

連携記事

嫌気性微生物による鉄腐食 Iron Corrosion by Anaerobic Micro Organisms

伊藤公夫
Kimio Ito

新日本製鐵(株) 先端技術研究所
環境基盤研究部
主任研究員

1 はじめに

バイオリーチングは銅など有価金属を安価に回収するため、微生物を利用する技術である。微生物は鉄の溶出、つまり鉄の腐食にも密接にかかわっている。残念ながら鉄はバイオリーチングの対象となっていないが、微生物による鉄の腐食は現実的な問題である。微生物が関与する腐食を『微生物腐食 (Microbiologically Influenced Corrosion (MIC))』という¹⁾。本稿では、微生物が関わる鉄の腐食について、その中でも酸素がない環境を好む嫌気性微生物による鉄の腐食に内容を絞って最近の研究についてご紹介したい。

微生物は、呼吸に酸素を必要とする好気性微生物と、酸素を必要としない嫌気性微生物の二種類に分けられる。好気性微生物は空気下で培養できるため、微生物腐食を比較的容易に調べることができる。好気性微生物で鉄の腐食に関与することが知られている微生物としては、バイオリーチングでも利用されている鉄酸化細菌や、硫酸を発生するイオウ酸化細菌などがある。

これに対して、嫌気性微生物の培養は、酸素のない条件で培養する必要があるため容易ではない。このような理由からか、嫌気性微生物による鉄の腐食についてはあまりよくわかっていない。ただし、硫酸塩還元菌 (*Sulfate Reducing Bacteria*; *SRB*) は、強力な腐食原因物質の硫化水素を発生するため、鉄腐食性の嫌気性微生物としてよく知られている。硫化水素の腐卵臭や、腐食生成物である黒色の硫化鉄が特徴的であるため、硫酸塩還元菌による鉄腐食は非常に認識しやすい。硫酸塩還元菌による鉄腐食は、油井など石油環境で問題になる場合が多い。地中が嫌気環境であること、石油は炭化水素など硫酸塩還元菌の電子供与体となる物質を多く含むこと、石油の二次回収では水攻法により海水(硫酸イオン濃度 2700mg/ℓ程度)が圧入されるため、海水の硫酸イオンが電子受容体として利用できることなどが、硫酸塩還元菌

による鉄の腐食の要因として挙げられる。硫酸塩還元菌は種類も多く、50種類以上の硫酸塩還元菌が既に分類されている。

これに対して、硫酸塩還元菌以外の嫌気性微生物による鉄の腐食については、ほとんどわかっていない。嫌気性微生物は、呼吸様式(電子受容体の種類)により、図1のように分類できるが、硫酸塩還元菌以外の嫌気性微生物は、硫化水素のような強力な腐食原因物質を発生しないため、微生物腐食にはあまり関係しないと従来考えられてきた。

石油関連施設に生息する鉄腐食に関わる嫌気性微生物の調査が、NEDO 事業「微生物を利用した石油の環境安全対策に関する調査」(2005年度～2008年度)において、独立行政法人 製品評価技術基盤機構(NITE)と新日本製鐵株式会社により実施された。鉄腐食に関わる嫌気性微生物を調査対象とした、おそらく初めての調査プロジェクトである。そこで本稿では、このプロジェクトの調査内容の概要を紹介する³⁻⁶⁾。

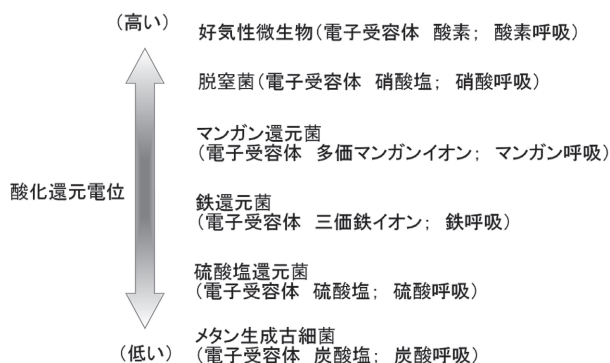


図1 電子受容体の種類による微生物の分類

2 嫌気性微生物の培養と腐食試験

本プロジェクトでは、国内の石油関連施設から採取した、原油、スラッジ、ドレイン水、鉄さびから集積、さらには単離された微生物を用いて、嫌気性環境における鉄腐食性を調べた。この際、鉄を電子供与体として利用できる微生物に注目して調査を行なった。

鉄を電子供与体として利用できる微生物の培養と腐食試験

微生物は、電子供与体となる物質から電子を受け取り、電子受容体となる物質に電子を渡す過程で、生命活動に必要なエネルギーを得ている。通常、嫌気性微生物を培養する際には、水素、有機酸（蟻酸、酢酸、乳酸、プロピオン酸等）、アルコール（メタノール等）などが電子供与体として用いられる。しかし、図2 (1) に示したように、人為的に水素や有機物を電子供与体として与えた場合、鉄の腐食により発生する電子の授受とは全く異なる経路で電子の授受が行なわれてしまう可能性がある。

そこで我々は、鉄を電子供与体として培養できる微生物の集積培養を行なった。鉄を電子供与体とすれば、図2 (2) に示したように、鉄の腐食と関連して微生物を介して電子の授受が行なわれることが期待できる。この場合、カソード反応で発生した水素が微生物の電子供与体となる可能性が最も考えられる。しかし、最近、微生物が鉄から直接電子を受け取れるとする仮説も報告されている²⁾。

微生物への電子供与体として用いる鉄は、微生物を培養する際には比表面積が大きい方がよいので純鉄の顆粒を用い

た。また、腐食試験では、試験片に含まれる金属鉄を微生物への電子供与体を兼ねさせて用いた。微生物に必要な炭素源は、有機物は電子供与体になる可能性があるため用いることができなかった。このため、微生物に必要な炭素は、嫌気性環境にするために用いた N_2 (80%) + CO_2 (20%) 混合ガスに含まれる CO_2 により供給した。集積培養および単離した微生物の同定は、16S rRNA 遺伝子^{*1}の塩基配列を解析することにより行なった。

なお、 N_2 (80%) + CO_2 (20%) 混合ガスは、嫌気性微生物の培養によく使われる混合ガスであり入手が容易である。腐食試験の際の注意点として、高濃度の CO_2 を含むため、炭酸ガス腐食の影響に対する注意が必要である。そこで、腐食試験では必ず微生物を添加したものと、添加しない無菌系を比較して、微生物による腐食影響を明らかにするようにした。

鉄を電子供与体とする嫌気性微生物の培養と腐食試験は、以下のように行なった。

図3 に示したようにガスクロマトグラフ分析用のガラス瓶の中に海水培地²⁾を入れ、 N_2 (80%) + CO_2 (20%) 混合ガスを通気して酸素を除いた。海水培地を用いた理由は、原油に含まれるかん水が海水相当、あるいはそれ以上の塩化物イオンを含む場合があること、海水を地中の原油層に圧入する水攻法では原油に海水が混入する可能性があること、海水や海泥にはさまざまな未知嫌気性微生物が生息していると期待されることなどによる。この中に鉄顆粒あるいは鉄試験片を浸漬し、気相部もこの混合ガスで満たした状態で、ブチルゴム

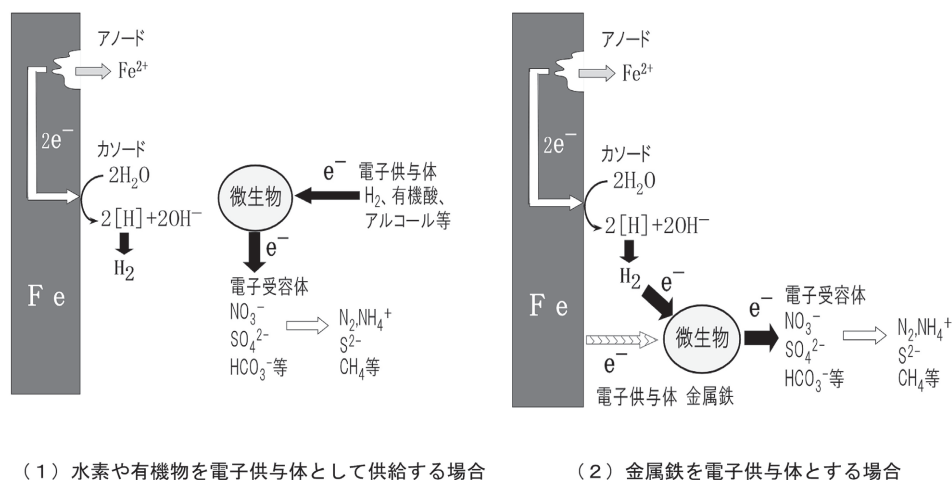


図2 電子供与体と嫌気微生物を介する電子の流れ

*1 16S rRNA 遺伝子 … 16S rRNAは原核生物（真正細菌と古細菌）の細胞内にあるリボソームを構成するRNA（リボ核酸）である。その遺伝子の塩基配列は微生物の固定に用いられている。

栓とアルミキャップで密栓することにより嫌気環境に維持した。

微生物による腐食試験を開始する際には、空気を混入しないように注意しながら、ブチルゴム栓にシリンジの針を貫通させて微生物の培養液を海水培地に接種し、ガラス瓶を軽く振って微生物を懸濁させたのち、25℃から37℃の一定温度に静置することで、鉄を電子供与体とする嫌気性微生物の培養と腐食試験を行なった。腐食試験では、ブチルゴム栓にシリンジ針を貫通させて経時的に海水培地を少量採取して、o-phenanthroline 法^{*2}により、溶出した鉄量を測定することにより、腐食の様子をモニタリングした。

3 調査結果

3.1 鉄腐食性メタン生成古細菌による鉄腐食

上記のように、鉄を電子供与体として利用できる嫌気性微生物に注目して鉄腐食原因となる微生物を探した結果、鉄腐食性メタン生成古細菌 *Methanococcus maripaludis* KA1 株⁷⁾、*Methanococcus maripaludis* OS7 株、*Methanococcus maripaludis* Mic1c10 株がそれぞれ国内の異なる3箇所の石油関連施設から単離された。

メタン生成古細菌が産生するメタンは、硫酸塩還元菌が産生する硫化水素のような鉄腐食の原因物質ではない。それでは何故、メタン生成古細菌が鉄を腐食できるのか。学術的に非常に興味深い課題である。異なる石油関連施設から単離された鉄腐食性メタン生成古細菌は、いずれも *Methanococcus maripaludis* であった。しかし、これらの鉄腐食性メタン生成古細菌と共存している他の多くのメタン生成古細菌には鉄腐食性がなかった。このことから、鉄腐食性の *Methanococcus maripaludis* には鉄腐食原因となる何か特別な機能があるものと考えられる。更に調べてみると同様に *Methanococcus maripaludis* である、*Methanococcus maripaludis* C5 株、*Methanococcus maripaludis* C6

株、*Methanococcus maripaludis* C7 株、*Methanococcus maripaludis* S2 株が微生物腐食とは全く異なる研究で海外研究機関により既に単離されており、国内微生物保存機関より入手可能であることが明らかになった。そこで、これら *Methanococcus maripaludis* C5 株、C6 株、C7 株、S2 株を入手して、培養と腐食試験を行なったところ、これらは鉄を電子供与体とする条件で培養可能であるものの、鉄腐食性メタン生成古細菌である *Methanococcus maripaludis* KA1 株、OS7 株、Mic1c10 株のように鉄を激しく腐食できないことが判明した。

同じメタン生成古細菌の *Methanococcus maripaludis* でありながら、鉄を激しく腐食するものと腐食しないものがある。この違いは、一体何に起因するのか。幸いなことに、鉄腐食性のない *Methanococcus maripaludis* C5 株、C6 株、C7 株、S2 株は、ゲノム解析が完了していた。したがって、本プロジェクトで新たに見つかった鉄腐食性の *Methanococcus maripaludis* のゲノムを解析して比較すれば、鉄腐食性の *Methanococcus maripaludis* に特徴的な遺伝子を明らかにできる可能性がある。

そこで、製品評価技術基盤機構 (NITE) において、*Methanococcus maripaludis* KA1 株、*Methanococcus maripaludis* OS7 株のゲノム解析が実施され、鉄腐食性に関連すると考えられるゲノムの候補遺伝子の解明が進められている^{5,6)}。

3.2 鉄腐食性メタン生成古細菌と

硫酸塩還元菌の共存による鉄腐食促進作用

実際の嫌気性環境では、メタン生成古細菌と硫酸塩還元菌は共存して生息しているものと考えられる。そこで、メタン生成古細菌と硫酸塩還元菌が共存する場合の鉄腐食について調べた。

まず、硫酸塩還元菌単独の場合は、鉄の表層が硫化鉄の黒色の被膜で覆われるものの、腐食は軽微であった。鉄腐食性メタン生成古細菌は単独でも鉄を激しく腐食した。しかし、鉄腐食性メタン生成古細菌と硫酸塩還元菌が共存する場合には、より激しい腐食が起こることが判明した。硫酸塩還元菌が発生する硫化水素が酸化還元電位のより低い、メタン生成古細菌が生息しやすい嫌気性環境を作り出し、メタン生成古細菌と硫酸塩還元菌の共存による微生物腐食を促進している可能性が考えられる。これまで、嫌気性微生物による腐食では、硫酸塩還元菌のみがクローズアップされる傾向であった。しかし今後は、硫酸塩還元菌と共存する鉄腐食性メタン生成古

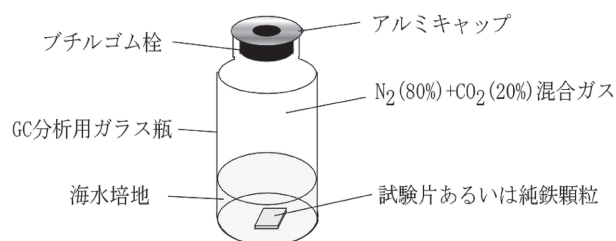


図3 鉄を電子供与体とする微生物の培養と腐食試験

*2 o-phenanthroline 法 … o-phenanthroline が 2 価鉄イオン (Fe^{2+}) をキレートする際発色することを利用した 2 価鉄イオン (Fe^{2+}) の定量方法。

細菌による腐食影響についても十分な注意が必要と考えられる。

3.3 メタン生成古細菌、硫酸塩還元菌以外の鉄腐食性嫌気性微生物

本プロジェクトでは、国内の石油関連施設から採取した、原油、スラッジ、ドレイン水、鉄さびから単離された嫌気微生物について、網羅的に鉄腐食性の有無を腐食試験により調べた。

その結果、前記、鉄腐食性メタン生成古細菌や硫酸塩還元菌の他にも鉄腐食性を示す微生物が見つかった。例えば、*Shewanella* sp. MIC5-4株、*Malonomonas* sp. MIC11-27株、*Sulfurimonas* sp. MIC5-2株は、硝酸塩を添加することにより、また、*Bacteroides* 様細菌 MIC1-1株は、硝酸塩と酵母エキス (0.1%) を添加することにより、鉄を腐食させた。これらの嫌気性微生物は図1で硝酸塩還元菌に分類される嫌気性微生物と考えられる。

油井など、硫酸塩還元菌による腐食が問題にされる場合、硝酸塩を添加して硫酸塩還元菌による腐食を防止することが実際に行なわれている。しかし、硝酸塩を添加することで硝酸塩還元菌による新たな腐食が発生する可能性も考えられることにも注意すべきと考えられる。

3.4 嫌気性微生物検出技術の開発

本プロジェクトでは、従来知られている硫酸塩還元菌以外にも、鉄腐食性のメタン生成古細菌や硝酸塩還元菌の存在が明らかになった。環境中に鉄腐食原因となる微生物が存在するか存在しないかを、迅速に検出することができれば、微生物腐食による被害に対して、何か有効な対策を講ずることも可能になるかもしれない。本プロジェクトでは分子生物学的手法のPCR^{*3}により、前記の鉄腐食性メタン生成古細菌を特異的に検出する技術の開発に成功した^{5,6)}。

3.5 ヨウ素酸化細菌によるステンレス鋼の腐食

好気性微生物ではあるが、ステンレス鋼 (SUS316-L) を腐食させるヨウ素酸化細菌 dMB-MAT3 株も、本プロジェクトで新たに単離された。ヨウ素酸化細菌 dMB-MAT3 株はヨウ素イオン (I⁻) を分子状ヨウ素 (I₂) に酸化することにより、培養液中に浸漬したステンレス鋼の自然電位を貴化させ、ステ

ンレス鋼にすき間腐食や孔食を発生させる可能性があることが明らかになった。

4 今後の展望

バイオリーチングの鉄への適用は今のところ実用化されていない。そこで本稿では微生物による鉄の腐食について、最近の NEDO プロジェクトの調査内容を中心に紹介した。バイオリーチングも微生物腐食も、微生物と金属を対象とする学際領域である。近年、ゲノム解析をはじめとする分子生物学的解析手法の進歩は著しい。微生物分野と金属分野の研究者、技術者が連携、協力して、バイオリーチングと微生物腐食に関する研究開発、技術開発が今後益々活発化していくことを期待したい。

参考文献

- 1) エンジニアのための微生物腐食入門, 丸善, (2003)
- 2) Dinh, H.T., J.Kuever, M.Mußmann, A.W.Hassel, M.Stratmann, and F.Widdel: Iron corrosion by novel anaerobic microorganisms. *Nature*, 427 (2004), 829-832.
- 3) NEDO 平成 17 年度成果報告書 微生物を利用した石油の環境安全対策に関する調査, (2007)
- 4) NEDO 平成 18 年度成果報告書 微生物を利用した石油の環境安全対策に関する調査 石油関連施設微生物腐食対策ならびに石油の国際輸送における海洋汚染対策, (2008)
- 5) NEDO 平成 19 年度～平成 20 年度成果報告書 微生物を利用した石油の環境安全対策に関する調査 石油関連施設微生物腐食対策及び石油の国際輸送における海洋汚染対策 (H17-H20), (2009)
- 6) 第 164 回腐食防食シンポジウム資料 ー微生物腐食の新しい展開と防止技術ー, (2008)
- 7) Uchiyama, T., K.Ito, K.Mori, H.Tsurumaru, and S.Harayama: An Iron-Corroding Methanogen isolated from a crude-oil storage tank. *Applied and Environmental Microbiology*, (2010) (in press).

(2010 年 1 月 29 日受付)

*3 PCR (ポリメラーゼ連鎖反応) …ポリメラーゼという酵素を用いてゲノム DNA など長大な DNA の塩基配列から、特定の領域の DNA 断片を選択的に増幅する方法。