

# 微生物誘起腐食を未然に防ぐガイドラインの策定

秋田 紘長

日本大学生産工学部

## 概要

橋梁や洋上風力発電設備等の海洋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。細菌が金属表面上に付着後、海洋環境に適応した細菌がバイオフィルムを形成した場合、時間経過に伴いバイオフィルムに内在する金属腐食の原因となる細菌の相対存在量が増大し、金属腐食が発生する。金属腐食の発生は、使用期間の短縮によるランニングコストの増大を招き、世界中で 60 兆円以上の経済的損失を引き起こしているため、海水に接する鋼材には腐食対策が不可欠である。前回採択された研究では、金属腐食が発生していない係留リング上に発生したバイオフィルム、バイオフィルムと腐食が発生していない金属片を利用した集積培養物を対象に菌叢解析を実施し、金属腐食の原因となる細菌が含まれないことを明らかにした。これは、バイオフィルム形成から金属腐食発生までの一連の過程で、バイオフィルム内の菌叢が大幅に変化し、金属腐食の原因となる細菌の相対存在量の増大とともに金属腐食が発生することを示す。そこで本研究では、「海洋インフラを対象とした微生物誘起腐食を未然に防ぐガイドラインの策定」に必要な知見を得るため、学術的な知見が不足している河川－汽水－海洋系における菌叢の変化に焦点を当てて、海洋環境下に移行するにつれてバイオフィルム形成に作用する細菌種がどのように変化するか解析した。

印旛放水路(印旛沼-東京湾)の6箇所環境水をサンプリング後、各種環境水と金属片を10% R2A 培地に加えて静置培養し、金属片上にバイオフィルムを形成させた。続いて、バイオフィルムを洗菌後、菌叢解析を実施した。東京湾で採取した環境水を用いて調製したバイオフィルムを対象に菌叢解析した場合、*Agrobacterium* 属、*Bacillus* 属および *Ralstonia* 属の各種細菌が同定された。一方、それ以外のバイオフィルムから同定された *Comamonas* 属、*Caulobacter* 属、*Pedobacter* 属および *Hydrogenophaga* 属の各種細菌は、同定されなかった。これら7種の細菌に共通する特徴は、金属腐食の関連が示唆されていないが、バイオフィルム形成能を持つことである。これらの結果は、水域の変化とともにバイオフィルム形成に関与する細菌種が大きく変わることを示唆している。また、得られた知見に基づいて、ガイドラインの素案を提案した。

## 1. 研究目的

橋梁や洋上風力発電設備等の海洋環境に建造されてい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。細菌が金属表面上に付着後、海洋環境に適応した細菌がバイオフィルムを形成した場合、時間経過に伴いバイオフィルムに内在する金属腐食の原因となる細菌の相対存在量が増大し、金属腐食が発生する。金属腐食の発生は、使用期間の短縮によるランニングコス

トの増大を招き、世界中で 60 兆円以上の経済的損失を引き起こしている<sup>1)</sup>。したがって、海水に接する鋼材には腐食対策が必要不可欠である。前回採択された研究(助成番号:202101)では、安芸津港(広島県東広島市)で採取した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ルム、バイオフィルムと腐食が発生していない金属片(ステンレス鋼 SUS304 製)を利用した集積培養物をそれぞれ対象に

菌叢解析を実施し、金属腐食の原因となる細菌が含まれないことを明らかにした<sup>2,3</sup>。即ち、バイオフィーム形成から金属腐食発生までの一連の過程で、バイオフィーム内の菌叢が大幅に変化し、金属腐食の原因となる細菌の相対存在量の増大とともに金属腐食が発生することが推察された。これまでに得られた研究成果を踏まえて、採択者は、バイオフィーム形成初期の菌叢の解明に基づいてバイオフィーム予防・制御のためのガイドラインを策定し、ガイドラインの活用により金属腐食を未然に防ぐことを考えた。ただし、前回採択された研究では解析対象が2サンプルと少ないため、ガイドラインの策定に必要な知見を得るに至っていない。そこで本研究では、特に学術的な知見が不足している河川—汽水—海洋系における菌叢の変化に焦点を当てて、海洋環境下に移行するにつれてバイオフィーム形成に作用する細菌種がどのように変化するか解析した。さらに、得られた知見を集約して、将来的に社会実装可能なガイドラインの策定を目指した。

## 2. 研究方法

### 2.1 環境水のサンプリング

環境水は、印旛放水路(印旛沼—東京湾)の6箇所ですamplingした(Fig. 1)。サンプリング当日の気温は10℃前後で、サンプリング前1週間に降水はなかった。採取した各環境水は滅菌チューブ内に保存し、直ちに4℃のクールボックスで保管後、数時間以内に研究室に輸送した。

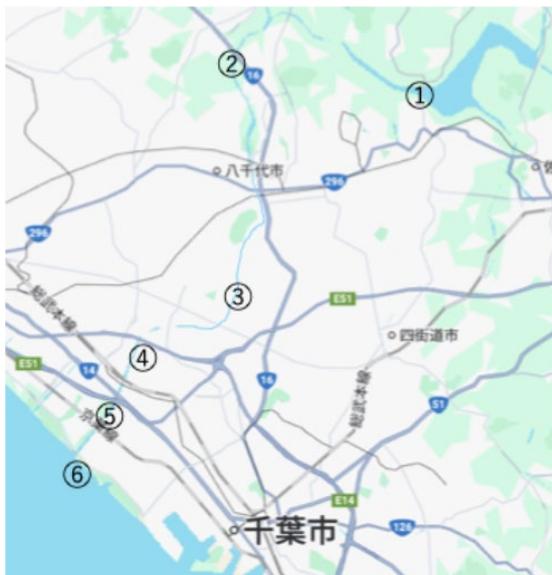


Fig. 1 Sampling spots of environmental water.

### 2.2 バイオフィームの調製

10% R2A 培地(酵母エキス:0.05 g/L, 溶性デンプン:0.05 g/L, カザミノ酸:0.05 g/L, ブドウ糖:0.05 g/L, ペプトン:0.05 g/L, リン酸一水素カリウム:0.03 g/L, ピルビン酸ナトリウム:0.03 g/L, 硫酸マグネシウム七水和物:0.005 g/L, 和光純薬製)に採取した各環境水を加え、バイオフィーム調製用培地とした。次に、各種バイオフィーム調製用培地にホームセンターで購入した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)を加え、30℃で1週間、静置培養した。金属片上に形成されたバイオフィームを回収後、滅菌水を用いて洗菌し、洗菌後のバイオフィームを菌叢解析に用いた。

### 2.3 バイオフィームの菌叢解析

#### 2.3.1 ゲノム DNA の調製

バイオフィームに Lysis Solution F(ニッポンジーン製)を添加し、卓上型ビーズ式破碎装置を用いて2分間粉碎した。その後、各種サンプルを65℃で10分間静置し、遠心分離により上清を分取した。さらに、Lab-Aid824s DNA Extraction kit(ZEESAN 製)を用いて、上清からゲノム DNA を調製した。

#### 2.3.2 ライブラリー作製とシーケンシング

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、Synergy LX (Agilent Technologies 製)と QuantiFluor dsDNA System (Promega 製)を用いて、調製したゲノム DNA の濃度を測定した。

2-Step tailed PCR 法によりライブラリーを作製後、Synergy HI (Agilent Technologies 製)と QuantiFluor dsDNA System を用いて濃度を測定した。次に、Fragment Analyzer (Agilent Technologies 製)と dsDNA 915 Reagent Kit (Agilent Technologies 製)を用いて、ライブラリーの品質を確認した。

#### 2.3.3 菌叢解析

FASTX-Toolkit<sup>4</sup> ver. 0.0.14 を用いてプライマー配列に一致したリード抽出を抽出後、FLASH ver. 1.2.11 を用いて抽出したリードを結合した。最終的に、QIIME2 を用いて菌叢を解析した<sup>5</sup>。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:OUT)としてクラスリングした<sup>6</sup>。さらに, Sliva データベースを参照し, 各 OTU の属名を同定した<sup>7</sup>。また, 出力された出現頻度表と代表配列に基づいて, 各 OTU の機能予測解析を実施した。

#### 2. 4 バイオフィルムの形成阻害試験

上述した各種バイオフィルム調製用培地にアンピシリン(終濃度:100 μM)を加え, バイオフィルム形成阻害試験用培地とした。各種バイオフィルム形成阻害試験用培地に研究方法 2. 2 で使用したのと同じ金属片を加えて, 静置培養した。30°Cで 1 週間, 静置培養後, 金属片表面上のバイオフィルム形成の有無を確認した。

### 3. 研究結果

#### 3. 1 環境水を利用したバイオフィルムの形成

自然界に存在する微生物は, 環境中に存在する僅かな栄養源を利用して生育している。したがって, 栄養源が豊富に含まれる栄養条件下で環境微生物を培養した場合, 生育阻害を受ける場合がある。即ち, 環境微生物を培養する場合, 大腸菌や酵母の培養に用いられている LB 培地や YPD 培地を用いることは好ましくない。そこで本研究では, 環境

微生物の培養で用いられている R2A 培地を更に希釈して利用した。

R2A 培地に河川(サンプル①②)ー汽水(サンプル③④)ー海洋(サンプル⑤⑥)の各種環境水を添加して培養したところ, いずれの場合も培養 1 日後に細菌の増殖が確認され, 培養 1 週間後には金属片表面上にバイオフィルム形成が確認された。この結果は, バイオフィルム形成能を有する細菌は, 水域を問わず存在し, 海洋インフラ表面上に付着後, 栄養源を獲得することができれば, バイオフィルム形成が発生することが示唆された。

#### 3. 2 バイオフィルムを対象とした菌叢解析

調製した各種バイオフィルムから調製したゲノム DNA を鋳型に利用して, V3-V4 可変領域を増幅した。次に, 増幅した V3-V4 可変領域に基づいて菌叢解析した。各種バイオフィルムに内在していた菌叢の類似度を明らかにするため主座標分析を実施した(Fig. 2)。類似度が高い場合, プロット同士が近くに集まるが, 今回の解析ではサンプルの分散が確認された。特に, サンプル③・⑥を用いて調製した両バイオフィルムに内在する菌叢は類似度が低くなった。

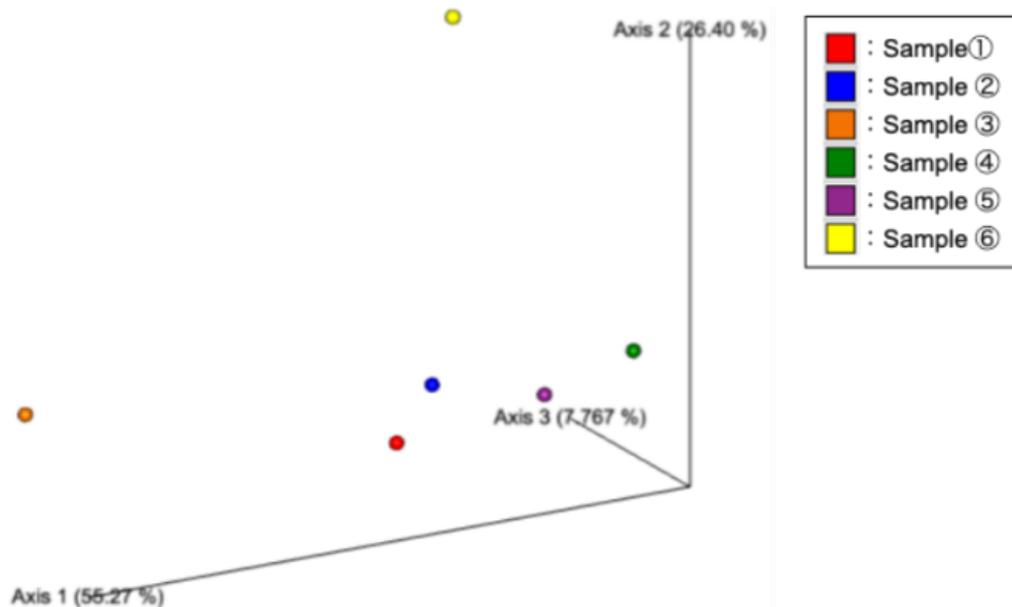


Fig. 2 PCoA plot with Bray-Curtis distance showing the distribution of bacterial community composition in each biofilms.

次に、各種バイオフィームに内在する菌叢を解析したところ、いずれのバイオフィームからも多様な細菌が同定された。一方、「海水濃度の増大に伴い、特定の細菌種も増大」等、環境水の種類と菌叢に相関は確認されなかった。しかしながら、東京湾近郊で採取した環境水（サンプル⑥）を用いて調製したバイオフィームを対象に菌叢解析した場合、バイオフィーム形成能を有するコマモナス科細菌の相対存在量が著しく低下した（Fig. 3A）。

菌叢をより詳細に明らかにするため、属レベルで細菌種を解析したところ、サンプル①–⑤を用いた場合と比べ、サンプル⑥を用いて調製したバイオフィームでは、*Agrobacterium* 属（15.3%）、*Bacillus* 属（12.5%）、および *Ralstonia* 属（2.5%）の相対存在量が顕著に増大した（Fig. 3B）。一方、サンプル①–⑤の各種環境水を用いて調製したバイオフィームから *Comamonas* 属、*Caulobacter* 属、*Pedobacter* 属および *Hydrogenophaga* 属の各種細菌が同定されたが、サンプル⑥を用いて調製したバイオフィームからは同定されなかった（Fig. 3B）。

### 3.3 菌叢の機能的推論

海水を含まない環境水（サンプル①–③）と海水を含む環境水（サンプル④–⑥）を用いて調製したバイオフィームから同定された菌叢を対象に、PICRUSt2 を用いて

解析した。解読した塩基配列から様々なタンパク質や酵素が同定し、炭水化物やアミノ酸、脂質等の代謝に関連する主要な代謝機能に関連する 386 個の KEGG 経路に分類した。

比較解析の結果（Fig. 4）、海水の有無を問わず、アスパラギン酸経路、*S*-アデノシル-L-メチオニン生合成経路、L-リジン・L-スレオニン・L-メチオニン生合成代謝経路 I および L-メチオニン生合成経路 I 等の L-メチオニンの生合成に関連する経路の機能が強化されていることが明らかとなった。これらの結果から、シグナル伝達物質として機能する *S*-アデノシル-L-メチオニンの生合成量の増大により、バイオフィーム形成が促進されていること推察された<sup>8</sup>。

### 3.4 抗生剤を利用したバイオフィームの形成阻害

各種バイオフィーム調製用培地にアンピシリンを加えて、バイオフィーム形成試験を実施した場合、細菌の増殖は確認されなかった。これは、アンピシリンがバイオフィーム形成能を有する細菌に取り込まれた後に細胞壁を構成するペプチドグリカンの合成に不可欠なペニシリン結合タンパク質と結合し、その機能を阻害することで細菌の増殖が抑制されたことを示す。

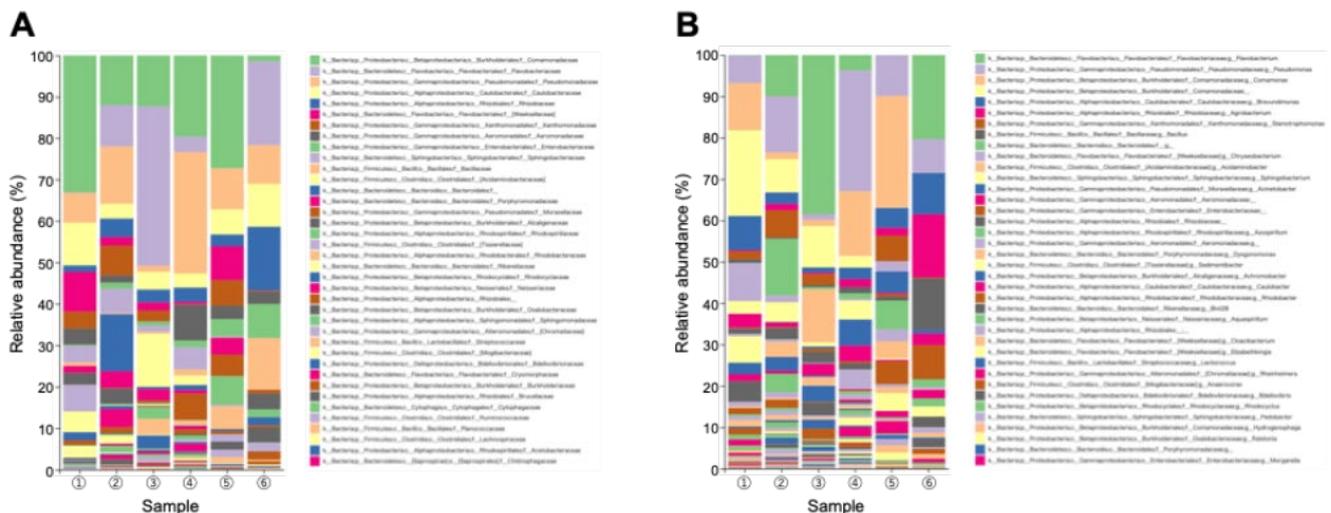
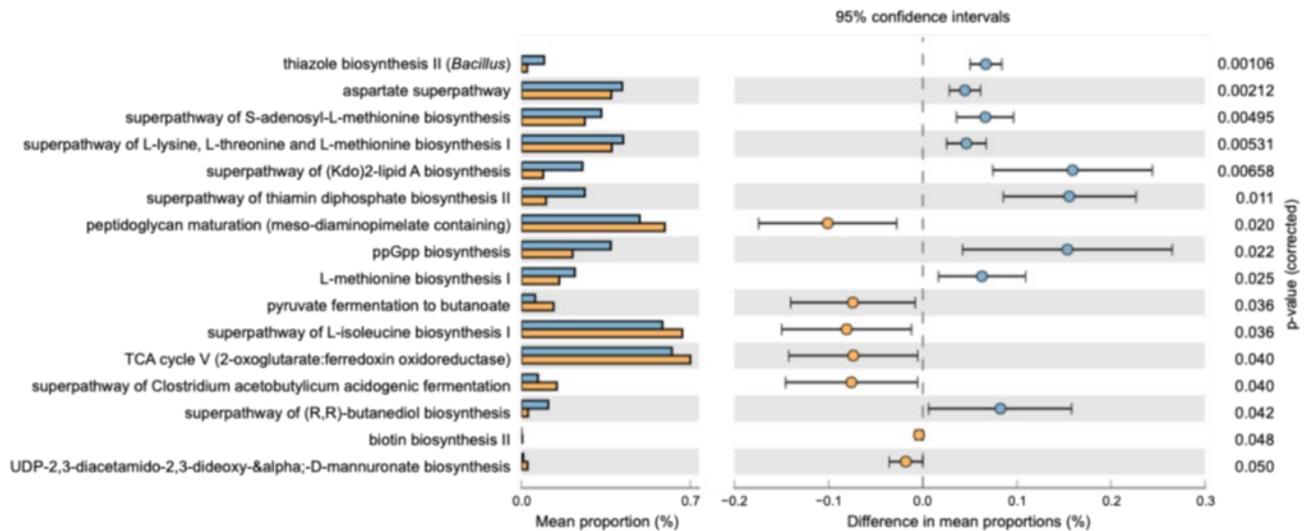


Fig. 3 The relative abundance of the bacterial reads classified at family (A) and genus (B) levels from the different biofilms prepared from each environmental water.



**Fig. 4** Mean proportion (%) and the difference in the mean proportion (%) of predicted and significantly different functional inferences of bacteria in biofilms prepared with environmental waters from seawater-containing (sample ①-③: blue) and non-seawater-containing (sample ④-⑥: orange) waters.

#### 4. 考察

##### 4.1 水域の変化がバイオフィーム形成に及ぼす影響

本研究では「海洋インフラを対象とした微生物誘起腐食を未然に防ぐガイドラインの策定」を目指しているため、海洋インフラが建造される環境に最も近い東京湾で採取した環境水 (サンプル⑥) を用いて調製したバイオフィームを対象に菌叢解析結果を中心に考察した。

微生物誘起腐食に関する先行研究として、炭素鋼<sup>9</sup>、ステンレス鋼<sup>10</sup>および低合金鋼<sup>11</sup>を対象とした菌叢解析が実施されているが、これらの報告では、*Desulfobacter* 属細菌や *Desulfovibrio* 属細菌等が優占種として同定され、金属腐食への関与が考察されている。一方、それら細菌は、本研究で調製した各種バイオフィームからは同定されなかった。サンプル⑥を用いて調製したバイオフィームを対象に菌叢解析した場合、*Agrobacterium* 属<sup>12</sup>、*Bacillus* 属<sup>13</sup> および *Ralstonia* 属<sup>14</sup> の各種細菌が同定された。一方、サンプル①-⑤を用いて調製したバイオフィームから同定された *Comamonas* 属<sup>15</sup>、*Caulobacter* 属<sup>16</sup>、*Pedobacter* 属<sup>17</sup> および *Hydrogenophaga* 属<sup>18</sup> の各種細菌は、サンプル⑥を用いて調製したバイオフィームから同定されなかった。これら 7 種の細菌に共通する特徴は、金属腐食の関与が示唆されていないが、バイオフィーム

形成能を持つことである。即ち、これら結果は、水域の変化によりバイオフィーム形成に関与する細菌種が大きく変わることを示唆している。これは、前回採択された研究で提案した「バイオフィーム形成から金属腐食発生までの一連の過程で、バイオフィーム内の菌叢が大幅に変化する」と一致した。

上述したように、各種バイオフィーム調製用培地にアンピシリンを加えた場合、細菌の増殖とバイオフィームの形成が阻害された。以上の結果を踏まえると、海洋インフラ表面上でのバイオフィーム形成を未然に防ぐには、「塗料への抗生剤の添加・塗膜表層からの抗生剤の溶出」等、多種の細菌に対して阻害効果をもたらす仕組みを付与することが効果的であると推察された。

##### 4.2 解析結果に基づいたガイドラインの提案

###### 4.2.1 鋼材と塗料の利用

海洋インフラに利用する鋼材は、海塩粒子や温度湿度の変化、紫外線などの影響を受けるため、過酷な腐食環境に晒される。したがって、鋼材は、腐食環境での使用実績が最も多い「鉄」の利用が好ましい。

宮下によれば、海洋インフラの腐食を防ぐには、複数種の塗料を重ねて塗布する重防食塗装が有効である<sup>19</sup>。抗生剤を添加する上塗用塗料についても、使用実績を鑑みて、「フッ素樹脂塗料」の利用が好ましい。

#### 4. 2. 2 抗生剤の利用

抗生剤は塗料に添加して利用するため、最終的には海水中に溶存する。したがって、生物濃縮や海洋生物への突然変異誘発を防ぐため、天然物質の利用が原則である。

本研究で使用したアンピシリンは、グラム陽性菌や一部のグラム陰性菌に対して阻害効果を示す、広域スペクトルのβ-ラクタム系抗生剤である。ただし、アンピシリンは、天然ペニシリンを原料に利用して、化学反応により合成されているため、天然物質ではない。今後のバイオフィーム形成阻害効果の検証が必要であるが、天然物質であり、アンピシリンと同じβ-ラクタム系抗生剤であるペニシリン等の利用が好ましい。

#### 5. 今後の課題

本研究では、印旛放水路で採取した各種環境水中にバイオフィーム形成能を有する細菌が混在することを実証し、菌叢解析によりバイオフィーム内に含まれる細菌の変化を明らかにした。次に、抗生剤の添加がバイオフィーム形成阻害に有効なことを実証した。さらに、得られた研究成果に基づいて、微生物誘起腐食を未然に防ぐガイドラインの素案を提案した。今後の課題としては、アンピシリン代替阻害剤の選定、ガイドラインの実証試験とガイドラインの精度向上等が挙げられる。

アンピシリン代替阻害剤の選定では、天然物質であるペニシリンを中心に、バイオフィーム形成阻害効果の解析が必要である。さらに、ガイドラインの実証試験では、海洋インフラに対して、新たに選定した抗生剤を添加した塗料の使用により、バイオフィーム形成阻害効果が得られるか検証する必要がある。近年の研究では、季節の違いによってバイオフィーム形成に作用する細菌種が変化することが示唆されている。一方、本研究で利用した環境水は、秋季に採取したもののみを利用している。そこで、ガイドラインの精度向上を図るためには、春季-冬季の一年間を通じて、菌叢がどのように変化するか解析し、解析結果を踏まえてガイドラインの改良を図る必要がある。

#### 6. 文献

1. G. Koch, J. Varney, N. Thompson, O. Moghissi, M. Gould, J. Payer, International measures of prevention, application, and economics of corrosion technologies
2. H. Akita, Y. Shinto, Z. Kimura, Bacterial community analysis of biofilm formed on metal joint. *Appl. Biosci.* **1**, 221-228 (2022)
3. H. Akita, Y. Shinto, Z. Kimura, Analysis of the bacterial community of metal scrap using an enrichment culture approach. *Appl. Biosci.* **2**, 23-30 (2023)
4. G.J. Hannon, FASTX-Toolkit. (2010) [http://hannonlab.cshl.edu/fastx\\_toolkit](http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit)
5. 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)
6. 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)
7. 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)
8. 池田幸, バイオフィーム形成と Quorum Sensing 機構, バイオフィーム制御に向けた構造と形成過程-特徴・問題点・事例・有効利用から読み解くアプローチ-, 59-66 (2017)
9. 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)
10. 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)
11. 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)
12. J.E. Heindl, Y. Wang, B.C. Heckel, B. Mohari, N. Feirer, C. Fuqua, Mechanisms and regulation of surface interactions and biofilm formation in *Agrobacterium*. *Front. Plant Sci.* **5**, 176 (2014)
  13. S. Arnaouteli, N.C. Bamford, N.R. Stanley-Wall, Á.T. Kovács, *Bacillus subtilis* biofilm formation and social interactions. *Nat. Rev. Microbiol.* **19**, 600–614 (2021)
  14. A. Foote, K. Schutz, Z. Zhao, P. DiGianivittorio, B.R. Korwin-Mihavics, J.J. LiPuma, M.J. Wargo, Characterizing biofilm interactions between *Ralstonia insidiosus* and *Chryseobacterium gleum*. *Microbiol. Spectr.* **11**, e0410522 (2023)
  15. Y. Wang, Z. Huang, N. Zhou, C. Liu, C. Jiang, D. Li, S. Liu, The response regulator flmd regulates biofilm formation in *Comamonas testosteroni* through the transcriptional activator SoxR. *Microorganisms* **10**, 356 (2022)
  16. P. Entcheva-Dimitrov, A.M. Spormann, Dynamics and control of biofilms of the oligotrophic bacterium *Caulobacter crescentus*. *J. Bacteriol.* **186**, 8254–8866 (2004)
  17. Y. Yu, Y.H. Kim, W.H. Cho, B.S. Son, H.J. Yeo, Biofilm microbiome in extracorporeal membrane oxygenator catheters. *PLoS One* **16**, e0257449 (2021)
  18. A.C. Martiny, H.J. Albrechtsen, E. Arvin, S. Molin, Identification of bacteria in biofilm and bulk water samples from a nonchlorinated model drinking water distribution system: detection of a large nitrite-oxidizing population associated with *Nitrospira* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 8611–8617 (2005)
  19. 宮下 剛, インフラ向け重防食塗装の特徴と今後の動向, 表面技術, **69**, 275-279 (2018)

## Formulate of Guidelines to Prevent Microbial Induced Corrosion

Hironaga Akita

Department of Liberal Arts and Basic Science, College of Industrial Technology, Nihon University

### Summary

When bacteria attach to a metal surface and form a biofilm, the relative abundance of bacteria that cause metal corrosion in the biofilm increases over time, causing metal corrosion. Metal corrosion leads to increased running costs due to a shortened service life, causing economic losses of more than 60 trillion yen worldwide, so corrosion prevention measures are essential for steel materials in contact with seawater. In our previous study, bacterial community analysis was performed on biofilms formed on a corrosion-free metal surface and enrichment culture with a corrosion-free metal piece, and the corrosion-causing bacteria were not identified. Those results showed that the bacterial community changes significantly in biofilms before and after the occurrence of metal corrosion, and metal corrosion occurs by increasing the relative abundance of the corrosion-causing bacteria. In this study, to obtain the knowledge necessary to formulate guidelines to prevent microbial-induced corrosion, we focused on changes in the bacterial community in river-brackish water-marine systems, which is one of the lacking academic knowledge.

After sampling environmental water at six locations in the Inba floodway (Lake Inban-Tokyo Bay), various environmental waters and metal pieces were added to 10% R2A medium, and then cultured statically to form biofilms on the metal pieces. Subsequently, the biofilms were washed using sterilized water, and then analyzed for bacterial communities contained in each biofilm. When analyzing the bacterial community of biofilms prepared using environmental water collected from Tokyo Bay, various bacteria of the genera *Agrobacterium*, *Bacillus*, and *Ralstonia* were identified. By construction, the various bacteria of the genera *Comamonas*, *Caulobacter*, *Pedobacter*, and *Hydrogenophaga* that were identified in other biofilms were not identified. A common feature of these seven bacteria is that those bacteria can form biofilms, although no association with metal corrosion has been suggested. These results suggested that the bacterial species involved in biofilm formation change significantly with changes in water bodies. Based on the findings obtained, a draft guideline was proposed.