

微生物に起因する金属腐食メカニズムの解明を可能とする評価基盤技術の開発

秋田 紘長

産業技術総合研究所機能化学研究部門

概要 細菌は、環境に適応して増殖する。金属表面上に細菌が付着した場合、時間経過と共にマイクロコロニーが形成され、マイクロコロニーの発達によりバイオフィームが発生する。橋梁や洋上風力発電設備、外航船等の海洋環境下にあるインフラの製造には金属が使用されており、金属表面上に発生したバイオフィームが時間経過と共に発達し、金属腐食の原因となる細菌の相対存在量が増加すると、金属表面から細菌への電子移動に伴う金属酸化や腐食性代謝産物の蓄積が進行し、最終的に金属腐食が発生する。海洋インフラにおける金属腐食の約 20%はバイオフィームに起因すると推定されており、世界中で大きな経済的損失をもたらしている。これらの問題を踏まえて、申請者は、「バイオフィーム発生前の金属表面上に生育する細菌群集の構造を解明すれば、バイオフィーム発生を防ぐためのガイドラインを策定でき、ガイドラインの利用により金属腐食の発生を抑えることで海洋インフラの使用年数を延長できるのではないかと考えた。そこで本研究では、バイオフィーム予防・制御のためのガイドライン策定の予備検討として、二種類のサンプルを対象に菌叢解析を実施した。まず、係留リング上に発生したバイオフィームを解析対象とし、腐食が発生していない金属から採取したバイオフィームの細菌群集に関する知見を得ることを目的とした。一方、バイオフィームと腐食が発生していない金属片を加えた集積培養物を対象に解析し、低栄養源培地を利用した集積培養を伴う菌叢解析が可能か判断することを目的とした。

バイオフィームを対象に解析した場合、*Alkanindiges* 属細菌が優占種として存在し、相対存在量は 95%以上だった。*Alkanindiges* 属細菌以外に *Sphingomonas* 属細菌や属細菌等も観測されたが、これら細菌の相対存在量は 3%未満であった。*Alkanindiges* 属細菌のゲノム内には金属表面から電子の吸収に必須な遺伝子や遺伝子クラスターが存在しないことから、*Alkanindiges* 属細菌は金属腐食を引き起こさず、バイオフィーム発生に関与していると唆された。

集積培養物を対象に解析した場合、炭酸カリウムを単一炭素源に調製した合成培地を集積培養に利用して、金属片上に生育する細菌群を検出可能なレベルまで増殖できることを実証した。析対象とした金属片には、 α -プロテオバクテリアや β -プロテオバクテリア、 γ -プロテオバクテリア、スフィンゴバクテリア等の細菌が混在し、環境ストレスによって生育が阻害されず、外部から栄養源を獲得できれば、*Sphingomonas* 属細菌や *Methylobacterium* 属細菌、*Pseudomonas* 属細菌等の作用によりバイオフィームが発生すると推察された。

1. 研究目的

細菌は、環境に適応して増殖する。金属表面上に細菌が付着した場合、時間経過と共にマイクロコロニーが形成され、マイクロコロニーの発達によりバイオフィームが発生する。バイオフィームは、細胞外高分子物質(EPS)マトリックスに含まれた三次元構造を有する複合体である¹⁾。バイ

オフィーム内部では、細胞外マトリックスタンパク質や外来遺伝子が EPS マトリックスを介して輸送され、細菌の増殖を促す¹⁾。発達したバイオフィームは、EPS マトリックスの細胞外多糖類を介して金属表面上に強固に接着するため、完全除去が困難である。また、EPS マトリックスの作用により、バイオフィーム内の細菌群は環境変化や化学物

質等によるストレスから保護されるため、増殖に適した環境が構築される。

橋梁や洋上風力発電設備、外航船等の海洋環境下にあるインフラの製造にはステンレス等の金属が使用されている。それら金属表面上に発生したバイオフィームが時間経過と共に発達し、金属腐食の原因となる細菌の相対存在量が増加すると、金属表面から細菌への電子移動に伴う金属酸化²⁾や腐食性代謝産物の蓄積³⁾が進行し、最終的に金属腐食が発生する。海洋インフラに影響を及ぼす金属腐食の約20%はバイオフィームに起因すると推定されており⁴⁾、世界中で大きな経済的損失をもたらしている。近年では、炭素鋼⁵⁾、ステンレス鋼⁶⁾、低合金鋼⁷⁾を対象に、金属腐食の原因となる細菌群の解析が報告されている。これらの報告では、*Bacillus*属細菌や*Desulfobacter*属細菌、*Desulfovibrio*属細菌等が優占種として検出され、金属腐食への関与が考察されている。一方、腐食発生前の金属から採取したバイオフィームを対象とした菌叢解析はほとんど実施されておらず、明らかにされた菌叢は僅かである。また、腐食が発生していない鉄鋼⁸⁾やステンレス^{9, 10)}を対象とした集積培養を伴う菌叢解析が報告されているが、培養には有機酸や糖、酵母エキスを添加しているため、海洋環境とは栄養条件が異なる。つまり、これらの解析は実環境とは異なるサンプルを対象にしており、より正確に解析するためには、海洋環境と組成が類似した低栄養培地を用いて集積培養を行う必要がある。申請者は、金属腐食発生前のバイオフィームまたはバイオフィーム発生前の菌叢を明らかにできれば、バイオフィーム予防・制御のためのガイドラインを策定でき、ガイドラインの活用により細菌による金属腐食を未然に防ぐことができると考えた。

申請当初、安定同位体標識された窒素源を含む合成培地に腐食が発生した金属片を加えて集積培養し、集積培養物から調製した安定同位体含有ゲノムDNAを対象に菌叢解析することを計画していた。実際に、¹⁵N標識塩化アンモニウムを含む合成培地に腐食が発生した金属片を加えて集積培養したが、集積培養物から安定同位体含有ゲノムDNAを調製できなかった。そこで本研究では、バイオフィーム予防・制御のためのガイドライン策定の予備検討として、二種類のサンプルを解析対象に変更して菌叢解析を実施した。まず、係留リング上に発生したバイ

オフィームを解析対象とし、腐食が発生していない金属から採取したバイオフィームの細菌群集に関する知見を得ることを目的とした。一方、バイオフィームと腐食が発生していない金属片を加えて集積培養した培養物を対象に解析し、低栄養源培地を利用した集積培養を伴う菌叢解析が可能か判断することを目的とした。

2. 研究方法

2.1 サンプリング

金属腐食が発生していない係留リング（ステンレス鋼SUS304製）上に発生したバイオフィーム（Fig. 1）と、バイオフィームと腐食が発生していない金属片（ステンレス鋼SUS304製）を安芸津港（広島県東広島市）でそれぞれ採取し、本研究の解析対象に用いた。サンプリング当日の気温は20°C前後で、サンプリング前1週間は降水がなかった。採取した各サンプルは滅菌チューブに入れ、直ちに4°Cのクールボックスで保管し、数時間以内に研究室に輸送した。



Fig. 1 Image of the sampling point.

The sampling point for the collection of the biofilm is indicated by a black arrow. The sampling point is the contact site between metal joint and metal dock. Brown stains were observed at the sampling point, but no corrosion was observed.

2. 2 集積培養

採取した金属片を合成培地 (pH: 7.0; 組成: 3.0 g/L NaCl, 1.7 g/L Na₂HPO₄•12H₂O, 1.0 g/L K₂CO₃, 0.3 g/L KH₂PO₄, 0.1 g/L NH₄Cl, 0.024 g/L MgSO₄•7H₂O, 0.0011 g/L CaCl₂•2H₂O) に加え, 培養温度 25°C で 24 時間培養した。

細胞の増殖は, 細胞性濁度と無細胞性濁度の差 (Δ OD600 値) に基づいて評価した。濁度は, Eppendorf Bio Spectrometer (Eppendorf) を用いて測定した。

2. 3 菌叢解析

バイオフィームまたは集積培養物からのゲノム DNA は, illustra™ bacteria genomicPrep Mini Spin Kit (GE Healthcare) を用いて調製した。ゲノム DNA の濃度と純度は, NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific) を用いて測定した。次に, 調製した各ゲノム DNA を鋳型に利用して, 16S rRNA 遺伝子の V3-V4 可変領域をプライマー-341F と 805R を用いて増幅した。さらに, 1.0%アガロースゲルを用いた電気泳動により PCR 産物の鎖長を確認後, Wizard SV Gel and PCR Clean-up System (Promega) を用いて精製し, 精製物を菌叢解析用ライブラリー調製に用いた。

菌叢解析用ライブラリーは, Nextera XT DNA Library Preparation Kit (Illumina) を用いて調製した。Quanti Fluor™ dsDNASystem (Promega) を用いてライブラリー濃度を測定後, MiSeq Reagent Kit v3 (Illumina) と MiSeq シーケンサー (Illumina) を用いてライブラリーの塩基配列を解読した。

菌叢は, QIIME2 を用いて解析した¹¹⁾。DADA2 モデルを用いて解読データをフィルタリングし, 16S rRNA 遺伝子の相同性が 99%以上の細菌を同一の菌種 (Operational taxonomic unit: OTU) としてクラスリングした¹²⁾。さらに, Sliva データベースを参照し, 各 OTU の属名を同定した¹³⁾。

2. 4 系統解析

OTU に基づいた系統樹は, MEGA11 を用いて Neighbor-joining 法により作成した¹⁴⁾。

3. 研究結果

3. 1 バイオフィームを対象とした菌叢解析

採取した種々のバイオフィームからゲノム DNA を調製し, 最も濃度が高いサンプル (122 ng/ μ L) を解析対象に選定した。調製したゲノム DNA を鋳型に利用して PCR を試みたところ, プライマー-341F と 805R を用いて 16S rRNA 遺伝子の V3-V4 可変領域は増幅できた。一方, 種々の真核微生物用ユニバーサルプライマーを用いた場合, 真核微生物のハウスキーピング遺伝子は増幅できなかった。増幅した V3-V4 可変領域に基づいて菌叢を解析した結果, 18 属の細菌が観測され, 未分類細菌の割合は 0.1% 未満だった (Fig. 2)。採取したバイオフィームでは *Alkanindiges* 属細菌が優占種として存在し, 相対存在量は 95% 以上だった。*Alkanindiges* 属細菌以外に *Sphingomonas* 属細菌や *Pseudomonas* 属細菌等も観測されたが, これら細菌の相対存在量は 3% 未満であった。

1%以上の相対存在量を示した細菌の系統関係を明らかにするため, 16S rRNA 遺伝子の V3-V4 可変領域に基づいて系統樹を作成した (Fig. 3)。系統樹の樹形より, 9 種類の *Alkanindiges* 属細菌はクラスターを形成し, 最類縁種は *Alkanindiges hongkongensis* HKU9^T であった (Table 1)。

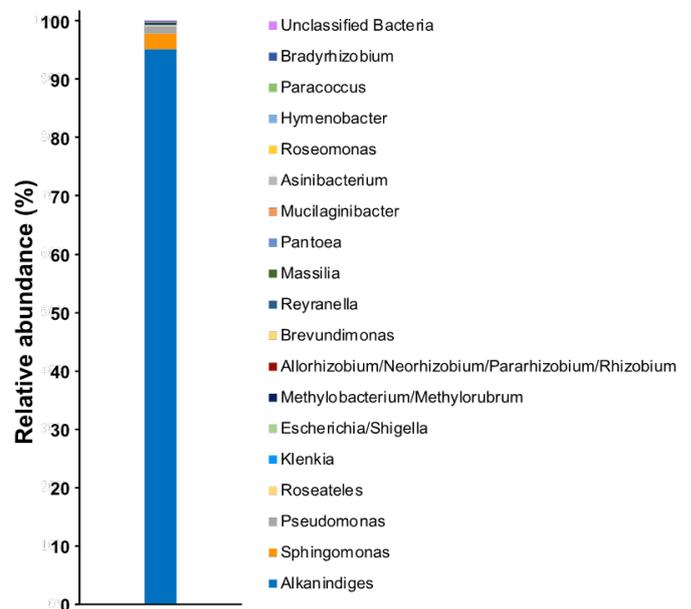


Fig. 2 Relative abundances of the bacterial community in the biofilm at the genus level.

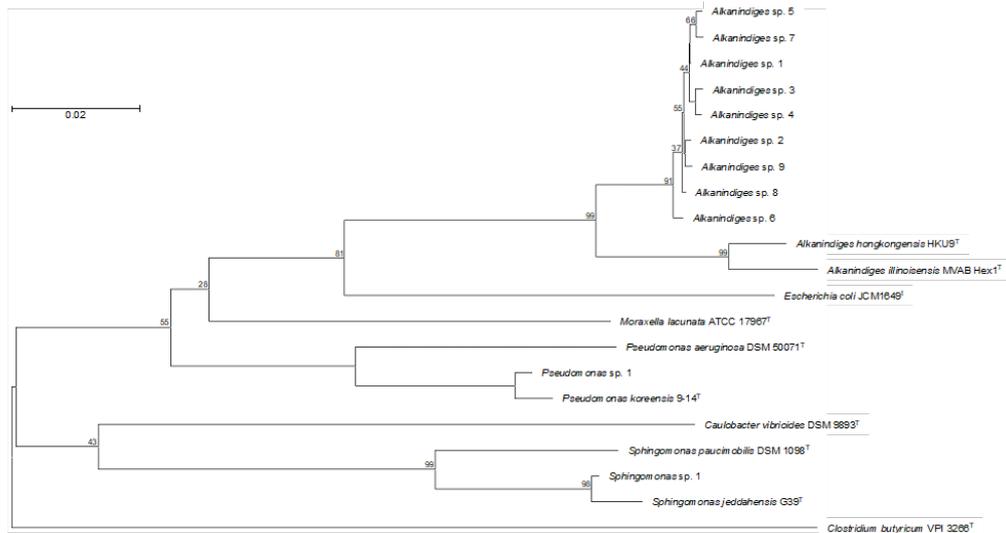


Fig. 3 Consensus bootstrap phylogenetic tree of OTUs observed in the biofilm comprising more than 1% of the total 16S rRNA gene sequences.

Each OTU is denoted by its representative type strain. The numbers at the nodes are percentages indicating the levels of bootstrap support based on neighbor-joining analysis of 1000 resampled datasets.

Table 1 Bacteria with more than 1% of OTUs observed in the biofilm.

Strain	Closest relative		Accession No.	Identity (%)	Relative abundance (%)
	Class	Species			
<i>Alkanindiges</i> sp. 1	γ -Proteobacteria	<i>Alkanindiges hongkongensis</i> HKU9 ^T	NR_115178.1	97.4	17
<i>Alkanindiges</i> sp. 2	γ -Proteobacteria	<i>Alkanindiges hongkongensis</i> HKU9 ^T	NR_115178.1	97.4	15
<i>Alkanindiges</i> sp. 3	γ -Proteobacteria	<i>Alkanindiges hongkongensis</i> HKU9 ^T	NR_115178.1	97.4	12
<i>Alkanindiges</i> sp. 4	γ -Proteobacteria	<i>Alkanindiges hongkongensis</i> HKU9 ^T	NR_115178.1	97.6	10
<i>Alkanindiges</i> sp. 5	γ -Proteobacteria	<i>Alkanindiges hongkongensis</i> HKU9 ^T	NR_115178.1	97.6	10
<i>Alkanindiges</i> sp. 6	γ -Proteobacteria	<i>Alkanindiges hongkongensis</i> HKU9 ^T	NR_115178.1	97.6	10
<i>Alkanindiges</i> sp. 7	γ -Proteobacteria	<i>Alkanindiges hongkongensis</i> HKU9 ^T	NR_115178.1	97.4	9
<i>Alkanindiges</i> sp. 8	γ -Proteobacteria	<i>Alkanindiges hongkongensis</i> HKU9 ^T	NR_115178.1	97.6	6
<i>Alkanindiges</i> sp. 9	γ -Proteobacteria	<i>Alkanindiges hongkongensis</i> HKU9 ^T	NR_115178.1	97.4	5
<i>Sphingomonas</i> sp. 1	γ -Proteobacteria	<i>Sphingomonas jeddahensis</i> G39 ^T	NR_158139.1	99.1	2
<i>Pseudomonas</i> sp. 1	γ -Proteobacteria	<i>Pseudomonas koreensis</i> Ps 9-14 ^T	NR_025228.1	99.1	1

3. 2 集積培養物を対象とした菌叢解析

金属片上に生育する細菌数が少ないため、金属片から直接ゲノム DNA を調製できなかつた。また、フィルター滅菌した海水や人工海水を培地に用いたが、細菌の増殖は確認できなかつた。そこで、金属片上に生育する細菌を増殖させるため、低濃度の栄養源を含む合成培地を用

いて集積培養した。集積培養後、 Δ OD600 値が 0.1 程度まで上昇し、集積培養物からゲノム DNA を調製できた。調製したゲノム DNA を用いて 16S rRNA 遺伝子の V3-V4 可変領域を増幅し、菌叢を解析した。

増幅した V3-V4 可変領域に基づいて菌叢を解析した結果、80 属以上の細菌が観測され (Fig. 4) 以下の細菌が

1%以上の相対存在量を示した;*Sphingomonas* 属 (44%), *Methylobacterium/Methylorubrum* 属 (9.4%), *Mucilaginibacter* 属 (4.9%), *Massilia* 属 (4.8%), *Pseudomonas* 属 (4.1%), *Hymenobacter* 属 (2.9%), *Alkanindiges* 属 (1.3%), *Chroococciopsis* 属 (1.2%)。これら細菌の系統関係を明らかにするため、16S rRNA 遺伝子の V3-V4 可変領域に基づいて系統樹を作成した結果、*Sphingomonas* sp. や *Methylobacterium* sp. 等の α -プロテオバクテリア、*Massilia* sp. 等の β -プロテオバクテリア、*Pseudomonas* sp. や *Alkanindiges* sp. 等の γ -プロテオバクテリア、*Mucilaginibacter* sp. 等のスフィンゴバクテリアが観測された (Fig. 5)。特に、*Sphingomonas* sp. 株は *S. kyungheensis* THG-B283^T と *S. hankookensis* ODN7^T と共にクラスターを形成し、*S. kyungheensis* THG-B283^T と 97.6-99.1%の相同性を示した (Table 2)。

4. 考察

4.1 バイオフィルムの菌叢構造

Alkanindiges 属細菌は γ -プロテオバクテリアに属し、石油が分解して生じる数種の炭化水素を資化して増殖できるため¹⁵⁾、石油汚染土壌のバイオレメディエーションに利用されている¹⁶⁻¹⁸⁾。これは、*Alkanindiges* 属細菌が *Acinetobacter* 属細菌と同様に、細胞表面の高い疎水性を利用して炭化水素を特異的に吸着することに起因する¹⁹⁾。また *Alkanindiges* 属細菌は、活性汚泥等の栄養源の乏しい好気性環境に適応し、他の菌種に比べて優位に増殖する¹⁹⁾。

細菌による金属腐食の詳細な分子メカニズムは未だ不明だが、細菌による金属表面からの電子の吸収は数例実証されている。例えば、*Pseudomonas aeruginosa* MCCC 1A00099 は、*phzH* 遺伝子の発現により水溶性の電子伝達メディエーター分子であるフェナジン-1-カルボキサミドを生産する²⁰⁾。フェナジン-1-カルボキサミドにより活性化された細胞外電子伝達経路を利用して、*P. aeruginosa* MCCC 1A00099 が金属表面から電子を吸収し、金属腐食が発生する²⁰⁾。*Methanococcus maripaludis* OS7 のゲノム内では、[NiFe]ヒドロゲナーゼのサブユニット (MMOS7_11590, MMOS7_11600)、[NiFe]ヒドロゲナーゼ分泌膜タンパク質 (MMOS7_11620, MMOS7_11630)、ヒドロゲナーゼ成熟タンパク質 (MMOS7_11610) をコードする各遺伝子が遺伝子クラスターを形成する²¹⁾。*M.*

maripaludis OS7 は鉄を腐食するが、遺伝子クラスター欠失株は鉄を腐食しない。*Alkanindiges* 属細菌のゲノム内には、MMOS7_11620 と MMOS7_11630 を除き、上述の遺伝子クラスターや *phzH* 遺伝子が存在しない。以上のことから、*Alkanindiges* 属細菌は金属腐食を引き起こさず、バイオフィルム発生に関与することが示唆された。また、採取地点周辺の環境は *Alkanindiges* 属細菌の生育に大きな影響を与えないため、*Alkanindiges* 属細菌を優占種とするバイオフィルムが発生したと推察された。なお、申請者が知る限り、金属表面から採取したバイオフィルムを対象に菌叢解析した場合、 γ -プロテオバクテリアが 90%以上の相対存在量を示す報告はあるが²²⁾、*Alkanindiges* 属細菌が 90%以上の相対存在量を示す報告はない。

4.2 集積培養物の菌叢構造

集積培養法は、環境試料中に含まれる細菌群のうち、特定の細菌の存在量を高めるために用いられる。本法では、対象とする細菌の増殖を促すように培養条件を設定することで、検出可能なレベルまで増殖できる。LB 培地やブイオン培地は栄養源を豊富に含むため、易培養性細菌の培養に適しており、応用微生物学や分子微生物学の実験に広く利用されている。一方、環境細菌の多くは、高栄養源によるストレスにより生育が著しく阻害されるため、培地の栄養源を低くする必要がある²³⁾。そこで本研究では、炭酸カリウムを単一炭素源に調製した合成培地を集積培養に利用して、金属片上に生育する細菌を検出可能なレベルまで増殖できることを実証した。

優占種として観測された *Sphingomonas* 属細菌は種々の炭化水素を資化して増殖可能なことから、淡水や海水、土壌等の様々な環境で生育し、バイオフィルムからも単離・同定されている^{24, 25)}。集積培養物からは、*Sphingomonas* 属細菌の以外に、*Methylobacterium* 属細菌²⁶⁾ や *Pseudomonas* 属細菌²⁷⁾ 等のバイオフィルム形成能を有する細菌も観測された (Fig. 5)。以上の結果から、解析対象とした金属片には、 α -プロテオバクテリアや β -プロテオバクテリア、 γ -プロテオバクテリア、スフィンゴバクテリア等の細菌が混在し、環境ストレスにより生育が阻害されず、外部から栄養源を獲得できれば、*Sphingomonas* 属細菌や *Methylobacterium* 属細菌、*Pseudomonas* 属細菌等の作用によりバイオフィルムが発生すると推察された。

5. 今後の課題

本研究では、係留リング上に発生したバイオフィームと、バイオフィームと腐食が発生していない金属片を加えた集積培養物を対象に菌叢解析を行った。バイオフィームを対象に解析する場合、バイオフィーム内の菌叢変化と腐食の進行を経時的に解析することで、金属腐食の発生

メカニズムの詳細を明らかにできる。集積培養物を対象に解析する場合、培養対象となるサンプルの種類と培養条件（培地組成や培養温度・pH）の相関が菌叢の変化にどのように影響するか明らかにすることで、バイオフィーム予防・制御のためのガイドラインの精度を向上できる。

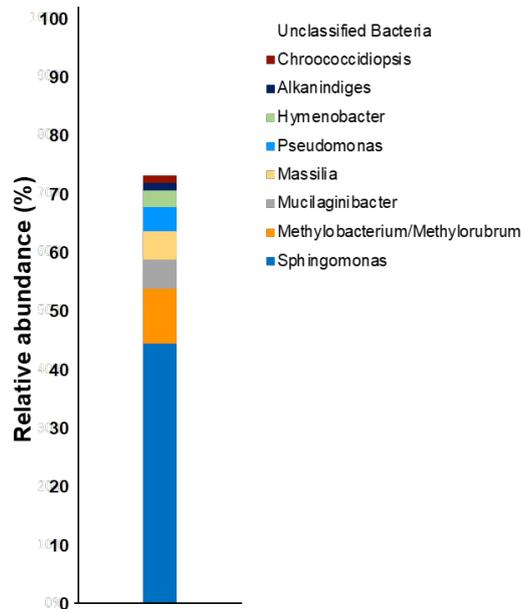


Fig. 4 Relative abundances of the bacterial community in the culture sample at the genus level.

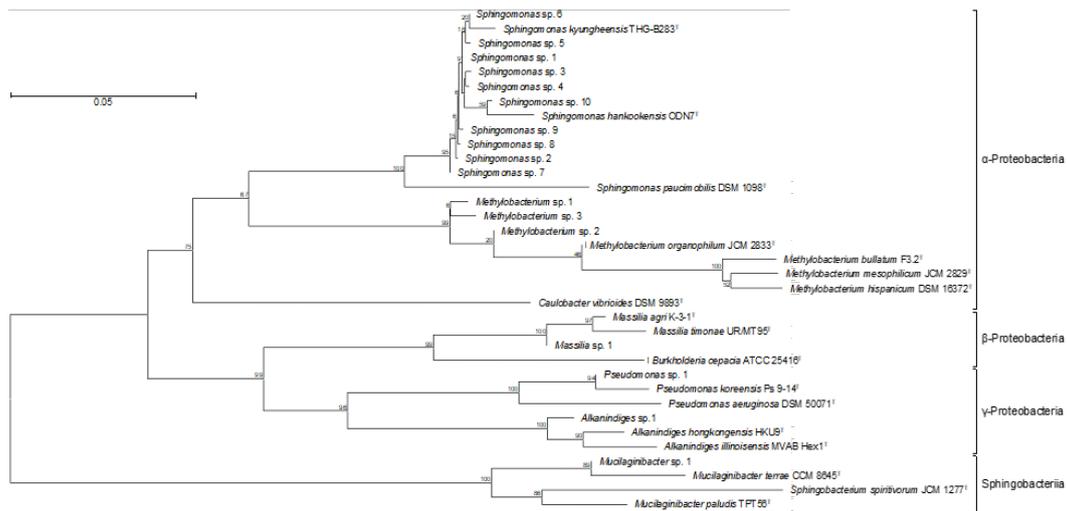


Fig. 5 Consensus bootstrap phylogenetic tree of OTUs observed in the culture sample more than 1% of the total 16S rRNA gene sequences.

Each OTU is denoted by its representative type strain. The numbers at the nodes are percentages indicating the level of bootstrap support based on a neighbor-joining analysis of 1000 resampled datasets.

Table 2 Bacteria with more than 1% of OTUs observed in the culture sample.

OTU	Closest relative		Accession no.	Identity (%)	Relative abundance (%)
	Class	Species			
<i>Sphingomonas</i> sp. 1	α -Proteobacteria	<i>Sphingomonas kyungheensis</i> THG-B283 ^T	NR_118263	99.1	7.1
<i>Sphingomonas</i> sp. 2	α -Proteobacteria	<i>Sphingomonas kyungheensis</i> THG-B283 ^T	NR_118263	99.1	5.6
<i>Sphingomonas</i> sp. 3	α -Proteobacteria	<i>Sphingomonas kyungheensis</i> THG-B283 ^T	NR_118263	99.1	4.8
<i>Sphingomonas</i> sp. 4	α -Proteobacteria	<i>Sphingomonas kyungheensis</i> THG-B283 ^T	NR_118263	99.3	4.6
<i>Mucilaginibacter</i> sp. 1	Sphingobacteria	<i>Mucilaginibacter terrae</i> CCM 8645 ^T	NR_158094	99.7	4.3
<i>Sphingomonas</i> sp. 5	α -Proteobacteria	<i>Sphingomonas kyungheensis</i> THG-B283 ^T	NR_118263	97.6	4.2
<i>Sphingomonas</i> sp. 6	α -Proteobacteria	<i>Sphingomonas kyungheensis</i> THG-B283 ^T	NR_118263	99.1	4.0
<i>Methylobacterium</i> sp. 1	α -Proteobacteria	<i>Methylobacterium mesophilicum</i> JCM 2829 ^T	NR_115550	99.1	3.7
<i>Pseudomonas</i> sp. 1	γ -Proteobacteria	<i>Pseudomonas koreensis</i> Ps 9-14 ^T	NR_025228	99.1	3.5
<i>Sphingomonas</i> sp. 7	α -Proteobacteria	<i>Sphingomonas kyungheensis</i> THG-B283 ^T	NR_118263	99.3	3.1
<i>Sphingomonas</i> sp. 8	α -Proteobacteria	<i>Sphingomonas kyungheensis</i> THG-B283 ^T	NR_118263	99.3	2.4

6. 文 献

- L. Karygianni, Z. Ren, H. Koo, T. Thurnheer, Biofilm matrixome: extracellular components in structured microbial communities. *Trends Microbiol.* 28, 668–681 (2020)
- L. Meiyang, D. Min, A review: microbiologically influenced corrosion and the effect of cathodic polarization on typical bacteria. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 17, 431–446 (2018)
- R. Ji, T. Unsal, D. Xu, Y. Lekbach, T. Gu, Microbiologically influenced corrosion and current mitigation strategies: A state of the art review. *Int. Biodeterior. Biodegradation* 137, 42–58 (2019)
- B. J. Little, J. S. Lee, *Microbiologically Influenced Corrosion*, John Wiley and Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, (2007)
- I. Lanneluc, M. Langumier, R. Sabot, M. Jeannin, P. Refait, S. Sablé, On the bacterial communities associated with the corrosion product layer during the early stages of marine corrosion of carbon steel. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 99, 55–65 (2015)
- A. Capão, P. Moreira-Filho, M. Garcia, S. Bitati, L. Procópio, Marine bacterial community analysis on 316L stainless steel coupons by Illumina MiSeq sequencing. *Biotechnol. Lett.* 42, 1431–1448 (2020)
- X. Li, J. Duan, H. Xiao, Y. Li, H. Liu, F. Guan, X. Zhai, Analysis of bacterial community composition of corroded steel immersed in sanya and xiamen seawaters in china via method of illumina MiSeq sequencing. *Front. Microbiol.* 8, 1737 (2017)
- X. Guangfeng, Z. Xiaodong, W. Shuai, Y. Jie, S. Jie, A. Zhongyi, L. Yan, Q. Xinlei, Synergistic effect between sulfate-reducing bacteria and *Pseudomonas aeruginosa* on corrosion behavior of Q235 steel. *Int. J. Electrochem. Sci.* 15, 361–370 (2020)
- T. T. T. Tran, K. Kannoopatti, A. Padovan, S. Thennadil, A study of bacteria adhesion and microbial corrosion on different stainless steels in environment containing *Desulfovibrio vulgaris*. *R. Soc. Open Sci.* 8, 201577 (2021)
- J. Prasanna, C. Rosalie, S. Sun, S. Martin, C. Florentin, W. L. Sudesh, T. Dominique, B. J. Daniel, M. Diane, R.

- A. Scott, M. Enrico, Onset of microbial influenced corrosion (MIC) in stainless steel exposed to mixed species biofilms from equatorial seawater, *J. Electrochem. Soc.* 164, C532–C538 (2017)
11. E. Bolyen, J. R. Rideout, M. R. Dillon, N. A. Bokulich, C. C. Abnet et al., Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nat. Biotechnol.* 37, 852–857 (2019)
 12. B. J. Callahan, P. J. McMurdie, M. J. Rosen, A. W. Han, A. J. Johnson, S. P. Holmes, DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat. Methods* 13, 581–583 (2016)
 13. C. Quast, E. Pruesse, P. Yilmaz, J. Gerken, T. Schweer, P. Yarza, J. Peplies, F. O. Glöckner, The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res.* 41, D590–6 (2013)
 14. K. Tamura, G. Stecher, S. Kumar S, MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11. *Mol. Biol. Evol.* 38, 3022–3027 (2021)
 15. B. W. Bogan, W. R. Sullivan, K. J. Kayser, K. D. Derr, H. C. Aldrich, J. R. Paterek, *Alkanindiges illinoisensis* gen. nov., sp. nov., an obligately hydrocarbonoclastic, aerobic squalane-degrading bacterium isolated from oilfield soils. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53, 1389–1395 (2003)
 16. J. Zheng, J. Q. Feng, L. Zhou, S. M. Mbadinga, J. D. Gu, B. Z. Mu, Characterization of bacterial composition and diversity in a long-term petroleum contaminated soil and isolation of high-efficiency alkane-degrading strains using an improved medium. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 34, 34 (2018)
 17. L. Vergeynst, C. W. Greer, A. Mosbech, K. Gustavson, L. Meire, K. G. Poulsen, J. H. Christensen, Biodegradation, photo-oxidation, and dissolution of petroleum compounds in an arctic fjord during summer. *Environ. Sci. Technol.* 53, 12197–12206 (2019)
 18. J. Liang, S. Gao, Z. Wu, H. H. M. Rijnaarts, T. Grotenhuis, DNA-SIP identification of phenanthrene-degrading bacteria undergoing bioaugmentation and natural attenuation in petroleum-contaminated soil. *Chemosphere.* 266, 128984 (2021)
 19. A. N. Klein, D. Frigon, L. Raskin, Populations related to *Alkanindiges*, a novel genus containing obligate alkane degraders, are implicated in biological foaming in activated sludge systems. *Environ. Microbiol.* 9, 1898–1912 (2007)
 20. Y. Huang, E. Zhou, C. Jiang, R. Jia, S. Liu, D. Xu, T. Gu, F. Wang, Endogenous phenazine-1-carboxamide encoding gene PhzH regulated the extracellular electron transfer in biocorrosion of stainless steel by marine *Pseudomonas aeruginosa*. *Electrochem. commun.* 94, 9–13 (2018)
 21. H. Tsurumaru, N. Ito, K. Mori, S. Wakai, T. Uchiyama et al., An extracellular [NiFe] hydrogenase mediating iron corrosion is encoded in a genetically unstable genomic island in *Methanococcus maripaludis*. *Sci. Rep.* 8, 15149 (2018)
 22. A. Capão, P. Moreira-Filho, M. Garcia, S. Bitati, L. Procópio, Marine bacterial community analysis on 316L stainless steel coupons by Illumina MiSeq sequencing. *Biotechnol. Lett.* 42, 1431–1448 (2020)
 23. H. Akita, Z.I. Kimura ZI, A simple method for the screening, isolation, and identification of novel bacteria. in press (2022)
 24. D. C. White, S. D. Sutton, D. B. Ringelberg, The genus *Sphingomonas*: physiology and ecology. *Curr. Opin. Biotechnol.* 7, 301–306 (1996)
 25. M. G. Waigi, K. Sun, Y. Gao, Sphingomonads in microbe-assisted phytoremediation: tackling soil pollution. *Trends Biotechnol.* 35, 883–899 (2017)
 26. T. Yano, H. Kubota, J. Hanai, J. Hitomi, H. Tokuda, Stress tolerance of *Methylobacterium* biofilms in bathrooms. *Microbes Environ.* 28, 87–95 (2013)
 27. J. Masák, A. Čejková, O. Schreiberová, T. Režanka, *Pseudomonas* biofilms: possibilities of their control. *FEMS Microbiol. Ecol.* 89, 1–14 (2014)

Development of Basic Assessment Method for Elucidation of Metal Corrosion Mechanisms Caused by Microorganisms

Hironaga Akita

Research Institute for Sustainable Chemistry, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST)

Summary

Biofilms are biological membranes enclosed in a matrix composed of polymeric substances produced by multiple species of microorganisms. When microorganisms adhere to the metal surfaces of infrastructure in the marine environment, biofilms form on the metal surfaces. Metal corrosion of marine infrastructure caused by biofilms is responsible for approximately 20% of metal corrosion affecting the marine infrastructure, resulting in significant economic losses due to rising maintenance costs. Thus, metal corrosion is a global problem. Based on the problem, I hypothesized that guidelines to prevent and control biofilm formation on metal surfaces of marine infrastructure could be established if the structure of the bacterial community on metal surfaces could be characterized before biofilm formation. Moreover, the lifetime of marine infrastructure might be extended if such guidelines could reduce the occurrence of metal corrosion. In this study, as a preliminary study for developing guidelines for biofilm prevention and control, bacterial community analysis was performed on two types of samples. First, biofilms formed on mooring rings were analyzed to obtain information on the bacterial community of biofilms collected from metal without corrosion. On the other hand, the bacterial community analysis was also performed to determine if it is possible to analyze the bacterial community of the enrichment culture with a metal piece using a low nutrient source medium.

When bacterial community analysis was performed on the biofilms, a total of 18 of genera bacteria were observed, and *Alkanindiges* bacteria were observed as the dominant species, and their relative abundance was more than 95%. Apart from *Alkanindiges*, several bacteria such as *Sphingomonas* and *Pseudomonas* were also observed as OTUs, but the relative abundances of those bacteria were less than 3%. In the genomes of *Alkanindiges* bacteria, the gene and the gene cluster related to metal corrosion is not present, which indicated that *Alkanindiges* bacteria act in the formation of biofilms before the occurrence of metal corrosion.

When bacterial community analysis was performed on the enrichment culture, the bacterial community before biofilm formation contains a mixture of bacteria such as α -Proteobacteria, β -Proteobacteria, γ -Proteobacteria and *Sphingobacteria*. Moreover, biofilm formation may occur by the increase of the relative abundance of *Sphingomonas*, *Methylobacterium* and *Pseudomonas* species, if the growth is not inhibited by environmental stresses and external sources of nutrients can be obtained.