展していくことが期待される。

### 参考文献

- 1) 腐食コスト調査委員会：材料と環境. 69(11), 283(2020)
- 2) Gaines, R.H.: Industrial & Engineering Chemistry. 2, 128(1910)
- 3) Heitz, E. et al.: Microbially influenced corrosion of materials. 1st ed. Heidelberg, Springer-Verlag Berlin, 1996, p. 1
- 4) 若井暁：配管技術. 65(4), 6(2023)
- 5) Wakai, S. et al.: Frontiers in Microbiology. 13, 982047(2022)
- 6) Wakai, S. et al.: Npj Materials Degradation. 6(1), 45(2022)
- 7) 福島寿和 ほか：日本製鉄技報. (417), 86(2021)

- 8) 日本特許出願公告 7299485. 2023 年 6 月 28 日
- 9) 日本特許出願公告 7853619. 2026 年 4 月 30 日
- 10) 天谷尚 ほか：材料と環境. 44 (2), 94 (1995)
- 11) 伊藤公夫：環境バイオテクノロジー学会誌. 18 (1), 57 (2018)
- 12) 伊藤公夫 ほか：材料と環境. 70 (4), 126 (2021)
- 13) Fukuda, K. et al: Journal of UOEH. 38 (3), 223 (2016)
- 14) Altschul, S.F. et al.: Nucleic acids research. 25 (17), 3389 (1997)
- 15) Douglas, G. M. et al.: Nature biotechnology. 38 (6), 685 (2020)
- 16) Sakaguchi, T. et al.: International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 52 (1), 215 (2002)
- 17) De Romero, M. et al.: Corrosion. 61 (1), 68 (2005)
- 18) Falagán, C. et al.: Extremophiles. 18 (6), 1067 (2014)
- 19) Neilands, J.B.: Journal of Biological Chemistry. 270 (45), 26723 (1995)



福島寿和 Toshikazu FUKUSHIMA  
先端技術研究所 環境基盤研究部  
上席主幹研究員 博士(環境学)  
千葉県富津市新富20-1 〒293-8511



塚本真里奈 Marina TSUKAMOTO  
日鉄テクノロジー(株)  
瀬戸内事業所 材料技術部  
材料分析・解析課