

令和 2 年 7 月 6 日現在

機関番号：82706

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H04719

研究課題名(和文) 微生物による金属腐食問題に対する革新的診断技術法の開発

研究課題名(英文) Development of innovative diagnosis against microbiologically influenced metal corrosion

研究代表者

若井 暁 (WAKAI, Satoshi)

国立研究開発法人海洋研究開発機構・超先鋭研究開発部門(超先鋭研究プログラム)・研究員

研究者番号：50545225

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,700,000円

研究成果の概要(和文)：微生物が関与する金属腐食現象は様々な環境において甚大な被害を与えることが知られているが、現在までに有効な診断技術は開発されておらず、この微生物腐食に対する革新的な診断技術を開発することを目的とした。これまでに腐食活性が報告されていない数百株の微生物を培養し、新規に腐食活性を示す菌株を発見した。加えて、環境サンプルを用いた腐食再現試験と微生物群集構造解析を実施し、種々の条件下で腐食の再現に成功し、各種環境で腐食を起こす微生物群を見出した。これらの結果に基づき、様々な腐食環境において遺伝子解析による微生物腐食診断が可能になった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

微生物による金属腐食は様々な環境で起こっており、多大な経済的損失と施設の劣化による様々な化学物質の漏出による二次的な環境汚染が問題となっていた。本研究では、この微生物による金属腐食について、様々な環境において腐食性微生物集団を見つける技術を開発し、微生物の腐食性を迅速に診断することを可能にした。開発した診断技術を社会実装することで、化学工場やエネルギー関連施設の安全性の確保や身近な大型商業施設等の消火用配管の健全性の確保が可能となる。

研究成果の概要(英文)：Some microorganisms have frequently caused severe corrosion of metal materials. Unfortunately, valid diagnosis method against the microbiologically influenced corrosion have never been developed. In this study, I attempted to examine the corrosion properties of some hundreds strains of microorganisms, and I found novel corrosive-microorganism. Furthermore, I collected samples from various environments involving metal corrosive environment and carried out lab-scale corrosion test and microbial community analysis. As a result, I found some metal-corrosive microbial community clusters from approximately 500 samples. Based on these results, I developed valid diagnosis method against the microbiologically influenced corrosion using genetic analysis.

研究分野：応用微生物学

キーワード：環境評価 診断技術 微生物腐食 微生物群集構造解析

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

金属材料はしばしば環境中で激しく腐食し、多大な経済的損失を与える。加えて、金属腐食に付随して起こる石油や化成品の漏出は、環境汚染を引き起こしている。中でも、微生物が金属の腐食現象に関与する微生物腐食は古くから知られており、1934年には硫酸塩還元細菌が金属表面に生じた水素を消費して腐食性の硫化水素を生産することに起因するという論文が出されている。しかし、研究室レベルで腐食が再現できないという問題が長年続き、真に腐食を誘導する微生物(腐食性菌)は何か?という問題が存在していた。

腐食現場の技術者等へのヒアリングから、診断技術の開発の遅れが顕著であることが明確となり、この遅れの原因は、微生物腐食を人の微生物感染症と比較することで見えてくる。微生物感染症では有効な診断技術により有効な予防・治療が可能であるが、微生物腐食は原因菌の全容が明らかになっていないため診断技術が未発達であり、対策(防食と処理)が後手に回っているのである。したがって、微生物腐食問題で必要なことは、何に感染しているかをまず知ることであり、そのためには腐食性菌をなるべく網羅的にリスト化することが必要であり、腐食性微生物の情報に基づいて診断技術を確立していく必要がある。

### 2. 研究の目的

国内外共に新規の腐食性菌の探索とその腐食メカニズムの解明に注力されているが、腐食が問題となる現場では微生物腐食に対する有効な診断技術が熱望されている。本研究課題は、この微生物腐食という問題において根本的な問題である“腐食能を持つ微生物は何か?どのようにして微生物腐食と判断したらいいのか?”を解決するために、前者の問題に対して腐食性菌をリスト化し、後者の問題に対して革新的な診断技術を確立することを目指す。

具体的には、カルチャーコレクションから金属腐食能が報告されていない微生物を取り寄せてそれらの腐食能を調べることで、既知微生物に対する金属腐食能の分布を調べる。また、実環境中の多くの微生物は培養に成功していないものであり、複雑な微生物群集構造を形成して様々な能力を発揮していることもあり、様々な環境からサンプルを採取し、微生物集団レベルでの腐食能についても調べる。これらの結果に基づいて、培養に依存せずに腐食性の診断ができる技術の確立を目指す。

### 3. 研究の方法

#### (1)カルチャーコレクション株に対する金属腐食能試験

カルチャーコレクション株として理化学研究所バイオリソースセンターのJCM株を対象とし、284属593種の基準株を入手した。各菌株の維持培養および前培養には、JCMカタログに記載されている培地を用いた。金属腐食試験能は、Nutrient Broth、LB培地、MRS培地、Marine Broth 2216、人工海水培地等に純鉄試験片(Fe > 99.9%、10×10×0.1 mm)を投入して培養した。37あるいは50℃で静置培養を行い、14日目までの鉄溶出量をo-フェナントロリン法により測定した。嫌気培養物については、腐食に伴うガス生産を調べるため、気相部をガスクロマトグラフィーにより分析した。

#### (2)環境サンプルを用いた腐食再現試験と微生物群集構造解析

化学工場、石油備蓄施設、天然ガス関連施設、深海設置装置、および、商業施設等消火用配管から、環境水、堆積物、腐食生成物を各組織から提供いただき、各環境を模倣した条件で腐食再現試験を実施した。各条件の模倣するパラメータとしては、酸素条件(好気、微好気、嫌気)、塩分濃度(淡水、汽水、海水)、栄養塩濃度(希薄栄養塩培地 or 無機塩培地)とした。微好気条件は気相を大気環境としてブチルゴム栓で密栓した培地に注射針を刺すことで酸素の流入を制限し、嫌気条件はN<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub>(80:20)混合ガスでパージし、ブチルゴム栓で密栓した。

好気環境でのステンレス鋼の腐食試験には、電位モニタリング培養を実施した。ステンレス鋼(SUS316)に被覆された銅線を接続し、接続部を絶縁性のシリコン樹脂で覆い、ステンレス鋼電極とした。参照電極には銀・塩化銀電極を用い、両電極を電圧ロガーに接続し、培養中の電位をモニタリングした。

環境試料および培養試料からDNAを抽出し、BacteriaおよびArchaeaを標的とした16S rRNA遺伝子断片を増幅した。Indexを付与した後、次世代シーケンサMiSeqを用いて配列を解析し、取得データはQIIME2を用いてOTUのtaxonomy解析と多様性解析を実施した。

### 4. 研究成果

#### (1)カルチャーコレクション株に対する金属腐食能試験

284属593種の基準株を培養して、金属腐食試験を実施した結果、これまでに金属腐食能の報告の無い微生物株において、劇的な腐食反応が観察された。3週間の培養において、金属試験片の原型が無くなるほどの腐食反応が進み、培地中に10mMを超える鉄イオンが溶出していた。一方で、ほとんどの微生物株において有意な金属腐食能を確認することはできなかった。

解析した菌株数に対して有意な金属腐食能を示す菌株はかなり少なかったことから、金属腐食反応の分布は比較的限られたものであると考えられるが、突出した金属腐食能を示す株が存在することから未知の金属腐食性株がまだ存在すると考えられる。特に、強い腐食性を示した菌株は*Clostridium*属に属するが、多くの他の*Clostridium*属細菌において金属腐食能は観察されず、種レベルで金属腐食能を獲得していると言える。すなわち、金属腐食能の進化的な分布を

考えた時、比較的新しい遺伝子水平伝播等で機能獲得している可能性が考えられる。今後、本菌の腐食メカニズムを明らかにするためにも、腐食原因遺伝子を特定する必要がある。

## (2)環境サンプルを用いた腐食再現試験と微生物群集構造解析

### 化学工場サンプル

化学工場の複数のプラントからの排水を集約して送水している配管において配管の急速な腐食劣化が進行していることから、微生物による金属腐食を想定し、排水ラインの複数のポイントから排水を回収した。この時、プラントの稼働状況によって排水の成分が大きく変動することから、稼働状況の異なる複数の時点でサンプルを行った。また、配管の修繕工事等に合わせて、配管内堆積物をサンプリングした。これらのサンプルを用いた腐食再現試験において、排水ラインの下流域から回収したサンプルにおいて特に加速された腐食反応が確認された。この時の培地及び、腐食生成物は真っ黒に変色していることから硫酸塩還元細菌による腐食が考えられた。

排水、配管内堆積物、および、腐食再現培養液の微生物群集構造解析を実施した結果、排水のサンプリングポイントやサンプリング時期によって微生物群集構造が変動していることが明らかになった。排水中に硫酸塩還元細菌はある程度の割合で検出されたが、培養試験において加速された腐食反応を示していないサンプルにおいても硫酸塩還元細菌の集積は見られることから、硫酸塩還元細菌単独での腐食反応ではないように推定された。腐食再現試験で実際に腐食が進行したサンプルや実環境の配管内堆積物の微生物群集を調べた結果、硫酸塩還元細菌に加えて特定の従属栄養性微生物の集積が認められ、この両者の集積が強い腐食反応に必要であることが明らかとなった。

### 石油備蓄施設

当該施設から環境水を入手し、ステンレス鋼電極を用いた電位モニタリング培養と微生物群集構造解析を実施した。ステンレス鋼は金属表面に安定な酸化層(不動態皮膜)を形成するため、多くの場合腐食が進行しないが、不動態皮膜の破壊が起こると局所的な腐食が急速に進行する。一方で、ステンレス鋼を用いたラボベースでの腐食再現試験において腐食の再現に関する報告は殆どないが、本研究では腐食の再現に成功した。培養に伴い電位の上昇(電位貴化)が見られ、その後、不動態皮膜の破壊による急激な電位の下降が見られ、ステンレス鋼表面に赤さびが発生した。清浄な環境水を用いた場合や希釈栄養塩を添加していない場合では、このような現象が確認されず、環境水中に存在する微生物によって引き起こされた現象と考えられる。

環境水、電位モニタリング培養後の培養液、電極表面の付着物の微生物群集構造解析を実施した結果、腐食発生したサンプルでは環境水中の微生物群集から明らかに異なる群集構造へと遷移していた。一方で、特定の微生物の顕著な集積は起こっておらず、ステンレス鋼腐食のメカニズムを推定するには至らなかったが、特定の微生物の腐食能による腐食ではなく、複合微生物系での微生物代謝に依存していると考えられる。

### 天然ガス関連施設

当該施設に金属試験片サンプルを浸漬することが可能であったため、様々な鋼種の金属試験片の実機中での腐食再現試験を実施し、引き上げ後に付着物を回収して、微生物群集構造解析を実施した。鋼種によって激しく腐食したもの、全く腐食しなかったものがあったが、腐食したものでは、特定の微生物が集積している傾向にあった。また、腐食していなかったサンプルにおいては、抗菌性のある材料と耐食性の高いステンレス鋼で付着微生物群の違いが見られた。また、腐食が発生していないステンレス鋼でも現地にて電位の貴化現象は確認されており、腐食発生リスクを高める微生物に関する情報が得られている。本試料については、DNA抽出と同時にRNA抽出も行っており、今後トランスクリプトーム解析を実施することで、どのような遺伝子の発現挙動が電位貴化現象に繋がっているか調べる予定である。

### 深海設置装置

深海約 1000 m の場所に設置されている装置において顕著な腐食が発生しており、当該装置内の腐食が発生していた部分から堆積物を回収し、実験室レベルで培養試験を行った。当該装置は湧出する熱水に曝されていることもあり、深海サンプルであるが、37、50、70 で培養を行った。その結果、37 および 50 で無菌区よりも数倍～数十倍の速度で金属鉄から電子を受け取って腐食が進行している培養物を得た。培養物の微生物群集構造解析の結果、37 での腐食では特定のメタン生成菌が比較的集積していた。このメタン生成菌は、既知の鉄腐食性メタン生成菌とは異なる種であり、新規の鉄腐食性メタン生成菌であると思われる。現在、本菌の分離株を得るために、本培養物の集積培養を実施している。

### 商業施設等消火用配管

淡水中でのステンレス鋼の腐食は物理化学的な現象で説明することは難しく、多くの場合、微生物による腐食の誘導が疑われる。近年、消火用配管にステンレス鋼が使われるようになったが、いくつか腐食事例が報告されている。したがって、いくつかの商業施設等から消火用配管内の滞留水を手し、腐食再現試験と微生物群集構造解析を実施した。ラボベースでステンレス鋼の腐食再現には至らなかったが、純鉄試験片を用いた場合に、微好気条件下で著しい腐食が確認された。微生物群集構造解析の結果、腐食が進行したサンプルにおいて特定微生物の集積は見られなかったものの、非腐食性の微生物群集構造と腐食性微生物群集構造が明確に分かれ、また、腐食性微生物群集構造も二つに分けることが出来た。その腐食性微生物群は、Proteobacteria 門を主体とするものと Firmicutes 門を主体とするものに分かれた。

### (3) 微生物群集構造の統合解析

(2)の実験により得られた微生物群集構造に関する約 600 サンプルのデータを一括して比較解析した結果、腐食性微生物群集を幾つかのパターンに分けることに成功した。大きく、嫌気的な環境で硫酸塩還元細菌を含むグループ、微好気的な環境で腐食を誘導するグループ、ステンレス鋼の腐食に関与するグループに分けることができる。全く異なるサイトから入手したサンプルでも、似た微生物群集構造を示す腐食サンプルが存在することから、腐食微生物群集構造が幾つかのクラスターに分けられるだけでなく、この群集構造の類似性を持って微生物腐食発生リスクを評価できる可能性が示された。

したがって、固有で高い金属腐食能を持つ微生物を遺伝子レベルで検出する方法と金属材料が曝されている微生物群集構造を調べる方法を組み合わせることで、微生物腐食発生リスクを評価することが可能であるだろう。今後、これらの微生物群集構造データを機械学習データとして解析することで、腐食に特に影響する微生物群集因子を特定できる可能性がある。

### (4) 総括

カルチャーコレクション株 284 属 593 種の基準株の金属腐食能を調べた結果から、金属腐食能は系統学的な分布よりも遺伝子水平伝搬による幅広い種に個別に分布していることが明らかとなった。また、各種環境試料を用いた腐食再現試験および微生物群集構造解析から、これまで難しいとされていたステンレス鋼の実験室レベルでの腐食再現試験に成功し、その際の細かな電位挙動のモニタリングに成功し、加えて、腐食性微生物群集構造がいくつかのクラスターに分かれることを明らかにすることが出来た。微生物腐食診断に使えるバイオマーカーの特定までは至らなかったものの、微生物群集構造解析に基づく微生物腐食リスク診断のプロトタイプを構築することに成功したと言える。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 3件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Satoshi Wakai, Sotaro Fujii, Kazuhiko Miyanaga, Yasunori Tanji, and Yoshihiro Sambongi	4. 巻 105117
2. 論文標題 Microbial corrosion induced by co-existence of Acetobacterium sp. and Desulfovibrio sp. enriched from bottom water in oil-storage tank	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 EUROCORR proceedings	6. 最初と最後の頁 1~13
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 S. Wakai	4. 巻 EAPA19NOV-14117
2. 論文標題 Corrosion behavior in co-existence of iron-corrosive microorganism and non-corrosive bacteria	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 NACE EAPA proceedings	6. 最初と最後の頁 1~7
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 -

1. 著者名 若井暁	4. 巻 93
2. 論文標題 微生物が関与する金属腐食～微生物腐食	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 科学と工業	6. 最初と最後の頁 339~345
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 S. Wakai	4. 巻 -
2. 論文標題 Latest knowledge of (electro)microbiology	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Electron based bioscience and biotechnology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 S. Wakai	4. 巻 -
2. 論文標題 Microbiologically influenced corrosion	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Electron based bioscience and biotechnology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 S. Wakai	4. 巻 -
2. 論文標題 Electron flow rate in microbiologically influenced corrosion and its applications	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Electron based bioscience and biotechnology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 若井暁	4. 巻 18
2. 論文標題 金属中の電子を抜き出して食べる微生物達	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 環境バイオテクノロジー学会誌	6. 最初と最後の頁 51 ~ 56
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -

1. 著者名 Wakai Satoshi	4. 巻 83
2. 論文標題 Biochemical and thermodynamic analyses of energy conversion in extremophiles	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 49 ~ 64
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/09168451.2018.1538769	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 -

1. 著者名 若井暁	4. 巻 35
2. 論文標題 加熱で活性型になるバイオサイド	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 BIO INDUSTRY	6. 最初と最後の頁 26 ~ 35
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 若井暁	4. 巻 60
2. 論文標題 微生物腐食を防ぐ新薬剤	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 配管技術	6. 最初と最後の頁 22 ~ 28
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計26件 (うち招待講演 7件 / うち国際学会 10件)

1. 発表者名 S. Wakai
2. 発表標題 Accelerated electron flow and direct electron transfer in corrosion by iron-corrosive methanogen
3. 学会等名 EUROCORR2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 S. Wakai
2. 発表標題 MIC is infectious disease of metal materials
3. 学会等名 FRC-Corrosion2019 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 S. wakai
2. 発表標題 Corrosion Behavior in Co-Existence of Iron-corrosive Microorganism and Non-Corrosive Bacteria
3. 学会等名 NACE East Asia and Pacific Area Conference ( 国際学会 )
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 S. Wakai
2. 発表標題 Electron flow rates in corrosion under co-existence of iron-corrosive methanogen and sulfate-reducing bacterium
3. 学会等名 ISMET 7 ( 国際学会 )
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 S. Wakai
2. 発表標題 A large-scale metagenomic analysis of microbial communities in corrosive and non-corrosive environmental and cultivated samples
3. 学会等名 EUROCORR2019 ( 国際学会 )
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Satoshi Wakai
2. 発表標題 Metal corrosion by microorganisms
3. 学会等名 日本生物物理学会第56回年会 ( 招待講演 )
4. 発表年 2018年



1. 発表者名 Satoshi Wakai, Sotaro Fujii, Yasuyoshi Tomoe, Kazuhiko Miyanaga, Yasunori Tanji, Yoshihiro Sambongi
2. 発表標題 Microbial corrosion induced by co-existence of Acetobacterium sp. and Desulfovibrio sp. enriched from bottom water in oil-storage tank
3. 学会等名 EUROCORR2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Satoshi Wakai and Shigeaki Harayama
2. 発表標題 Electron flow rate in the corrosion by iron-corrosive methane producing archaeon
3. 学会等名 ASM Microbe 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 若井暁
2. 発表標題 微生物腐食を標的とした遺伝子診断技術の開発
3. 学会等名 第321回腐食防食部門委員会「微生物腐食及び微生物燃料電池」(招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 若井暁
2. 発表標題 複合微生物系での金属腐食挙動～誘起・増強・抑制
3. 学会等名 日本防菌防黴学会 第44回年次大会(招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Satoshi Wakai
2. 発表標題 Microbial corrosion by iron-corrosive methanogen and biocidal effect of glutaraldehyde analogs
3. 学会等名 EUROCORR 2017, 20th ICC & Process Safety Congress 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 若井暁
2. 発表標題 金属中の電子を抜き出して食べる微生物達
3. 学会等名 環境微生物系学会合同大会2017 (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Satoshi Wakai, Sotaro Fujii, Yasuyoshi Tomoe, Kazuhiko Miyanaga, Yasunori Tanji, Yoshihiro Sambongi
2. 発表標題 Metallic iron corrosion by microorganisms living in oil-storage tanks
3. 学会等名 ASM Microbe 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 若井暁
2. 発表標題 遺伝子解析を用いた微生物腐食診断技術の開発
3. 学会等名 腐食防食学会、材料と環境2017 (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Satoshi Wakai
2. 発表標題 Diagnostic and anti-corrosion techniques for microbiologically influenced corrosion
3. 学会等名 China International Marine Corrosion & Protection Technology Innovation and Application Development Forum (CIMCP) 2017 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>日本農芸化学会2020年度大会トピックス演題選出「金属腐食と微生物群集構造の相関解析」 (<a href="https://jsbba.bioweb.ne.jp/jsbba2020/index.php?btn2_move=on&amp;topics=1">https://jsbba.bioweb.ne.jp/jsbba2020/index.php?btn2_move=on&amp;topics=1</a>)</p>
--

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