

展望

バイオフィルムの形成と金属材料表面-4

金属腐食におけるバイオフィルムと微生物相解析の事例

Analysis of Microbial Consortia in Biofilm Causing Metal Corrosion

伊藤公夫

Kimio Ito

新日本製鐵(株) 先端技術研究所
エネルギー・環境基盤研究部 主任研究員

1 はじめに

バイオフィルムは、多種類の微生物によって構成される複合微生物系である場合が殆どである。自然環境の微生物の多くは容易に培養できないため、バイオフィルムを構成する微生物を培養して単離・同定することは困難な場合が多い。しかし、微生物が細胞内に有するDNAを解析することで、培養しなくともバイオフィルムを構成する微生物を解析できるようになってきた。本稿では金属腐食に関連したバイオフィルムの微生物相(微生物コンソーシア)の解析方法と適用事例を中心にご紹介する。

海水や河川・湖沼水、土壌中など、自然環境には多様な微生物が棲息している。このように微生物がいる環境で金属材料を使用すると表面に微生物が付着する。この付着した微生物の皮膜をバイオフィルムと呼ぶ。例えば、金属を海水や河川・湖沼水につけておくと表面に「ぬめり」が付着するが、これがバイオフィルムである。バイオフィルムでは微生物のみでなく、フジツボやカキのような大型の生物が付着することもある。

金属を水中に浸漬すると最初は付着しやすい微生物が付着する。付着しやすい微生物には、増殖しながら粘性のある多糖類を細胞外に分泌するものがある。金属に直接付着できない微生物も、この粘性のある多糖類のおかげで金属表面に付着できるようになる。バイオフィルムはこのようにして厚みを増し、成長する。肥厚したバイオフィルムの表層では酸素呼吸する好気性微生物が増殖する。一方、バイオフィルムの内部は貧酸素となるため、嫌気性微生物が増殖する。このようにバイオフィルムでは好気性微生物と嫌気性微生物の棲み分けがおこる。また、バイオフィルムの成長過程や季節によって、バイオフィルムを構成する微生物の種類も大きく変わる場合が多い。

以上のようにバイオフィルムを構成する微生物は複雑で、

かつ、その微生物相(微生物コンソーシア)も変動する。では、バイオフィルムを構成する微生物を調べるには、どうすればよいのか? 貝類や原生動物など大型の生物では直接目視による同定が可能である。しかし、微生物は大きさがサブミクロンのオーダーであり、光学顕微鏡で観察してもどのような微生物が簡単にはわからない。バイオフィルムを構成する微生物の解析方法についてご説明する前に、環境中の微生物について以下ご説明する。

2 微生物とは

そもそも微生物とは何か? 生化学辞典によると、「顕微鏡を用いてしか見るることのできないような微小な生物の総称。」と説明されている¹⁾。このように「微生物」については、生物分類上、明確な定義はないようである。参考までに図1に生物の分類を示した。

一般的には原核生物のことを「微生物」と呼ぶ場合が多いようである。では、原核生物とはどういう生物か?

生物は細胞の中に核を持つ真核生物と核を持たない原核生物に分けられる。酵母、カビ、植物、動物(われわれヒトも含めて)などは真核生物である。(ただし、酵母やカビは真



図1 生物の分類

核生物であるが、これらも微生物と呼ばれている。)これに対して、細胞の中に核を持たない原核生物は、真正細菌と古細菌というさらに二つのグループに分けられる。真正細菌はバクテリアとも呼ばれる。バクテリア＝微生物と思われていた読者も多いと思う。真正細菌のグループには大腸菌をはじめとして、多くの微生物が属している。真正細菌は生物圏において有機物の分解などで重要な役割を担っている。一方、古細菌は、真正細菌とは細胞壁の組成が異なる原核生物である。古細菌には海底の熱水鉱床で棲息する好熱菌や、二酸化炭素を還元してメタンガスを発生するメタン生成古細菌などがある。

本稿は正確にはバイオフィルムの微生物の解析方法ではなく、原核生物(とくに真正細菌)の解析方法についてご説明する点を以下ご留意いただきたい。

3 自然環境における微生物の棲み分け

ここでは、自然環境における微生物の棲み分けについてご説明する。

自然環境には多様な微生物がいる。これら微生物を属名で分類すると種類が多すぎるため、整理するのは大変である。しかし、微生物がエネルギーを獲得する呼吸の様式で分類すると、比較的単純に整理できる。

地球上には酸素がある。酸素は植物の光合成によって作り出される。微生物の多くは我々ヒトと同様に酸素呼吸をしている。これらは好気性微生物と呼ばれる。酸素呼吸は、最もエネルギーを効率的に得ることができる呼吸様式である。したがって、酸素を利用できる環境であれば、酸素呼吸をする好気性微生物が優占的に繁殖することになる。

しかし、水中や地中では酸素呼吸する生物によって酸素は消費つくされ、酸素のない嫌気性環境になる。嫌気性環境では酸素呼吸によるエネルギー獲得が望めない。そこで酸素以外の電子受容体を用いる呼吸様式が嫌気性微生物では発達している。電子受容体の種類によって、得られるエネルギーが大きい順に、硝酸呼吸、マンガン呼吸、鉄呼吸、硫酸呼吸、炭酸呼吸といった呼吸様式がある。それぞれ、硝酸呼吸を行う脱窒菌、マンガン呼吸を行うマンガン還元細菌、鉄呼吸を行う鉄還元細菌、硫酸呼吸を行う硫酸塩還元菌、炭酸呼吸を行うメタン生成古細菌などが知られている。酸素があれば好気性微生物が優占化するが、酸素が消費されてなくなれば、次に硝酸塩を電子受容体として利用する脱窒菌、硝酸塩もなくなれば多価マンガンイオンを還元するマンガン還元細菌、多価マンガンイオンもなくなれば三価鉄イオンを還元する鉄還元細菌、三価鉄イオンもなくなれば硫酸塩を硫化水素に還

元する硫酸塩還元菌、硫酸塩もなくなれば炭酸塩をメタンに還元するメタン生成古細菌が、順次優占化する傾向がある(図2)。

バイオフィルムはどうだろうか? バイオフィルムは、海水や河川・湖沼水などに浸漬した金属材料などの表面に形成される。これらの水に酸素が溶存していれば、好気性微生物がバイオフィルムには優占化する。しかし、バイオフィルムが成長して肥厚するとバイオフィルムの表面だけが酸素呼吸できる条件になる。バイオフィルムの内部は酸素が枯渇して、他の呼吸様式の嫌気性微生物が棲息する環境となる。例えば、硝酸呼吸に必要な硝酸塩は好気性微生物である硝化細菌によりアンモニウムイオンを基質に生成される。

鉄呼吸に必要な三価鉄イオンは、同じく好気性微生物である鉄酸化細菌によって二価鉄イオンを基質に生成される。このようにバイオフィルムに存在する他の微生物の働きによって、嫌気性微生物の呼吸に必要な電子受容体となる物質が供給され得るのである。

嫌気性微生物の存在を身近に観察できる例として、ヘドロの海では底泥が黒く、卵の腐った臭いがする。海水には、嫌気性微生物である硫酸塩還元菌の電子受容体となる硫酸イオンが2500 mg/L程度の濃度で含まれている。卵の腐った臭いは硫酸塩還元菌が発生した硫化水素、黒い底泥は硫化鉄の黒色が主な原因である。また、池底などの堆積物から、メタンガスの気泡が発生しているのもよくみかけることができる。嫌気性微生物のメタン生成古細菌がメタンガスを発生しているためである。

4 微生物(ここでは原核生物)の解析方法

以下、微生物(ここでは原核生物)の解析方法をご説明する。

微生物を解析する場合、単一種類の微生物を分離して、培養、保管することが可能であれば、微生物の生理・生化学的

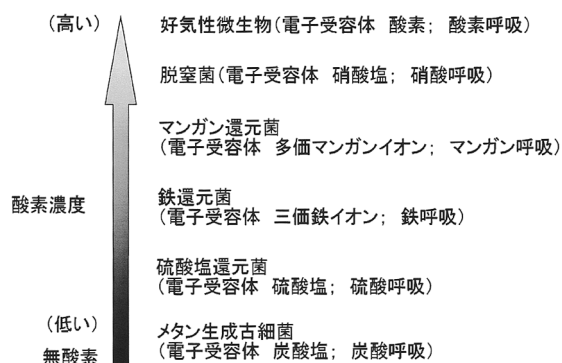


図2 微生物の呼吸様式による棲み分け

性質を直接調べることができるので望ましい。しかし、バイオフィームには、多種類の微生物が混在している。採取したバイオフィーム試料から微生物を培養により単離するには、例えば次のような方法がとられる。まず、バイオフィーム試料を構成している微生物を1細胞の微生物ごとにバラバラに分離して均質化したのち、培養液による希釈系列をつくる。ある段階まで希釈すると、培養液中に、1細胞の微生物のみが存在する条件をつくることができる。この培養液の微生物を増やせば、単一種類の微生物を培養することが可能となる。しかし、この単離方法は必ずしも容易ではない。まず、培養液の組成がターゲットとする微生物の増殖に必ずしも適合したものではない問題がある。特に、海水や河川・湖沼水などは微生物の餌となる有機物等の量が少なく貧栄養である場合が多い。このような貧栄養の環境で棲息する微生物の餌となる物質の実態は、よくわかっていない。環境によって棲息する微生物の種類が異なれば、餌となる物質も異なる。このため、海水や河川・湖沼水などに棲息している微生物のうち培養可能な微生物は10%未満であるといわれている。

それでは、培養が困難な微生物も含めて、バイオフィームを構成する微生物を解析するにはどうすればよいか？ その一つの解決策が、微生物の持つDNAを利用した解析方法である。

培養が容易な微生物も、培養が困難な微生物も、その細胞の中には遺伝子であるDNA（デオキシリボ核酸）を持っている。DNAはA（アデニン）、T（チミン）、G（グアニン）、C（シトシン）の4種類の塩基がつながってさまざまな塩基配列の遺伝情報をコードしている。原核生物では、細胞の中にリボゾームとよばれる蛋白質とRNA（リボ核酸）の分子複合体がある。原核生物のリボゾームの中にある16SrRNA（リボゾームRNA）をコードしている16SrRNA遺伝子のDNAは、原核生物の進化に伴って塩基配列が変化している。これまで

に膨大な種類の原核生物の16SrRNA遺伝子のDNAの塩基配列が調べられ、データベースに登録されている。

したがって、バイオフィームを構成する原核生物の16SrRNA遺伝子のDNAの塩基配列を調べれば、どんな原核生物か種類がわかることになる。しかし、採取したバイオフィーム試料中に存在する原核生物の細胞数は限られるため、そこに含まれるDNA量もきわめて微量である。16SrRNA遺伝子のDNAの塩基配列を調べるのに十分なDNA量を確保することは難しい。このDNA量が少ない問題を解決する方法として、PCR（Polymerase Chain Reaction）によるDNA断片の増幅がある。DNAはAとT、GとCが水素結合により塩基対を形成するため、2本のDNA鎖が相補的に結合した二重らせん構造をとっている。温度を上げるとこれら塩基対の水素結合が切れるため、DNAは一本鎖となる性質がある。

16SrRNA遺伝子には、真正細菌、古細菌それぞれで、微生物の種類に拠らず塩基配列が保存されているDNAの領域がある。一方、このような塩基配列が保存された二つの領域には含まれた、微生物種によって塩基配列が大きく異なるDNAの領域も存在する。

このように微生物の種類によって塩基配列が大きく異なる領域のDNAをはさむような二箇所の塩基配列が保存された領域のDNAに、相補的な塩基配列の一本鎖DNA（プライマーという）を化学合成する。プライマーを加えた条件で、バイオフィームから採取したDNAを温度上昇により、一本鎖DNAにした後、温度を下げる。プライマーはターゲットとする二つの塩基配列が保存された領域と結合して、二本鎖DNAを形成する。ただし、プライマーが結合した領域以外は一本鎖DNAのままである。DNAポリメラーゼ（Polymerase）という酵素は、このプライマーが結合して二本鎖DNAになったところを起点に、残った一本鎖DNA部分を順

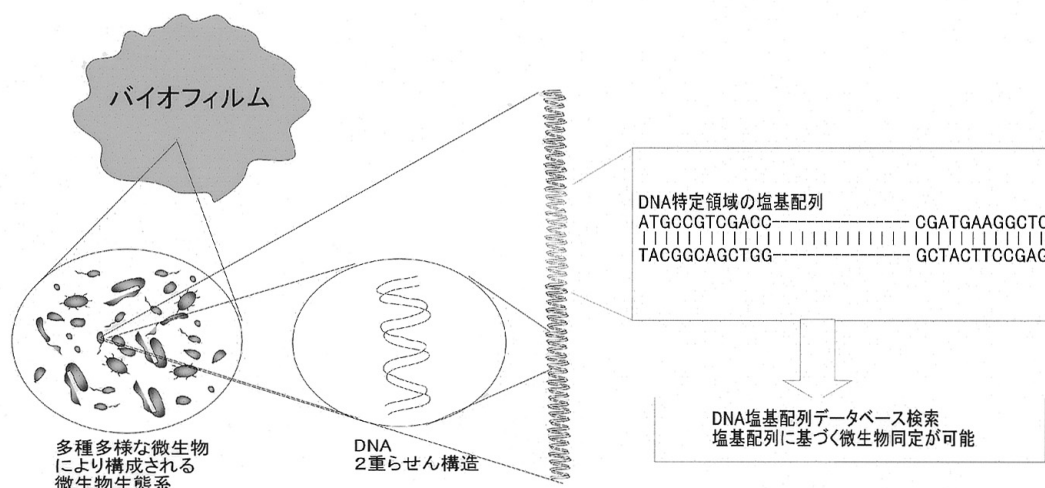


図3 バイオフィームを構成する微生物のDNAの塩基配列に基づく微生物同定

次二本鎖DNAにすることができる。この結果、はじめ一本の二本鎖DNAであった、微生物の種類によって大きく塩基配列が異なる領域のDNA断片が、二本の二本鎖DNA断片に増幅される。ここまでの反応を1サイクルとして、この反応サイクルを繰り返せば1サイクルごとに増幅したいDNA断片を2倍ずつ増幅していくことができる。好熱菌からとられたDNAポリメラーゼは、DNAを一本鎖にする際の高温(95℃くらい)でも失活しない耐熱性である。好熱菌のDNAポリメラーゼを使用することで、熱による失活がなく、温度コントロールで上記反応サイクルを繰り返すことができる。このような耐熱性DNAポリメラーゼを用いたDNA断片の増幅反応をPCR (Polymerase Chain Reaction) という。

原核生物のうちでも、真正細菌と古細菌ではPCRで使用するプライマーの塩基配列が異なる。一般的には、真正細菌用のプライマーが用いられ、真正細菌の微生物相が調べられる。また、実際には16SrRNA遺伝子の全塩基配列はPCRにより増幅する領域としては長すぎるため、16SrRNA遺伝子の一部であるV3領域のDNA断片が、微生物の種類によって塩基配列が大きく異なるDNAの領域として、PCRで増幅されるターゲットとなる場合が多い。

さて、PCRによって16SrRNA遺伝子のV3領域のDNA断片を増幅すると、PCRの反応産物にはバイオフィーム試料に含まれる全種類の真正細菌の16SrRNA遺伝子のV3領域のDNA断片が混在することになる。各真正細菌の塩基配列は真正細菌の種類によって異なるが、各真正細菌由来の塩基配列をもつDNA断片が混在したままでは塩基配列を微生物の種類ごとに区別して解読することができない。この問題を克服する方法として、DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) という電気泳動による解析手法がある。上記のPCRの際に、GCクランプとよばれるG、Cに富む構造を持つプライマーを使用してPCRを行う。GCクランプのあるプライマーを用いて得られるPCR産物を、DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis; 変成勾配ゲル電気泳動) かけるとPCR産物の塩基配列の違い、つまり、16SrRNA遺伝子のV3領域の塩基配列の違いによって、ゲル中での移動度に違いが出る。DNAに結合する蛍光色素でDGGEで電気泳動したDNAを染めると、各種類の真正細菌それぞれに由来する16SrRNA遺伝子のV3領域のDNAがゲル上の異なる移動位置にバンド状に分離して検出される。検出されたDNAの各バンドは、それぞれ異なる種類の真正細菌に対応することになる。したがって、ゲルからDNAのバンドを切り取って、その塩基配列を解読することで、対応する真正細菌の種類を特定することが可能である。一連の解析の流れを図4に示した。

5 バイオフィーム解析へのDNA解析技術の適用事例

本節では実際に金属に付着したバイオフィームを解析した事例について、いくつかで紹介する。これまでステンレス鋼の電位貴化現象を中心に、バイオフィームの調査をすすめてきた経緯があるため、ステンレス鋼に付着したバイオフィームの解析事例についてご紹介する。

(1) 東京湾(千葉県) 海水に浸漬したステンレス鋼に付着したバイオフィームの解析²⁾

東京湾の自然海水浸漬で電位貴化したステンレス鋼について、付着しているバイオフィーム中の微生物をPCR-DGGEで解析した。まず、バイオフィームから全DNAを抽出した。次いで、16SrRNA遺伝子のV3領域のDNA断片をPCRにより増やした。PCRに用いたプライマーは、真正細菌の16SrRNA遺伝子のV3領域を増幅するため、図5の塩基配列の合成DNAを用いた。

電気泳動 (DGGE) により、PCRで増幅したDNA断片を分離して塩基配列を解析した。塩基配列の解析結果を元に、データベースの検索を行い、微生物の同定を行った。DGGEでは4本の主要なDNAバンドが検出された。各バンドのDNA塩基配列を解析した結果、珪藻：ハネケイソウの一種である *Navicula salinicola* の葉緑体 (chloroplast) の塩基配列と97%、98%の相同性を示すバンドが各1本と、

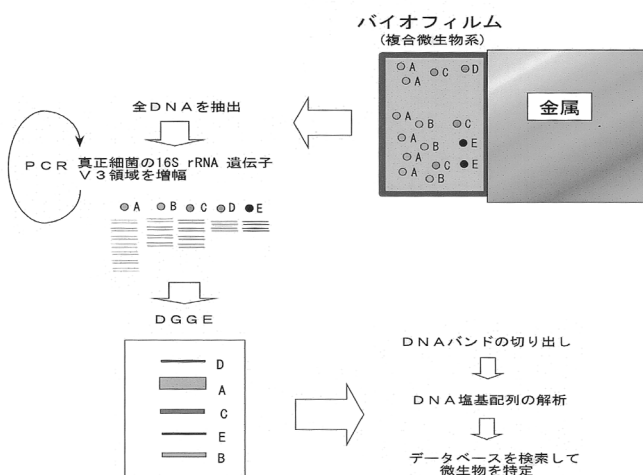


図4 PCR-DGGEを用いたバイオフィームを構成する微生物解析

Forward Primer
 5'CGCCCGCCGCGCGCGCGCGGGGCGGCGCGGGGCGCTACGGGAGGCAGCAG3'
 ,
Reverse Primer
 5'ATTACGCGGCTGCTGG3'

図5 PCRプライマーの例

ビブリオ菌である *Vibrio sp.* の塩基配列と 98 % の相同性を示すバンドが 1 本、および緑藻：クロレラの一様である *Chlorella protothecoides plastid* の色素体 (plastid) の塩基配列と 89 % の相同性を示すバンドが 1 本が、それぞれこのバイオフィームを構成する微生物として検出された。珪藻や緑藻は真核生物であるが、その細胞内小器官である葉緑体 (chloroplast) や色素体 (plastid) の 16SrRNA 遺伝子により、検出することができた。尚、珪藻は、ステンレス鋼の電位貴化の原因生物として報告されている。

(2) 平田湾 (岩手県) 海水に浸漬したステンレス鋼に付着したバイオフィームの解析事例³⁾

平田湾 (岩手県) の海水に浸漬したステンレス鋼も電位貴化した。そこで、ステンレス鋼に付着したバイオフィームの解析を行なった。真正細菌の 16SrRNA 遺伝子の V3 領域について、PCR-DGGE により解析した。

バイオフィームには少なくとも 6 種類の微生物が特定された。さらに、塩基配列をもとにバイオフィームを構成している微生物の単離を行ったところ、新規なマンガン酸化細菌が単離された。このマンガン酸化細菌は PCR-DGGE で検出されたバイオフィームを構成する微生物であり、単離された菌株は、ステンレス鋼を貴化する作用があることも確認できた。このマンガン酸化細菌は有柄細菌の一様で、柄をつかって積極的にステンレス鋼表面に付着する様子が SEM により観察された。PCR-DGGE によって、バイオフィームから電位貴化原因となる新規な海洋性のマンガン酸化細菌を同定、単離できた事例である。

尚、補足になるが、電位貴化はステンレス鋼に限った現象ではなく、白金、金、パラジウム、純チタン、純クロムなどでも同様な電位貴化が起こる⁴⁾。これら耐食性金属の表面近

傍に酸化剤が存在して、その影響で電位が貴化しているものと考えられる。その酸化剤もケースバイケースで、マンガン酸化細菌による電位貴化の場合は三価のマンガンイオンと考えられている。一方、東京湾で電位貴化した白金の表面にはマンガンが検出されなかった。同じ電位貴化でも東京湾海水と平田湾海水の電位貴化メカニズムが異なる可能性が考えられる。

以上、本稿ではステンレス鋼に付着したバイオフィームの微生物相の解析事例についてご紹介した。金属腐食に関わるバイオフィームの解析において、DNA 解析技術の有用性をご理解いただければ幸いである。

尚、鉄鋼材料の微生物腐食に関して、先進的な微生物解析技術を駆使したより本格的な調査が、独立行政法人 新エネルギー・産業技術開発機構 (NEDO) 事業「微生物を利用した石油の環境安全対策に関する調査」において、独立行政法人 製品評価技術基盤機構 (NITE) を中心に、現在、すすめられているので付記しておく。

参考文献

- 1) 今堀和友：生化学辞典，山川民夫監修，東京化学同人，(1984)
- 2) K. Ito, R. Matsuhashi, T. Kato, O. Miki and H. Kihira：Corrosion 2002, NACE, (2002), Paper No. 02452.
- 3) P. Baker, K. Ito and K. Watanabe：Environmental Microbiology, 5 (2003) 5, 925.
- 4) 伊藤公夫，松橋亮，加藤敏朗，三木理，紀平寛：材料と環境，50 (2001)，285.

(2007 年 3 月 29 日受付)