

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 24 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2015

課題番号：23770095

研究課題名(和文)石油備蓄基地施設から分離した腐食菌およびその他新規微生物の微生物分類性状の解析

研究課題名(英文) Polyphasic taxonomic study of iron-corroding bacteria and the phylogenetically related bacteria isolated from an oil well

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・バイオリソースセンター・研究員

研究者番号：50550323

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：Prolixibacter denitrificans MIC1-1株はBacteroidetes門に属する初の金属腐食細菌であったことから、Prolixibacter属および関連細菌の分類性状を分析した。その結果、MIC1-1株とMIC1-4株はProlixibacter属に属する鉄腐食性の硝酸塩還元菌であった。MIC3-8株はDraconibacterium属に属する鉄還元菌であった。多相分類学的アプローチに基づき、MIC1-1株に対し、新種Prolixibacter denitrificansを命名した。

研究成果の概要(英文)：Prolixibacter denitrificans strain MIC1-1 from a crude-oil sample at an oil well is the first Fe0-corroding nitrate-reducing representative belonging to the order Bacteroidales. Thus, we characterized isolates from oil field and belonging to the phylum Bacteroidetes. Three strains MIC1-1, MIC1-4 and MIC3-8 isolated from crude-oil sample collected at an oil well in Tohoku region were a facultatively aerobic mesophilic chemoheterotrophic non-hydrogenotrophic bacteria. Strains MIC1-1 and MIC1-4 were Fe0-corroding nitrate-reducing bacteria. Strain MIC3-8 was a ferric-reducing bacterium. Phylogenetic analysis based on 16S rRNA gene sequences revealed that strain MIC1-1 and MIC1-4 were a member of the genus Prolixibacter in the order Bacteroidales, and strain MIC3-8 was a member of the genus Draconibacterium in the order Bacteroidales. On the basis of a polyphasic taxonomic approach, novel species is proposed for strain MIC1-1, to be named Prolixibacter denitrificans.

研究分野：微生物分類学

キーワード：微生物腐食 鉄腐食 鉄酸化 硝酸還元 Prolixibacter Bacteroidales 原油

1. 研究開始当初の背景

金属材料は土木・建築、車両や船舶、配管資材、貯蔵タンクなど様々な用途で使用されており、現代の我々の生活に必要な不可欠な材料である。しかし、時間経過と共に、金属が溶けたり腐食生成物(いわゆるサビ)を生成する金属腐食が起こることで、金属材料は性能低下や機能劣化を引き起こす。アメリカ合衆国の連邦道路管理局(US Federal Highway Administration)が2002年に発表した試算では、金属腐食による年間損害額は2760億ドルに達し、これはアメリカ合衆国の国内総生産(GDP: Gross domestic product)の3~4%に相当するとも試算されている。これは日本のGDPに換算すると年間15-20兆円に相当する額である。このような経済的損失だけでなく、金属腐食に伴い溶出する重金属イオンや原油や灯油など貯蔵物の漏洩による自然環境への悪影響も懸念されており、国際的に金属腐食は問題視されている。安定したエネルギー資源の確保や地球的環境保護は現代の人類が直面する喫緊の課題であり、腐食部位の早期発見や防食技術の開発・向上が国際的に求められている。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(Microbiologically influenced corrosion: MIC)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。しかし、微生物腐食は予測よりも著しい速度で腐食が進行したり、腐食しないはずの環境で腐食が生じるため予測困難で、問題が深刻化している。自然界には多種多様な微生物が棲息するため、腐食箇所では微生物が検出されたとしても微生物腐食として断定することはできない。硫酸塩還元菌やメタン生成アーキアが微生物腐食の主な原因菌とされてきたが、現実には、腐食発生機構の解明はおろか原因微生物の正確な種の特定さえできておらず、微生物腐食の重大性を認識しながらも効果的な防食技術がない現状である。

2. 研究の目的

2005-2008年にかけて、6地点から原油や灌水、堆積物などを採取し、微生物株の培養・分離を行った結果、筆者らは、過去に未培養であった新種の細菌 *Prolixibacter* sp. MIC1-1 株の分離・培養に成功し、本菌株が、亜硝酸生成を伴う硝酸還元により鉄腐食を引き起こすことを明らかにした (Iino et al., 2015)。*Prolixibacter* sp. MIC1-1 株の鉄腐食では、腐食産物として炭酸鉄 (FeCO_3) とリン酸鉄 (FePO_4) が形成されており、炭酸鉄を主として形成するSRBやメタン生成アーキアの腐食生成物とは異なっていた。さらに、*Prolixibacter* sp. MIC1-1 株はカソード水素を利用できなかったことから、従来知られているカソード複極説に基づく微生物腐食ではなく、金属鉄から直接電子を引き抜いて、

金属腐食を引き起こす可能性が示唆された。一方で、過去の微生物腐食研究で、*Prolixibacter* 属が所属する *Bacteroidales* 目は全く注目されなかったため、本目内の金属腐食菌の多様性や実環境への影響は定かでない。効果的な防食対策を講じるためには、金属腐食菌の正確な種の特定や腐食環境中の微生物生態系の把握が必要不可欠である。そこで、本研究では、*Bacteroidetes* 門に属する鉄腐食性細菌の探索を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

3-1. 供試菌株

秋田県の石油備蓄基地で収集した原油から純粋分離した *Prolixibacter* sp. MIC1-1 株と MIC1-4 株、宮城県の石油備蓄基地で収集した原油から純粋分離した MIC3-8 株を供試菌株として用いた。また、対象株として、*Prolixibacter bellariivorans* JCM 13498^T を用いた。これら菌株を HXSw 培地 (Iino et al. 2015) に接種し、25°C にて 2-5 日培養し、維持した。

3-2. 分類性状の解析

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、細胞内脂肪酸組成、DNA G+C 含量の解析を行った。系統解析のために、供試菌株から抽出した染色体 DNA から 16S rRNA 遺伝子を PCR にて増幅した後、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。

3-3. 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 50 μl 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、 σ -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。

3-4. 金属腐食微生物ライブラリーの構築

鉄腐食菌の微生物資源ライブラリー構築のために、解析用 PC に ARB をインストールした。SILVA のデータセットを取り込んだ後、約 14 万の 16S rRNA 遺伝子データから、信頼性の高い既知種 12516 株のデータをマニュアルで選定した。残る環境クローンデータや不良データをすべて削除し、これを基礎のデータセットとした。

4. 研究成果

4.1. 新規鉄腐食性細菌 *Prolixibacter denitrificans* の提唱

MIC1-1 株はと MIC1-4 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 35-37°C、pH 7.0-7.4、2-3 % (w/v) であった。また、炭素源 (D-グルコースや有機酸など) を必須に要求し、硝酸塩と酸素を電子受容体に利用できる硝酸塩還元菌であった。電子供与体に金属鉄 (Fe⁰)、第一鉄 (Fe²⁺)、システイン塩酸塩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。主要脂肪酸組成は iso-C15:0 と anteiso-C15:0 であった。DNA G+C 含量は 45 mol% であった。MIC1-1 株と MIC1-4 株の DNA-DNA 相同性は 70-84 % であり、両者は同種の細菌であった。16S rRNA 遺伝子に基づく系統解析を行った結果、MIC1-1 株と MIC1-4 株は、*Bacteroidales* 目の *Prolixibacteraceae* 科に属する *P. bellariivorans* に近縁であったが、その相同性も 97.5 % と低かった (図 1)。分離株 2 株と *P. bellariivorans* JCM 13498^T を比較すると、*P. bellariivorans* JCM 13498^T は硝酸還元を行わない点で性状が異なっていた。この他、細胞の大きさ、生育至適温度、生育温度範囲、生育塩濃度範囲など複数の性状が異なっていた。MIC1-1 株と MIC1-4 株は、形態、生理・生化学性状が *P. bellariivorans* と異なる他、系統的にも離れていたことから、分離株 2 株は *Prolixibacter* 属の新種であることが明らかとなった。MIC1-1 株を基準株として、*Prolixibacter denitrificans* を命名・提唱した。

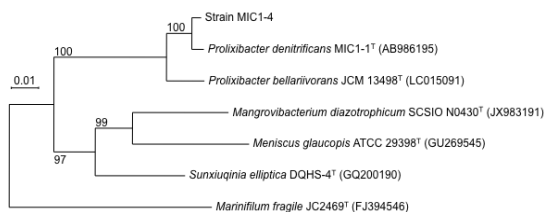


図 1. MIC1-1 株と MIC1-4 株の 16S rRNA 遺伝子塩基配列に基づく系統樹

4.2. 新規鉄還元菌 *Draconibacterium* sp. MIC3-8 株の分類性状の解析

MIC3-8 株は通性嫌気性、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。至適の生育温度、pH、塩濃度はそれぞれ 35-37°C、pH 7.0-7.4、2-4 % (w/v) であった。また、炭素源 (D-グルコースや有機酸など) を必須に要求し、酸素のほか、酸化鉄 (ヘマタイト; Fe₃O₄) を電子受容体に利用できる鉄還元菌であった。電子供与体にシステイン塩酸塩のみを利用し、鉄を利用できなかった。イソプレノイドキノタイプは MK-7 であった。主要脂肪酸組成は iso-C15:0 と anteiso-C15:0 であった。DNA G+C 含量は 41.3 mol% であった。16S rRNA 遺伝子塩基配列に基づく系統解析を行った結果、MIC3-8 株は、*Bacteroidales* 目 *Prolixibacteraceae* 科の *Draconibacterium* 属に含まれ、既存の *Draconibacterium orientale* と *Draconibacterium sediminis* とは、その相同性が 98.1-100 % であった (図 2)。しかし、既存の 2 種とは系統的に独立しており、*Draconibacterium* 属の新種である可能性が高い。今後、MIC3-8 株と近縁種 2 株の DNA-DNA 相同性を明らかにすることで、MIC3-8 株の分類学的位置が明らかになる。

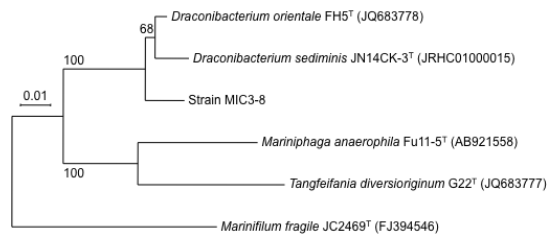


図 2. MIC3-8 株の 16S rRNA 遺伝子塩基配列に基づく系統樹

4.3. 分離株の鉄腐食能の解析

P. denitrificans MIC1-1 株と同種である MIC1-4 株は、硝酸塩 (電子受容体) と酵母エキス (炭素源) 存在下で、無菌区の約 3 倍の鉄イオンを溶出し、鉄腐食を引き起こすことが明らかとなった。MIC1-4 株による鉄腐食時の鉄イオンの割合は、Fe²⁺:Fe³⁺ = 7:3 であった。硝酸塩非存在下では鉄イオンの溶出が生じなかったことから、MIC1-4 株は、MIC1-1 株と同様に硝酸還元を介して、鉄腐食を引き起こすと考えられる。*Prolixibacter* 属唯一の既知種である *P. bellariivorans* JCM 13498^T はいかなる条件でも鉄腐食を起こさなかったことから、*P. denitrificans* MIC1-1 株と MIC1-4 株による鉄腐食は、*Prolixibacter* 属の特徴ではなく、種レベルもしくは菌株個々のレベルの能力と考えられる。

Draconibacterium sp. MIC3-8 株はいかなる条件においても、鉄イオンの溶出は見られなかった。このことから、MIC3-8 株は鉄腐食細菌ではないことが明らかとなった。

4.4. 金属腐食微生物ライブラリーの構築

ARB 上で構築した既知微生物種 12516 株のデータセットに、本研究で発見した *P.*

denitrificans MIC1-1 株と MIC1-4 株、*Draconibacterium* sp. MIC3-8 株の 16S rRNA 遺伝子塩基配列を組み込んだ。

4-5. 総括

原油備蓄基地から純粋分離した 3 株は、2 新種に相当し、一方は鉄腐食性細菌で、もう一方は鉄還元細菌であった。過去の微生物腐食研究では、*Bacteroidales* 目は全く注目されなかったため、本目に属する *Prolixibacter* 属や *Draconibacterium* 属に鉄腐食細菌や鉄還元細菌が見つかったことは非常に興味深い。原油備蓄基地等の環境には、依然として未知の微生物が多数棲息する。今後、さらに新たな微生物株を発見し、金属腐食環境中の金属腐食微生物の生態を把握することが、効果的な防食技術を開発する上で重要である。

一方、金属腐食微生物は系統的に多系統にまたがるため、実環境で金属腐食微生物を発見しても、迅速に同定することは困難である。ARB を用いて、既知種のデータセットを構築したことで、この問題が解消され、迅速な同定が可能となる。今後、新たに発見する金属腐食微生物の 16S rRNA 遺伝子塩基配列データを ARB のデータセットに更新することで、金属腐食微生物の同定や既知金属腐食微生物との系統的関連性の解析を加速化できるものと考えている。

4-5. 参考文献

- Iino, T. et al. (2015) *Appl. Environ. Microbiol.*, 81, 1839.
Sandell, E. B. (1959) *The chemical analysis monography series, vol. 3.*
Uchiyama, T. et al. (2010) *Appl. Environ. Microbiol.*, 76, 1783.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

1. Iino, T., Sakamoto, M., Ohkuma, M. (査読あり) *Prolixibacter denitrificans* sp. nov., an iron-corroding, facultatively aerobic, nitrate-reducing bacterium isolated from crude oil, and emended descriptions of the genus *Prolixibacter* and *Prolixibacter bellariivorans*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 65, 2865-2869, 2015. doi: 10.1099/ijs.0.000343

〔学会発表〕(計 6 件)

1. 飯野隆夫, 伊藤公夫, 大熊盛也. 原油からの *Prolixibacter denitrificans* の分離および鉄腐食能の解析. 日本微生物資源学会, 2016 年 7 月 6 日, 千葉大学けやき会館・千葉市・千葉県
2. 飯野隆夫, 伊藤公夫, 大熊盛也. 原油からの鉄腐食性硝酸塩還元菌 *Prolixibacter denitrificans* の分離. 材料と環境 2016, 2016 年 5 月 25 日, つくば国際会議場・つくば市・茨城県
3. 飯野隆夫. 嫌気環境下で金属腐食を引き

起こす硝酸塩還元菌 *Prolixibacter denitrificans*. 日本鉄鋼協会, 2016 年 3 月 24 日, 東京理科大学 葛飾キャンパス・葛飾区・東京都

4. 飯野隆夫, 伊藤公夫, 坂本光央, 大熊盛也. 鉄腐食を引き起こす水素非還元性硝酸塩還元菌 *Prolixibacter denitrificans*. 日本微生物資源学会, 2015 年 9 月 11 日, とりぎん文化会館・鳥取市・鳥取県

5. 飯野隆夫, 森浩二, 伊藤隆, 工藤卓二, 鈴木健一郎, 大熊盛也. *Bacteroidales* 目に属する鉄腐食細菌およびその関連菌の分離. 環境微生物系学会合同大会 2014, 2014 年 10 月 6 日, 浜松アクトシティコンgresセンター・浜松市・静岡県

6. 飯野隆夫, 森浩二, 伊藤隆, 工藤卓二, 鈴木健一郎, 大熊盛也. *Bacteroidales* 目に属する鉄腐食細菌およびその関連菌. 日本微生物資源学会, 2014 年 9 月 4 日, 東京農業大学・世田谷区・東京都

〔図書〕(計 1 件)

1. 飯野隆夫 シーエムシー出版, 難培養微生物研究の最前線 III, 第 19 章 微生物腐食: 微生物による金属腐食. 10 ページ (P. 175-184), (2015).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

飯野 隆夫 (Takao Iino)

国立研究開発法人理化学研究所・バイオリソースセンター・研究員

研究者番号: 50550323