

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2022

課題番号：17K07546

研究課題名(和文)鉄腐食性硝酸塩還元菌の系統分類学的多様性および金属腐食発生機構の解析

研究課題名(英文)Taxonomic study and an iron-corroding mechanism of iron-corroding and nitrate-reducing bacteria

研究代表者

飯野 隆夫 (Iino, Takao)

国立研究開発法人理化学研究所・バイオリソース研究センター・専任研究員

研究者番号：50550323

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：重大な経済損失や環境問題を招く微生物腐食の原因菌を探索する目的で、天然ガス改修施設から新規の細菌11株を培養・純粋分離した。分離株11株を用いて鉄腐食試験を実施した結果、NT050株が硝酸塩を電子受容体として鉄腐食能を引き起こすことが明らかとなった。一方、過去に純粋分離した鉄腐食性の *Prolixibacter denitrificans* に近縁のNT017株を分離したが、本株に硝酸還元能はなく、鉄腐食を引き起こさないことが明らかとなった。以上の結果から、新たな鉄腐食性の細菌を取得すると共に、*Prolixibacter* 属細菌には鉄腐食性と鉄非腐食性の細菌が混在することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高効率エネルギー社会を構築する上で、重大な経済損失や環境問題を招く微生物腐食は、予測困難なため有効な対策技術がなく、問題が深刻化している。長らく、硫酸塩還元菌が微生物腐食の主要な原因菌として捉えられてきたが、その実態は未解明な点が多く、未だ有効な防食方法がない。金属腐食菌の正確な種の特定や自然環境中の微生物生態系の解明なしに、防食対策を講じることは不可能である。金属腐食菌の培養株の充実、微生物腐食を未然に予測する診断技術の開発するための貴重な微生物材料となり、高効率エネルギー社会構築の実現に向け、その意義は高い。

研究成果の概要(英文)：Microbiologically influenced corrosion (MIC) of metallic materials imposes a heavy economic burden. Eleven novel bacterial strains were isolated from brine of a natural gas recovery facility in Japan. Among eleven strains, strain NT050 oxidized the iron (Fe0) foil in the presence of nitrate and yeast extract. On the other hand, strain NT017 was related to nitrate-reducing and iron-oxidizing *Prolixibacter denitrificans* MIC1-1 based on the 16S rRNA gene sequence similarity, while did not oxidized Fe0 foil under any culture condition. In this study, a novel iron-corroding bacterium was obtained by culture-depend technique. Furthermore, *Prolixibacter* contained both Fe0-corroding bacteria and Fe0-non-corroding bacteria.

研究分野：細菌系統分類学

キーワード：微生物腐食 鉄酸化 硝酸還元 天然ガス回収施設 *Mariniphaga* *Prolixibacter*

## 1. 研究開始当初の背景

2007年のG8サミットで、2050年までに温室効果ガスを半減させる目標が合意されたように、地球温暖化は、喫緊に対策が求められる地球規模課題であり、高効率エネルギー社会の構築が不可避である。中でも、石油や天然ガスといったエネルギー資源の貯蔵・供給網はエネルギー事業の最も根幹を成す基盤技術であり、その能力の向上は、問題解決のために必要不可欠である。しかし、これに関わる大きな問題に、金属腐食による設備インフラの損傷問題があり、過去に、腐食損傷による原油など貯蔵物の漏洩事故等は様々なケースで多数確認されている。高価な耐食性ステンレス鋼材を用いた場合にも金属腐食は確認されており、その問題は深刻化している。2002年に発表された金属腐食による米国の年間損害額は2,760億ドルに及び、これは国内総生産(GDP)の3-4%に相当する(<http://www.nace.org/uploadedFiles/Publications/ccsupp.pdf>)。これを日本のGDPに換算すると年間15-20兆円に及び莫大な経済損失である。金属腐食は一般的に化学的要因によるものと考えられがちであるが、微生物が金属腐食を誘起することが明らかになっており、この現象は微生物腐食と呼ばれる。一般的な金属腐食の発生や速度は電気化学の理論から予測できる。これに対し、微生物腐食は、腐食しないはずの環境で理論値よりも著しい速度で発生・進行するため、その予測は困難であり、有効な対策技術が確立されていない。微生物腐食に端を発する資源漏洩の防止や設備維持コストの低減を可能とする技術なしに、エネルギーの安定的な貯蔵・供給に支えられた高効率エネルギー利用社会の構築は不可能である。

微生物腐食という現象は古くから観察されており、19世紀末から20世紀初頭には、嫌気条件下で硫酸塩還元菌(SRB)によると考えられる微生物腐食が観察されている。1934年には von Wolzogen Kühr と van der Vlugt によりカソード復極説が提唱され、以降現在に至るまで、長らく SRB が主要な微生物腐食の原因菌として捉えられてきた。1980年以降、メタン生成アーキア(メタン菌)による微生物腐食も数例報告されたが、これらの微生物が金属鉄を唯一の電子供与体として金属腐食を引き起こすことを証明されたのは2000年代になってのことである。実体解明が遅々として進まない理由として、主に以下の2点が挙げられる; 1)微生物腐食が多様な微生物と金属の相互作用による煩雑な現象である上、対象となる微生物が主に嫌気性もしくは難培養性であり、取り扱いの知識および技術の難易度が高い; 2)微生物学、電気化学、物質材料学など多分野の知識・技術が要求されるため、微生物腐食研究を実施できる研究者は育ち難く、世界的に研究者の数が少ない。結果として、過去の微生物腐食研究は比較的培養の容易な菌種に限定した金属腐食能の解析や、金属腐食能とは無縁の分子生態学的解析に留まっている現状である。

## 2. 研究の目的

提案者らは石油備蓄基地や天然ガス回収施設を中心に、微生物腐食の原因解明を行ってきた。原油タンク底板残留水由来の集積培養物が、汎用鋼材である炭素鋼 SS400 試験片を電気化学的に腐食促進することから、腐食生成物と地鉄間での電池形成モデルを提唱した他(伊藤ら, 2010)、鉄腐食性メタン菌 KA1 株を純粋分離し、ゲノム解析の結果から、腐食性メタン菌のみが有する遺伝子領域を特定し、鉄腐食性メタン菌の特異的検出技術(特許 5629867 号)を開発した。また、培養例の少ないヨウ素酸化細菌、未培養種であった硝酸塩還元細菌(NRB)の純粋分離に成功し、各々、ヨウ素酸化や硝酸還元を介して金属腐食を引き起こすことを明らかにした(図 3; Iino ら, 2015a, 2015b; Wakai ら, 2014)。近年では、防食技術として、原油タンクに硝酸塩を添加することで SRB の増殖を抑制できると報告がされ、本処理が注目されている。しかし、前述の鉄腐食性 NRB が腐食環境に存在した場合、硝酸塩添加はむしろ金属腐食を増長させることになる。鉄腐食性 NRB の発見は、有効な防食対策を講じる上で、金属腐食菌の種や生態を正確に把握する必要があることを警鐘するものとなった。本申請課題では、特に知見の皆無である鉄腐食性 NRB の系統分類学的多様性と腐食発生機構を解明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 原油備蓄基地、天然ガス回収施設からの硝酸塩還元菌(NRB)の純粋分離

石油備蓄基地や天然ガス回収施設から原油や灌水、堆積物を収集した。収集環境が嫌気的環境であるため、固体試料はアネロパック中に保管し、液体試料は気相を嫌気ガス(N<sub>2</sub>)に置換した血清ビンに保管することで微生物の死滅を防いだ。収集した試料から嫌気培養技術を駆使して、NRB を培養・純粋分離する。硝酸塩を電子受容体として、気相を嫌気状態(H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> = 4:1, N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> = 4:1, N<sub>2</sub>)に維持した複数種類の人工海水培地を使用した。供試培地中の電子供与体、炭素源などの組み合わせを変えることで、多様な NRB の培養を目指した。電子供与体には金属鉄(Fe<sup>0</sup>)を主に使用するが、作業が煩雑で効率が悪いいため、2価鉄(Fe<sup>2+</sup>)、水素、硫化物なども使用した。炭素源には酢酸、酵母エキスなどを供試した。微生物の増殖が確認できた培養物を数回継代した後、集積培養と同組成の寒天培地上でコロニー化を行い、集積培養した NRB を純粋分離した。過去に純粋分離した *Prolixibacter denitrificans* MIC1-1 株は分離の難度が高かったことから、5-10 株の微生物株の純粋分離を目標とした。

## (2) 分離株の系統分類学的位置の解析

供試菌株から染色体 DNA を抽出し、抽出した染色体 DNA から 16S rRNA 遺伝子を PCR にて増幅した。PCR 産物を精製した後、DNA シーケンサーを用いて 16S rRNA 遺伝子塩基配列を決定し、BLAST 解析を行うと共に、近隣結合法 (NJ)、最尤法 (ML)、ベイズ法 (BI) を用いて、系統樹を作成した。必要に応じ、DNA-DNA 相同性試験を行った。

## (3) 分離株の鉄腐食能の解析

Uchiyama ら (2010) が用いた金属鉄を含む人工海水培地に、10 mM 硝酸塩、0.05 % (v/w) 酵母エキスを加えた培地を供試培地として用いた。前培養液 1/100 量を試験培地に接種し、25°C で 30 日間培養を行った。対象として、菌株未接種の試験培地を無菌区として同様に培養を行った。培養後の試験液 100 µl を分取し、6 M HCl 50µl を加えた後、1 M アスコルビン酸を 100 µl 添加した。Sandell (1959) の方法に従い、 $\alpha$ -フェナントレン法にて処理後の試験液中の溶出鉄量を定量した。

## (4) 分離株の形態、生理・生化学性状、化学分類学性状の解析

供試菌株の細胞形態、運動性、孢子形成、グラム染色性などを位相差顕微鏡や透過型電子顕微鏡下で観察した。生理・生化学性状として、生育温度、生育 pH、生育塩濃度、電子受容体、電子供与体、糖類発酵性の解析を行った。菌株を各種試験培地で培養した後、分光光度計を用い、660 nm における濁度の増加を測定した。必要に応じ、有機酸分析カラムを装着した高速液体クロマトグラフィー (HPLC) やイオンクロマトグラフィーを用い、基質の減少や代謝産物の生成を分析した。科学分類性状として、イソプレノイドキノタイプ、極性脂質パターン、細胞内脂脂肪酸組成、DNA G+C 含量の解析を行った。

## 4. 研究成果

### (1) 原油備蓄基地、天然ガス回収施設からの硝酸塩還元菌(NRB)の純粋分離

千葉県山武市の天然ガス回収施設にて、深部 605 m に設置された M-26 チューピング (TBG) の内部付着物を収集した。採取した堆積物から微生物の集積培養を行うため、気相を嫌気状態 ( $N_2/CO_2 = 4:1$ ) に維持した複数種類の人工海水培地 (Sw 培地) に収集試料を投入した。電子受容体には  $H_2/CO_2$  (4:1)、チオ硫酸塩、硝酸塩を使用した。炭素源には、酢酸塩、乳酸塩、メタノール、酵母エキス、ペプトンなどを使用した。試料投入後、25°C で 2 週間培養を行い、培養物を継代した後、再度培養を行った。この作業を 2-3 回繰り返した。集積培養された生物種を同定するため、集積培養物から染色体 DNA を抽出した後、その DNA を鋳型に 16S rRNA 遺伝子を PCR で増幅し、DNA シーケンサーで 16S rRNA 遺伝子塩基配列 (500 bp 程度) を決定した。その結果、*Methanococcus aeolicus*、*Methanococcus maripaludis* などに近縁なアーキアや *Clostridium bifermentans*、*Desulfotignum balticum*、*Prolixibacter denitrificans* などに近縁な細菌が集積されていることが明らかとなった。特に、原油備蓄基地由来の原油から分離され、2015 年に新規の鉄腐食性硝酸塩還元菌として新規提唱された *P. denitrificans* が集積培養されたことは興味深く、天然ガス回収施設にも鉄腐食性硝酸塩還元菌が生息していることが示唆された。そこで、*P. denitrificans* が属する *Bacteroidetes* 門を中心に、集積培養物から細菌の純粋分離を行い、計 11 株を純粋分離した。

### (2) 分離株の系統分類学的位置の解析

分離株 11 株の分子系統位置を明らかにするため、16S rRNA 遺伝子塩基配列に基づく系統解析を行った。分離株の 16S rRNA 遺伝子塩基配列を決定した後、ARB を用いて系統解析を行い、近隣結合法 (NJ 法) を用いて系統樹を作成した。その結果、NT017 株、NT023 株、NT026 株、NT033 株、NT049 株、NT050 株の計 6 株は *Bacteroidales* 目に属し、NT019 株、NT024 株、NT040 株の 3 株は *Clostridiales* 目に属した。NT041 株と NT045 株はそれぞれ *Synergistales* 目と *Spirochaetales* 目に属した。これら分離株の近縁種との 16S rRNA 遺伝子塩基配列の相同性は 87.2–99.8 % であった。8 株に至っては、その相同性が 98.5 % 以下であることから新種の細菌であると示唆され、TBG 内には未知の微生物が多数生息していることが明らかとなった。

### (3) 分離株の鉄腐食能の解析

鉄ホイル ( $Fe^0$ ) を電子供与体として、分離株 10 株の金属鉄腐食能の解析を行った。電子受容体には 10 mM 硝酸塩もしくは 10 mM 硫酸塩を用い、炭素源として 0.05 % 酵母エキス (wt./vol.) を加えた。前培養液を接種して 30 日間培養した後、試験液中の全溶出鉄量をフェナントレン法にて定量した。その結果、硝酸塩を電子受容体として *Draconibacterium* sp. NT033 株を培養した時、鉄イオンが鉄ホイルから溶出しており、NT033 株が金属鉄を腐食することが明らかとなった。同様に、*Mariniphaga* sp. NT050 株も硝酸塩を電子受容体とした時、鉄ホイルから鉄イオンが溶出し、金属鉄を腐食することが明らかとなった。NT033 株および NT050 株共に、硫酸塩を電子受容体とした時に、金属鉄の腐食は見られなかった。NT033 株および NT050

株は、筆者らが過去に発見した *Prolixibacter denitrificans* MIC1-1<sup>T</sup> 株と同様、系統的に *Bacteroidetes* 門 *Bacteroidales* 目 *Prolixibacteraceae* 科に属する菌群であり、*Prolixibacteraceae* 科としては 2 属目、3 属目の鉄腐食性硝酸塩還元菌になる。このことから、*Prolixibacteraceae* 科は鉄腐食性細菌を複数含む系統群であることが示唆された。残る *Bacteroidales* 目に属する 4 株 (NT017 株、NT023 株、NT026 株、NT049 株)、*Clostridiales* 目に属する 3 株 (NT019 株、NT024 株、NT040 株)、それぞれ *Synergistales* 目に属する NT041 株と *Spirochaetales* 目に属する NT045 株は、硫酸塩および硝酸塩のいずれの存在下においても金属鉄の腐食は見られなかった。これら 9 株については、鉄腐食能を有していないと考えられた。

#### (4) 分離株の形態、生理・生化学性状、化学分類学性状の解析

新規に純粋分離した鉄腐食原因菌の至適の鉄腐食条件や生理・生化学的特性を明らかにする為、鉄腐食の *Mariniphaga* sp. NT050 株と鉄非腐食性ではあったが、鉄腐食性の *P. denitrificans* に近縁であった *Prolixibacter* sp. NT017 株の形態観察や生理・生化学試験、化学分類試験を行った。

*Mariniphaga* sp. NT050 株は当初—基礎培地での増殖がわずかで明確な結果を得ることができなかった。基礎的な培養条件の見直しを行った結果、*Mariniphaga* sp. NT050 株は他の *Mariniphaga* 属細菌や鉄腐食性の *P. denitrificans* MIC1-1 株と異なり、炭素源に D-グルコースを利用することができない為に、増殖が不十分であることが明らかとなった。しかし、D-マルトースを培地に加えることで増殖を改良することに成功した。NT050 株は偏性嫌気性、非運動性、無芽胞、カタラーゼ陰性のグラム陰性桿菌であった。生育可能な温度範囲、pH 範囲はそれぞれ 25-37 °C、pH 6.5-8.0 であった。炭素源として唯一 D-マルトースを利用することができた。イソプレノイドキノタイプは MK-7 であった。主要の細胞内極性脂質はホスファチジエタノールアミンで、細胞内脂肪酸組成は iso-C<sub>15:0</sub> と anteiso-C<sub>15:0</sub> であった。16S rRNA 遺伝子に基づく系統解析を行った結果、NT050 株は *Marinilabiliales* 目の *Prolixibacteraceae* 科に属する *Mariniphaga sediminis* SY21<sup>T</sup> 株に最も近縁で、その相同性は 99.9% と高い値であった。NT050 株と *M. sediminis* SY21<sup>T</sup> 株のキノタイプ、細胞内極性脂質組成、主要細胞内脂肪酸組成はほぼ同じであった。しかし、表現性状に着目すると、SY21<sup>T</sup> 株は好気条件下で良好に増殖するのに対し、NT050 株は同条件下で増殖不可能であった。SY21 株は多くの炭水化物を利用できるのに対して、NT050 株は D-マルトースしか利用できず、生化学性状が大きく異なった。以上の分子系統および化学分類性状の観点からは、NT050 株は *M. sediminis* に同定されると考えられたが、表現性状が SY21<sup>T</sup> 株と大きく異なることから、NT050 株の正確な分類学的位置を確定する為に、今後、*M. sediminis* SY21<sup>T</sup> 株との DNA-DNA 相同性試験による同定が必要であると考えられた。

*Prolixibacter* sp. NT017 株は通性好気性、非運動性、無芽胞、カタラーゼ陰性、幅 0.3-0.5 μm、長さ 3.4-6.3 μm のグラム陰性桿菌であった。至適の生育温度、pH、塩濃度はそれぞれ 37-40°C、pH 6.5-7.0、3% (w/v) であった。増殖には炭素源 (D-グルコースなど) を必須に要求した。NT017 株は酸素を電子受容体に利用したが、硝酸塩を利用できず、この点は鉄腐食性の *Prolixibacter denitrificans* と性質が異なった。イソプレノイドキノタイプは MK-7 であった。主要の細胞内極性脂質はホスファチジエタノールアミンで、細胞内脂肪酸組成は iso-C<sub>15:0</sub> と anteiso-C<sub>15:0</sub> であった。*Prolixibacter* sp. NT017 株のゲノムサイズは 5.1 Mb で、DNA G+C 含量は 45.1 mol% であった。16S rRNA 遺伝子に基づく系統解析を行った結果、NT017 株は *Bacteroidales* 目の *Prolixibacteraceae* 科に属する *P. denitrificans* に最も近縁であったが、その相同性は 98.4% と低かった。デジタル DNA-DNA ハイブリダイゼーションと average nucleotide identity を実施した結果、NT017 株と *P. denitrificans* MIC1-1 株の DNA-DNA 相同性はそれぞれ 49.4% と 93.0% であった。以上の結果から、*Prolixibacter* sp. NT017 株は *Prolixibacter* 属の新種であると考えられる。以上の結果から、*Prolixibacter* 属には鉄腐食性と鉄非腐食性の細菌が種レベルで混在する分類群であることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Takao Iino, Nobuaki Shono, Kimio Ito, Ryuhei Nakamura, Kazuo Sueoka, Shigeaki Harayama, Moriya Ohkuma	4. 巻 10
2. 論文標題 Nitrite as a causal factor for nitrate-dependent anaerobic corrosion of metallic iron induced by Prolixibacter strains	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 MicrobiologyOpen	6. 最初と最後の頁 e1225
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/mbo3.1225	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 飯野隆夫、大熊盛也
2. 発表標題 Prolixibacter 属細菌2 新種による硝酸からの亜硝酸生成による金属鉄腐食
3. 学会等名 一般社団法人 日本鉄鋼協会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 飯野隆夫
2. 発表標題 鉄腐食性Prolixibacter属細菌のゲノム解析
3. 学会等名 日本鉄鋼協会2020年秋季大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 飯野隆夫、伊藤公夫、大熊盛也
2. 発表標題 天然ガス回収施設由来の鉄スケールおよび鹹水に生息する鉄腐食硝酸塩還元菌の探索
3. 学会等名 日本微生物資源学会第26回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takao Iino, Kimio Ito, Chol Gyu Lee, Toshiyuki Sunaba and Moriya Ohkuma
2. 発表標題 Quantitative analysis of Prolixibacter, which accommodating with iron-corroding nitrate-reducing bacteria, in microbial mats, brines and seawater.
3. 学会等名 EUROCCORR 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------