石油タンク底水を用いた腐食再現試験の 次世代シーケンサによる微生物群集構造解析*

若井 暁**, 藤井創太郎***, 政成美沙***, 宮永一彦†, 丹治保典†, 三本木至宏***

** 神戸大学 自然科学系先端融合研究環

*** 広島大学大学院 生物圏科学研究科

† 東京工業大学大学院 生命理工学研究科

Corrosion Test Using Bottom Water from Oil-storage Tank and Microbial Community Analysis by Next Generation Sequencer*

Satoshi Wakai**, Sotaro Fujii***, Misa Masanari***, Kazuhiko Miyanaga†,
Yasunori Tanji† and Yoshihiro Sambongi***

** Organization of Advanced Science and Technology, Kobe University

*** Graduate School of Biosphere Science, Hiroshima University

† Department of Bioengineering, Tokyo Institute of Technology

Involvement of microorganisms to corrosion refers to microbiological influenced corrosion (MIC). We have previously succeeded a lab-scale corrosion test using bottom water from oil-storage tanks and shown microbial community change after the corrosion by a denaturing gradient gel electrophoresis analysis. However, those community structures have not yet been correlated to the accelerated corrosion. Therefore, we further conducted analysis of microbial community for by pyrosequencing using a next-generation sequencer. In the corrosion sample, an acetic acid bacterium *Acetobacterium* sp. and a sulfate-reducing bacterium *Desulfovibrio* sp. were enriched. In contrast, only *Desulfovibrio* sp. bacterium was enriched in the non-corroded culture, and *Acetobacterium* sp. bacterium was not observed. These results indicate that the *Acetobacterium* sp. bacterium may involve in the accelerated corrosion. This is first report of the corrosion by the *Acetobacterium* sp. bacterium. The combination of a lab-scale corrosion test and microbial community analysis by pyrosequencing would be useful to correlate between corrosion behavior and microbial community change. In future, such investigation would contribute to the understanding for the microbiologically influenced corrosion.

Key words : microbiologically influenced corrosion, oil-storage tank, microbial community, corrosion test, acetic acid bacterium, next-generation sequencer

1. 緒 言

微生物が金属腐食に関与することを微生物腐食という。この現象は古くから知られているが、単独で強い腐食能を示す微生物が分離されることは極めて稀である。一方で、近年、国内外の研究者によって、新規の鉄腐食性微生物が分離されている^{1)~7)}。例えば、国内の石油タンクから鉄腐食性メタン生成菌が分離されている^{2),3)}。この鉄腐食性メタン生成菌は、ある種の硫酸塩還元細菌(SRB)と共存することでさらに激しい腐食を誘導することが示されている⁸⁾。単独あるいは二種の微生物での腐食現象に関する知見が少しずつ得られているが、環境中には多様な微生物が存在し、その中で微生物腐食は進行している。そのような複雑系での腐食についての腐食の進行と微生物群集構造の変化の対応付けはできていない。

ある一時点での静的な微生物群集構造を明らかにしただけでは、腐食発生のリスクを評価することはできない。実際に腐食が進行するときの微生物群集の変動やそれに対応した腐食速度の変化といった知見が必要となる。そこで我々はまず、石油タンクの底部に溜まっている水(タンク底水)を分析し、特殊な微生物群集構造が形成されていることを明らかにした⁹⁾。次に、タンク底水を用いて研究室レベルで培養し、固体の鉄から鉄イオンが溶出するかどうか調べた。その結果、鉄イオンの溶出量が無生物のものよりも有意に大きくなる条件を見出した。これを我々は、微生物による腐食の誘導と考えている。このように腐食が誘導された腐食試験液では、元のタンク底水や他の条件で培養して得た試験液と比べて明らかに異なる微生物群集構造が形成されていることを変性剤濃度勾配ゲル電気泳動(DGGE)解析により明らかにした¹⁰⁾。

腐食に限ったことではないが、微生物群集構造の解析手法は次世代シーケンサの登場により劇的に向上し、環境中の微生物の全情報を網羅するほどの解析が可能となってきた。従来法では、16S rRNA 遺伝子を標的としたクローンライブラリー法や DGGE 解析法などが行われていた。クローンライブラリー法は個々の遺伝子をクローン化する必要があり、網羅的に微生物種を調べるためには多大な時間と労力を要する。DGGE 解析法は、電気

* 材料と環境 2015(東京, 2015 年)で発表

** 〒 657-8501 神戸市灘区六甲台町 1-1(1-1, Rokkodai, Nada, Kobe, 657-8501 Japan)

*** 〒 739-8528 広島市 鏡山 1-4-4(1-4-4, Kagamiyama, Higashi-Hiroshima, 739-8528 Japan)

† 〒 226-8501 横浜市緑区長津田町 4259 J2-15(4259 J2-15 Nagatsuta-cho, Midori-ku, Yokohama, 226-8501 Japan)

泳動パターンとして複数のサンプルの微生物群集構造を比較解析することに優れているが、その微生物種を調べるためには、電気泳動後のゲルから DNA を抽出して塩基配列を決定する必要がある。そのため、同様に多大な時間と労力を要する。一方で、次世代シーケンサは、クローンライブラリー法と DGGE 解析法の両方のメリットを備えており、複数のサンプル中の微生物種を網羅的に調べることが可能である。

本研究では、これまでに我々がタンク底水を用いて行った培養・腐食試験で得られた試験液に対して初めて次世代シーケンサを用いて微生物群集構造を解析し、腐食と微生物群集構造の詳細な対応付けを試みた。

2. 方 法

2.1 実験に使用した試料の由来

タンク底水と培養および腐食試験で得られた試験液およびそれらから抽出した DNA は、以前の研究¹⁰⁾で得られたものと同じである。タンク底水は、九州に設置されている石油タンク 3 基(KTD1, KTD2, および KTD3)から回収したものである。これらのタンク底水を用いて、タンク底水のみ、あるいは、タンク底水に模擬人工海水培地³⁾をベースとした無機塩を添加して嫌氣的に 26 週培養したものを培養試験液、同条件で鉄ホイル(純度 99.9 % 以上, 10×10×0.1 mm)を加えたものを腐食試験液と呼ぶ。今回使用した培養・腐食試験液の情報を Table 1 にまとめた。

2.2 腐食試験液 KTD1-M-Fe の継代培養試験

腐食試験液 KTD1-M-Fe 中に存在する腐食能を持った微生物群集を人工的な培地で継承し、腐食能を維持できるかどうか検討するために、以下の継代培養試験を行った。新鮮な模擬人工海水培地³⁾20 mL を N₂:CO₂(80:20)でガス置換した 50 mL 容嫌気瓶中に調製し、鉄ホイルを一枚投入して、KTD1-M-Fe の試験液 1 mL を植菌した。30°C で 4 週培養した後、溶出した鉄を定量するために、100 μ L の試験液を採取した。ここに等量の 6 M HCl を添加して不溶鉄を溶解し、2 倍量の 1 M L-Ascorbic acid を添加して三価鉄を二価鉄へと還元した。この還元試料に含まれる鉄量を *o*-phenanthroline 法¹¹⁾によって測定した。

Table 1 Information of cultivation samples used in this study.

Name	Bottom water	Iron foil ^a	Inorganic salts ^a	Corrosion
KTD1-NC	KTD1	—	—	N/A ^b
KTD1-M-NC	KTD1	—	+	N/A
KTD1-Fe	KTD1	+	—	Slow dissolution
KTD1-M-Fe	KTD1	+	+	Accelerated dissolution
KTD2-M-Fe	KTD2	+	+	Slow dissolution
KTD3-M-Fe	KTD3	+	+	Slow dissolution

a: +, presence; —, absence.

b: N/A means "not applicable" because of absence of iron foil.

2.3 次世代シーケンサを用いた 16S rRNA 遺伝子解析

継代培養液(4 週培養)を 0.22 μ m のメンブレンフィルター(ADVANTEC)でろ過し、捕集した微生物から RNA 添加 DNA 抽出法⁹⁾により DNA を抽出した。タンク底水および培養・腐食試験液(26 週培養)からの DNA は以前に回収したもの¹⁰⁾を使用した。抽出した DNA を鋳型にして、細菌の 16S rRNA 遺伝子を標的とした Forward プライマー(5'-CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG(X₁₀)AGAGTTTGATC(A/C)TGGCTCAG-3')および Reverse プライマー(5'-CCTATCCCCTGTGTGCTTGGCAGTCTCAGG(A/T)ATTACCGCGGCG(G/T)GCTG-3')を用いた PCR (ポリメラーゼ連鎖反応)により遺伝子断片(約 500 塩基対)を増幅した。このとき、プライマーに任意の 10 塩基から成るタグ(X₁₀)を付加することで各サンプルの識別ができる状態にしておき、各増幅断片のモル比を揃えてリーディングサンプルとした。これを次世代シーケンサ(GS FLX+ system, Roche)により解析することで各リードの塩基配列を取得した。

取得した配列の解析後処理は QIIME パイプライン¹²⁾を用い、タグに対応した配列の整理、プライマー配列の除去、および OTU(operational taxonomic unit)としてのクラスタリングを行った。OTU のクラスタリングは、属レベルの分類に相当する 97% 以上の相同性があるものとした。

3. 結果および考察

3.1 タンク底水中の微生物群集

異なるタンクから回収したタンク底水中の微生物群集における細菌の OTU の数は、KTD1 で 27 OTUs, KTD2 で 11 OTUs, KTD3 で 30 OTUs となった。OTU の数が多いほど多様性が高い。すなわち、三者の比較から、KTD1 と KTD3 は多様性が高く、KTD2 は低いということになる。

次に、微生物群集構造の構成を生物分類体系の門レベルで Fig. 1 に示した。この内、*Proteobacteria* は分類群が巨大であるため網レベル(*Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Deltaproteobacteria*, *Epsilonproteobacteria*)で分類した。KTD1 は多様性が高いとはいえ、*Alphaproteobacteria* 網細菌(35%)と *Chlorobi* 門細菌(20%)が半数以上を占めていた(Fig. 1A)。KTD2 では、50% が *Alphaproteobacteria* 網細菌、49% が *Betaproteobacteria* 網細菌となっていた(Fig. 1B)。KTD3 では、未培養細菌群から構成される候補門の細菌である TM7 が 28%, *Betaproteobacteria* 網細菌が 19%, *Deltaproteobacteria* 網細菌が 16% であった(Fig. 1C)。KTD3 で最も多い TM7 門細菌は、これまでに培養に成功していない未分離菌であり、本菌がタンク底水中に集積していることは微生物学的な観点からも興味深い。また、KTD1 と KTD3 の多様性は見かけ上高いが、それらの微生物の構成は大きく異なっている。

微生物腐食への関係が危惧される細菌として、SRB が、KTD1 と KTD3 で、それぞれ 1.5% (*Firmicutes* 門と *Deltaproteobacteria* 網の一部)および 1.3% (*Firmicutes* 門と *Deltaproteobacteria* 網の一部)検出された。これら二つ

Fig. 1 Compositions of microbial communities in the bottom water from oil-storage tanks. Pie charts indicate relative abundance of each phylum (only *Proteobacteria* is indicated by Class levels): A, KTD1; B, KTD2; and C, KTD3. Each chart color indicates each phylum or class. α, class *Alphaproteobacteria*; β, class *Betaproteobacteria*; δ, class *Deltaproteobacteria*; and TM7, candidate phylum TM7.

のタンク底水中には $3\sim 4 \times 10^7$ cells/mL の微生物細胞が観察されており¹⁰⁾, どちらのタンクにも約 10^5 cells/mL の濃度で SRB が存在することとなる。これは、タンク底水環境中での微生物腐食発生のリスクとして、SRB の存在に注意が必要であることを示唆している。一方で、以前の研究により KTD1 では加速的な腐食が誘導されるが¹⁰⁾, KTD3 では腐食が誘導されないことが分かっている。この KTD1 の腐食前後の微生物群集を詳細に検討することで、腐食に寄与している微生物種の推定が可能となるだろう。

3.2 培養・腐食試験の試験液中の微生物群集

微生物腐食発生のリスクの一つである SRB が検出されており、実際に加速的な鉄溶出によって示される腐食誘導を起こした KTD1 由来の培養・腐食試験液について同様に微生物群集構造解析を行った。

3.2.1 鉄ホイル非存在下での培養試験

最初に、採水した試料の保管状態や無機塩の混入が微生物群集構造に与え

る影響を知るために、ガス置換して静置した場合とさらに無機塩(模擬人工海水培地)を添加して静置した腐食試験液の微生物群集構造を解析した。

タンク底水 KTD1 をガス置換して静置しただけの場合(KTD1-NC), *Alphaproteobacteria* 綱細菌が全体の 35% から 66% に増加し, *Chlorobi* 門細菌が 20% から 3% まで減少していた (Fig. 2A). この場合は、栄養塩が不足した環境であることから、他の細菌が死滅して減少し、理由は不明であるが *Alphaproteobacteria* 綱細菌が多く生き残ったことで見かけ上増加したと考えられる。一方、底水に無機塩を添加した場合(KTD1-M-NC), *Betaproteobacteria* 綱細菌が 60% にまで増加していた (Fig. 2B). これは、有機物のような栄養塩の添加がなくとも、生育に必要な微量元素の不足によって活動が停止していた微生物が、無機塩の補充によって増加することを示唆している。

これらの結果は、微生物腐食の診断を目的として環境試料の微生物群集構造を解析する際に、その保管状態が群集構造に影響を与えることを示している。したがって、微生物群集構造の人為的な変動を排除するためには、腐食が生じた現場の微生物群集構造を速やかに解析する必要がある。

Fig. 2 Comparative analysis of microbial communities among samples from lab-scale test using the bottom water from KTD1. Each sample was incubated at 30°C for 26 weeks. A: incubation without any additives, B: incubation with inorganic salt medium, C: incubation with iron foil, and D: incubation with inorganic salt medium and iron foil. Each chart color indicates each phylum or class. α, class *Alphaproteobacteria*; β, class *Betaproteobacteria*; and δ, class *Deltaproteobacteria*.

3.2.2 鉄ホイル存在下での腐食試験

次に、このタンク底水(KTD1)が腐食され得る金属の表面に接触した場合にどのような群集構造の変動を見せるのかを調べるために、鉄ホイルを添加して静置培養した。底水に鉄ホイルを添加しただけの場合、*Betaproteobacteria* 綱細菌が54%まで増加していた(Fig. 2C)。しかし、この腐食試験液では鉄腐食の誘導が起これおらず、無機塩や鉄ホイルの投入で増加した *Betaproteobacteria* 綱細菌は鉄腐食性がないと考えられる。一方で、顕著に腐食が誘導された腐食試験液(無機塩および鉄ホイルの同時添加: KTD1-M-Fe)では、*Firmicutes* 門細菌が48%、*Deltaproteobacteria* 綱細菌が37%と顕著に異なる群集構造を示した(Fig. 2D)。著しく増殖した *Firmicutes* 門細菌は *Acetobacterium* 属の酢酸菌で占められており、*Deltaproteobacteria* 綱細菌では *Desulfovibrio* 属のSRBのみで構成されていた。

3.2.3 腐食サンプルと非腐食サンプルとの比較

腐食再現試験において KTD1-M-Fe は唯一加速された鉄溶出を示す“腐食サンプル”であるが、同条件で試験した KTD2-M-Fe および KTD3-M-Fe では加速された鉄の溶出は観察されていない。そこで、これらの鉄溶出が加速されない“非腐食サンプル”についても微生物群集構造を調べた。

タンク底水(KTD3)に無機塩を添加し、鉄ホイルを投入した KTD2-M-Fe では、検出限界以下であった *Desulfovibrio* 属のSRBが、60%にまで増加していた。また同様に別のタンク底水(KTD3)を用いた試験区 KTD3-M-Fe においても、検出限界以下であった *Desulfovibrio* 属のSRBが15%まで増加していたが、加速された鉄溶出は起きていない。また、*Firmicutes* 門の細菌が52%まで増加したが、増加したものは *Acetobacterium* 属細菌ではなく、*Pelotomaculum* 属細菌であった。本菌は、芽胞を形成する好熱性の従属栄養細菌であり¹³⁾、その高い生存率により見かけ上優占化した可能性も考えられる。

以上の結果から、腐食サンプルと非腐食サンプルの双方でSRBの増加は共通するが、腐食サンプルでのみ *Acetobacterium* 属細菌が増加しており、*Acetobacterium* 属細菌が加速された鉄の溶出に関与していることが示された。また、双方で増加している *Desulfovibrio* 属のSRBは、単独では鉄溶出の加速に関与しないことを示唆している。

3.3 鉄腐食性微生物群の継代と群集構造解析

研究室レベルで腐食を再現しようとする試験では、環境水試料から合成培地に植え替えること(継代)で腐食の再現性が失われることが経験的に知られている。そこで、腐食能の継承と群集構造の関係を調べるために、加速的な溶出を誘導した KTD1-M-Fe 試験液から継代培養を行い、その腐食能および微生物群集構造の維持・変化を調べた。

継代した培養物は無菌区の約8倍の鉄溶出量を示した(Fig. 3A)。したがって、この継代培養物には、鉄腐食能が継承されている。次に、次世代シーケンス解析により微生物群集構造を調べた。KTD1-M-Fe と比較すると、*Desulfovibrio* 属細菌が37%から23%に減少し、*Acetobacterium* 属細菌が48%から76%に増加しており、この2属の細菌種のみで全構成の99%を占めていた(Fig. 3B)。すなわち、若干の組成変化が見られるが、重要と思われる *Desulfovibrio* 属細菌と *Acetobacterium* 属細菌を主とする構成は維持されていた。

以上の結果から、KTD1-M-Fe で観察された腐食は、*Acetobacterium* 属の酢酸菌単独による腐食もしくは、酢酸菌とSRBの共存による協調的な腐食と推定できる。*Acetobacterium* 属細菌は水素を酸化し、二酸化炭素を還元することで酢酸を生成することができ¹⁴⁾、この酢酸を資化することで *Desulfovibrio* 属細菌が硫酸還元を行い、生じた硫化水素によって腐食が進行していると考えられる。この腐食メカニズムにおいて、*Acetobacterium* 属細菌への水素供給メカニズムがまだ不明であるが、近年報告されている鉄腐食性酢酸菌⁶⁾のように単独で腐食誘導を行う可能性もある。また、鉄腐食性メタン生成菌による腐食では、単独で腐食誘導を行わないSRBとの共存による協調的な腐食促進が報告⁸⁾されており、同様の関係が成立しているかもしれない。

4. 結 論

本研究では、次世代シーケンスを用いて微生物群集構造を詳細に調べることで、微生物群集構造の変化と微生物による金属腐食現象を関連付けることを目指した。従来の微生物群集構造解析と比較して、次世代シーケンスを用いることで、微生物の構成を定量的に解析することや存在数の少ないマイナーな微生物群の詳細を明らかに

Fig. 3 Corrosion test (A) and microbial community analysis in the 2nd enriched sample by batch cultivation. Corroded Fe dissolved from iron foil was measured after 4 week cultivation. Each chart color indicates each phylum or class.

することに成功した。また、腐食サンプルと非腐食サンプルの群集構造を比較解析することで、*Acetobacterium* 属の酢酸菌が腐食に強く関与することを示した。*Acetobacterium* 属細菌が主要な原因菌として引き起こされる腐食例は、これまでに報告がない。今後、次世代シーケンサを利用した網羅的な試験と培養に依存した腐食再現試験を組み合わせた試験が普及することによって、未知の腐食菌の存在を明らかにできる可能性が期待できる。また、これらのデータが蓄積することによって、腐食リスク評価の精度が向上すると期待できる。

本研究は、公益財団法人中国電力技術研究財団の一般研究助成金により実施された。

参 考 文 献

- 1) H. T. Dinh, J. Kuever, M. Mußmann, A. W. Hassel, M. Stratmann and F. Widdel, *Nature*, **427**, 829 (2004).
- 2) K. Mori, H. Tsurumaru and S. Harayama, *J. Biosci. Bioeng.*, **110**, 426 (2010).
- 3) T. Uchiyama, K. Ito, K. Mori, H. Tsurumaru and S. Harayama, *Appl. Environ. Microbiol.*, **76**, 1783 (2010).
- 4) J. M. McBeth, B. J. Little, R. I. Ray, K. M. Farrar and D. Emerson, *Appl. Environ. Microbiol.*, **77**, 1405 (2011).
- 5) S. Wakai, K. Ito, T. Iino, Y. Tomoe, K. Mori and S. Harayama, *Microb. Ecol.*, **68**, 519 (2014).
- 6) S. Kato, I. Yumoto and Y. Kamagata, *Appl. Environ. Microbiol.*, **81**, 67 (2015).
- 7) T. Iino, K. Ito, S. Wakai, H. Tsurumaru, M. Ohkuma and S. Harayama, *Appl. Environ. Microbiol.*, **81**, 1839 (2015).
- 8) K. Ito, S. Wakai, H. Tsurumaru, T. Iino, K. Mori, T. Uchiyama, O. Miki and S. Harayama, *EUROCORR proceedings*, **1063**, 1 (2008).
- 9) S. Wakai, M. Masanari, T. Watanabe and Y. Sambongi, *Inspection Eng.*, **17**, 1 (2012).
- 10) S. Wakai, S. Fujii, M. Masanari, A. Abe and Y. Sambongi, *Zairyo-to-Kankyo*, **62**, 389 (2013).
- 11) E. B. Sandell, "Colorimetric determination of trace metals". John Wiley & Sons, Inc., New York (1950).
- 12) J. G. Caporaso, J. Kuczynski, J. Stombaugh, K. Bittinger, F. D. Bushman, E. K. Costello, N. Fierer, A. G. Peña, J. K. Goodrich, J. I. Gordon, G. A. Huttley, S. T. Kelley, D. Knights, J. E. Koenig, R. E. Ley, C. A. Lozupone, D. McDonald, B. D. Muegge, M. Pirrung, J. Reeder, J. R. Sevinsky, P. J. Turnbaugh, W. A. Walters, J. Widmann, T. Yatsunenko, J. Zaneveld and R. Knight, *Nature methods*, **7**, 335 (2010).
- 13) H. Imachi, Y. Sekiguchi, Y. Kamagata, S. Hanada, A. Ohashi and H. Harada, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **52**, 1729 (2002).
- 14) W. E. Balch, S. Schoberth, R. S. Tanner and R. S. Wolfe, *Int. J. System. Bacteriol.*, **27**, 355 (1977).

(Manuscript received June 22, 2015;
in final form September 15, 2015)

要 旨

微生物が関与する金属の腐食現象を微生物腐食と呼ぶ。これまでに、石油タンク底水を用いて実験室レベルでの腐食再現試験に成功し、DGGE 解析によって微生物群集構造の変化が起きていることを明らかにしてきたが、群集構造の詳細と腐食現象の関連付けが出来ていなかった。そこで、本研究では、次世代シーケンサを用いてタンク底水および培養・腐食試験液中の微生物群集構造の詳細を明らかにし、腐食現象と微生物群集構造の関連付けを試みた。タンク底水を用いた群集構造解析では、タンクごとにその群集構造が大きく異なることを定量的に明らかにした。また、その群集構造が、置かれる環境条件によって変化することを明らかにした。加速された鉄の溶出を示した試料 KTD1-M-Fe では、*Acetobacterium* 属酢酸菌と *Desulfovibrio* 属硫酸塩還元細菌が集積していた。*Desulfovibrio* 属硫酸塩還元細菌のみが集積した試料で腐食が生じていないことから、*Acetobacterium* 属の酢酸菌が腐食に強く関与することが示された。*Acetobacterium* 属細菌が主要な原因菌として引き起こされる腐食例は、これまでに報告がない。以上の結果から、培養に依存した腐食再現試験と次世代シーケンサを組み合わせた比較解析は、腐食現象と微生物群集構造を関連付けるために有効な手法であると言えるだろう。

キーワード 微生物腐食, 石油タンク, 微生物群集, 腐食再現試験, 酢酸菌, 次世代シーケンサ