

令和 4 年 6 月 8 日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18H01755

研究課題名(和文) バイオフィーム環境の空間時間的定量イメージングによる微生物腐食機構の解明

研究課題名(英文) Studies on microbiologically influenced corrosion mechanisms by spatial-temporal imaging of an internal environment of biofilm

研究代表者

川上 洋司 (Kawakami, Hiroshi)

大阪市立大学・大学院工学研究科・准教授

研究者番号：90305615

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：蛍光DNAプローブと共焦点レーザー顕微鏡を用いることによりバイオフィーム(BF)中の特定の菌細胞や細胞外多糖類を定量化できること、また、BF中での腐食性細菌の空間分布と腐食発生位置を関係づけることができた。また、酸洗がステンレス鋼溶接部の微生物腐食対策として有効であることが示された。腐食事例を解析したところ、好気性環境下で作られたBF中に生息していたRhodocyclaceae科の菌が微好気性環境下で腐食速度を高めたことが示唆された。このような系に次亜塩素酸系殺菌剤を添加すると、微好気性環境下での速い腐食が認められなくなり、次亜塩素酸系殺菌剤が微生物腐食対策として有効であることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

バイオフィーム(BF)中の金属腐食性菌の定量化とその空間分布の可視化を可能にし、さらに可視化された金属腐食性菌と局部腐食の同時観察方法を確立した。この観察手法今後の微生物腐食の解析のみならず、ミクロな生態系としてのバイオフィームの微生物学的研究にも応用できる。また、ステンレス鋼溶接部の微生物腐食と炭素鋼排水管の微生物腐食への対策を提案した。この成果は各種プラントやインフラ設備の安全使用に資する。

研究成果の概要(英文)：Volume of specific bacterial cells and extracellular polysaccharides in biofilm were quantified by using a fluorescent DNA probe and a confocal laser scanning microscope. Such microscopic technique was also useful to observe distribution of metal corrosive bacterial cells in the BF and local corrosion under the BF. It was also shown that pickling is effective as a countermeasure against microbial corrosion of stainless steel welds. A cases study indicated that the Rhodocyclaceae sp. bacteria living in a BF increased the corrosion rate in a microaerobic environment. When a hypochlorous acid-based disinfectant was added to such a system, corrosion rate in a microaerophile environment significantly decreased, indicating that the hypochlorous acid-based disinfectant is effective as a countermeasure against microbially influenced corrosion.

研究分野：環境材料学

キーワード：微生物腐食 メタ遺伝子解析 蛍光X線分析 電気化学分析 バイオフィーム

### 1. 研究開始当初の背景

微生物腐食とは、環境水や土壌中において微生物の働きによって金属材料の腐食が通常の化学腐食よりも比較的速く進行する現象のことである。金属が環境水や土壌にさらされると、その表面には種々の細菌が付着・増殖し、バイオフィームと呼ばれるスライム状の皮膜が形成される。微生物腐食はこのバイオフィーム内の細菌が腐食性化学物質を作り出すことによって生じる。微生物腐食は給排水施設や発電施設、橋梁、海洋構造物などにおいて多数報告されており、それによる経済損失は国民総生産の0.5～2.5%にも及ぶと考えられている。このように微生物腐食は我々の生活に多大な被害を及ぼしており、微生物腐食に対する理解および基礎原理に基づいた対応策を講じることは、「持続可能な社会」を達成するためには極めて重要な取り組みである。しかしながら、微生物腐食には未だ未解明な現象が多く、学術的に理解されているとは言い難く、それ故に防食対策にもほとんど進展がない。

これまでの微生物腐食に関する研究では、単離された細菌を用いたラボ実験の結果を基にした微生物腐食モデルの提案がなされているものの、微生物腐食の特徴の一つである非常に速い腐食速度を定量的に説明するには至っていない。近年においては、化学分析技術や遺伝子解析技術の進歩を反映して、統一的な腐食機構の解明よりも個々の学術分野に特化した研究において進展がみられる。例えば、細菌の集合体であるバイオフィームの遺伝子解析によりバイオフィームの微生物群集構造が詳細に検討されるようになってきた。このように現在の微生物腐食に関する研究では、各学術分野において精密かつ詳細な検討は行われているものの、微生物腐食機構の解明という点からは離散的な成果に留まっている。

微生物腐食が「金属材料学」、「分析化学」、さらに「微生物学」という3つの学術領域にまたがる学際領域学問であるため、単一の専門領域の研究ではその全体像を把握できないことも研究の進展を阻害する一因となっている。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、「バイオフィーム中に存在する腐食関係微生物および腐食促進化学物質の空間的・時間的定量化を行い、それらと金属材料の微生物腐食量との関係から微生物腐食に関する速度論の構築」を行うことである。

### 3. 研究の方法

過去の微生物腐食事例より単離した腐食性細菌 (*Bacillus* sp) の 16S rRNA 解析を行い、この腐食性細菌のみを染色する蛍光 DNA プローブを製作した。この腐食性細菌を含むマルチカルチャーバイオフィームをステンレス鋼溶接部に成長させた。このステンレス鋼溶接部を対象として、蛍光 DNA プローブを用いた共焦点走査型レーザー顕微鏡観察の有効性について検証した。

次に微生物の関与が疑われる腐食事例に対し、発生したバイオフィームの 16S rRNA 解析による菌叢解析等を行い事例解析と対策立案を行った。

### 4. 研究成果

腐食性細菌 (*Bacillus* sp) の 16S rRNA 解析を行い、この腐食性細菌のみを染色する蛍光 DNA プローブを製作した。この蛍光 DNA プローブの検証実験を行い、マルチカルチャーバイオフィーム中の腐食性細菌の空間分布が定量的に評価できることを確認した。つづいて、溶接部を有するステンレス鋼を試験片とし、共焦点レーザー顕微鏡を用いたバイオフィーム - 金属表面同時観察を行った。腐食性細菌はバイオフィームの中に不均一に分布し、特に基板表面付近に腐食性細菌の密度が高い空間が存在した。バイオフィームの体積は熱影響部および溶接金属部において大きかった。熱影響部と溶接金属部では腐食性細菌の密度が高い部分の下に孔食が生じていたが、母材部では腐食は認められなかった。溶接部に酸

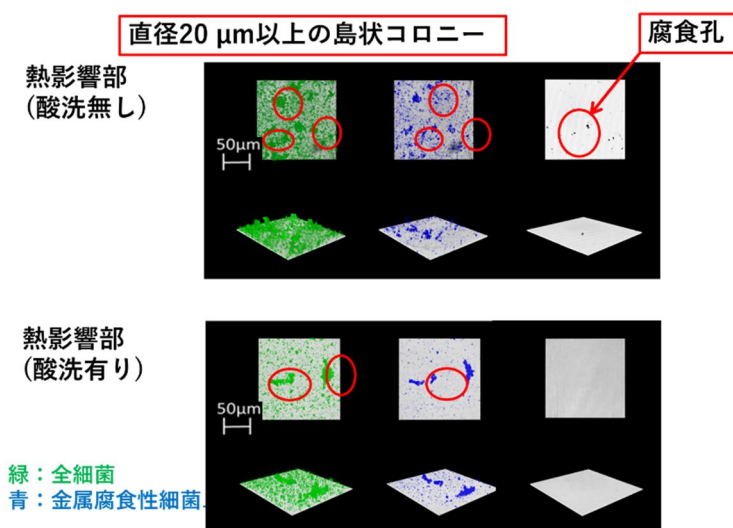


図1 共焦点レーザー顕微鏡を用いたバイオフィーム - 金属表面同時観察結果

の密度が高い部分の下に孔食が生じていたが、母材部では腐食は認められなかった。溶接部に酸

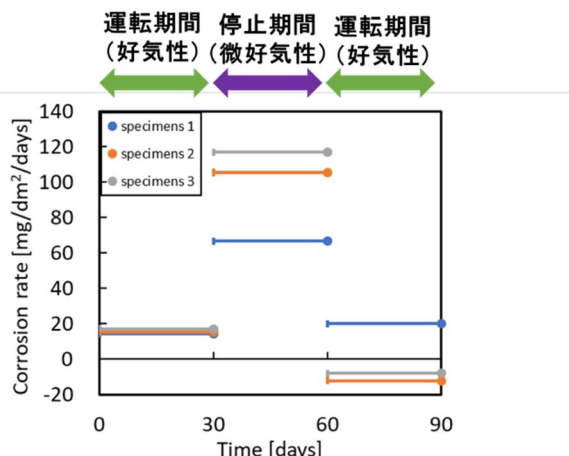
洗を施した試験片では、酸洗を施さない試験片と同じようなバイオフィームが形成されたが、孔食が生じなかった。したがって、酸洗が溶接部の MIC 対策として有効であることが示された。また、蛍光 DNA プローブと共焦点レーザー顕微鏡を用いることにより (i) バイオフィーム中の特定の菌細胞や菌が放出する細胞外多糖類を定量化できること、また、(ii) バイオフィーム中での腐食性細菌の空間分布と腐食発生位置を関係づけることが可能であることが示された。

亜鉛めっき炭素鋼管で生じていると考えられる環境水が流れている好気性環境と流れが停滞している微好気性環境が約 1 カ月毎に入れ替わる環境を模擬した浸漬実験を行い、表面に生じた腐食の外観観察や腐食生成物の化学分析や腐食速度の測定を行った。

始めの好気性環境下(0~30日)に腐食速度は約 20 mg/dm<sup>2</sup>/days (mdd)であった。次の期間(31~60日)は微好気性環境下であったにもかかわらず腐食速度は 70 mdd 以上と上昇した。2 回目の好気性環境下(61~90日)での腐食速度は約 30 mdd に低下した。

バイオフィーム中の菌叢(16S rRNA 解析結果)を比較したところ、腐食速度が速い 30-60 日の微好気性環境の期間に *Rhodocyclaceae* 科の菌の割合が増加していた。このことは *Rhodocyclaceae* 科の菌がバイオフィームの形成に大きく関与していることを示唆する。*Rhodocyclaceae* 科には微好気性の鉄酸化細菌が含まれている。好気性環境下で作られたバイオフィーム中に生息していた *Rhodocyclaceae* 科の菌が、微好気性環境下で活性化し、腐食速度を高めたと考えられる。

このような系に抗菌スペクトルの広い次亜塩素酸系の殺菌剤を添加すると、この微生物腐食事例の特徴である微好気性環境下での速い腐食が認められなくなった。また、有菌区、無菌区ともに、好気性環境にある試験片の自然電位は微好気性環境よりも貴であった。腐食速度と浸漬後の試験片表面に有菌区と無菌区で差が認められなかった。これらの結果は抗菌スペクトルの広い次亜塩素酸系殺菌剤を添加することによりバイオフィーム内の金属腐食性菌が殺菌され、その結果として微生物腐食が抑制されたことを示唆する。



停止期間(微好気性)での腐食速度が速い (模擬プラントで試験)

図 2 浸漬期間毎の腐食速度

殺菌剤を有機系 → 次亜塩素酸に変更 (ビーカーで試験)

- ・自然電位  
好気性環境 > 微好気性環境  
有菌区 = 無菌区
- ・質量減少量、腐食速度、浸漬後の試験片表面  
有菌区 = 無菌区

腐食に及ぼす微生物の影響は認められず、よって、殺菌剤の変更は有効であった。

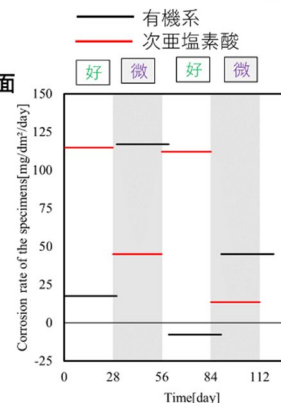


図 3 次亜塩素酸系殺菌剤を用いた時の浸漬期間毎の腐食速度

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 2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 川上洋司	4. 巻 49
2. 論文標題 微生物による劣化－繊維，金属，木材，コンクリート，紙など－1 微生物による材料の劣化－概要－	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 日本防菌防霉学会誌	6. 最初と最後の頁 137-148
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 川上洋司	4. 巻 89
2. 論文標題 溶接部の腐食トラブル事例と要因解析・対策－溶接冶金委員会－微生物腐食事例とその対策	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 溶接学会誌	6. 最初と最後の頁 69-70
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 陳自義，細見凌平，川上洋司，辻幸一	4. 巻 50
2. 論文標題 鉄鋼材料の微生物腐食挙動の 共焦点微小部蛍光X線分析法による観察	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 X線分析の進歩	6. 最初と最後の頁 169-175
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 川上洋司	4. 巻 36
2. 論文標題 微生物腐食概論	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 環境管理技術	6. 最初と最後の頁 199-210
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 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 川上洋司、谷口結梨果、池田裕亮、松内悠哉、中西猛、有吉欽吾、辻幸一、北村昌也、丸亀和雄
2. 発表標題 好気性と微好気性を周期的に繰り返す環境下で炭素鋼に生じた微生物腐食
3. 学会等名 日本防菌防霉学会第48回年次大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 H. Kawakami, T. Wada, T. Nakanishi, K. Ariyoshi, K. Tsuji, M. Kitamura, and Y. Kikuchi
2. 発表標題 Effect of Pickling and Mechanical Grinding on Initiation of Biofilm and Microbially Influenced Corrosion of Stainless Steel Weldments
3. 学会等名 NACE East Asia & Pacific Area Conference (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 川上洋司、西岡祐貴、和田卓大、菊地靖志
2. 発表標題 ステンレス鋼溶接部でのバイオフィーム発生と微生物腐食
3. 学会等名 第66回材料と環境討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 川上洋司、和田卓大、菊地靖志
2. 発表標題 酸洗や機械研磨がステンレス鋼溶接部でのバイオフィーム発生挙動と微生物腐食発生に及ぼす影響
3. 学会等名 材料と環境2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 川上洋司, 菊地靖志
2. 発表標題 ステンレス鋼溶接部の微生物腐食
3. 学会等名 溶接学会2019年度秋季全国大会 フォーラム ” 溶接部の腐食 ”
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 川上洋司
2. 発表標題 微生物腐食概論
3. 学会等名 日本材料学会腐食防食部門委員会第321例会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 和田卓大, 川上洋司
2. 発表標題 多種類の菌で形成されたバイオフィルムの付着量とステンレス鋼溶接部の腐食の発生との関係
3. 学会等名 日本鉄鋼協会第176回秋季講演大会
4. 発表年 2018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
研究 分担者	北村 昌也  (Kitamura Masaya)  (20244634)	大阪市立大学・大学院工学研究科・教授   (24402)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究分担者	中西 猛  (Nakanishi Takeshi)  (20422074)	大阪市立大学・大学院工学研究科・准教授    (24402)	
研究分担者	辻 幸一  (Tuji Kouichi)  (30241566)	大阪市立大学・大学院工学研究科・教授    (24402)	
研究分担者	有吉 欽吾  (Ariyoshi Kingo)  (80381979)	大阪市立大学・大学院工学研究科・准教授    (24402)	

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