

腐食が発生していない金属を対象とした菌叢解析

日大生産工 秋田 紘長

1. 諸言

金属表面上に細菌が付着した場合、時間経過と共にコロニーが形成され、コロニーの発達によりバイオフィームが発生する。海洋インフラの金属表面上にバイオフィームが発生した場合、細菌による金属酸化等により腐食が進行するため、バイオフィームの形成を防ぐことが効果的な金属腐食の回避法である。本発表では、金属腐食が発生していないサンプル（バイオフィームと集積培養物）を対象とした菌叢解析により解明したバイオフィーム形成に作用する細菌について報告する（図1）。

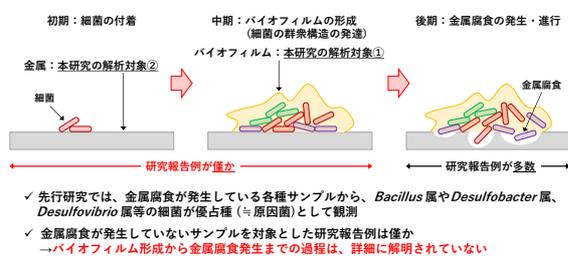


図1 本研究のねらい

2. 実験方法

3.1 サンプルング

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）を広島県東広島市の安芸津港でそれぞれ採取し、解析対象とした。サンプルング当日の気温は20°Cで、サンプルング前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。

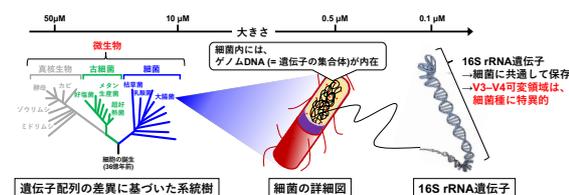
3.2 集積培養

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。細菌の増殖は、植菌前後の濁度差（ΔOD600値）で評価した。濁度は、Eppendorf BioSpectrometer（Eppendorf製）を用いて測定した。

3.3 菌叢解析

illustra™ bacteria genomicPrep Mini Spin Kit（GE Healthcare 製）を用いて、バイオフィームと集積培養物からゲノム DNA を抽出した。次に、各ゲノム DNA を鋳型に利用して、プライマー 341F と 805R を用いた PCR により 16S rRNA 遺伝子の V3-V4 可変領域を増幅した。電気泳動により PCR 産物の鎖長を確認後、Nextera XT DNA Library Preparation Kit（Illumina 製）を用いて菌叢解析用ライブラリーを調製した。

Quanti Fluor™ dsDNASystem（Promega 製）を用いて菌叢解析用ライブラリーの濃度を測定後、MiSeq Reagent Kit v3（Illumina 製）と MiSeq（Illumina 製）を用いてライブラリーの塩基配列を解読した（図2）。



✓ バイオフィームまたは集積培養物から抽出したゲノムDNAを鋳型に利用して、16S rRNA遺伝子のV3-V4可変領域を増幅し、V3-V4可変領域の塩基配列の差異に基づいて菌叢を解析

図2 菌叢解析の概要

QIIME2 を用いて、解読した塩基配列を基に菌叢を解析した。16S rRNA 遺伝子の相同性が99%以上の細菌を同一菌種（OUT: Operational taxonomic unit:）とし、Sliva データベースを参照して各 OTU の属名を同定した。また、MEGA11 を用いて OTU に基づいた系統樹を作成した。

3. 実験結果および考察

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/μL）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 を利用して 16S rRNA 遺伝子の V3-V4 可変領域は増幅できた。

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 (図3)¹⁾。

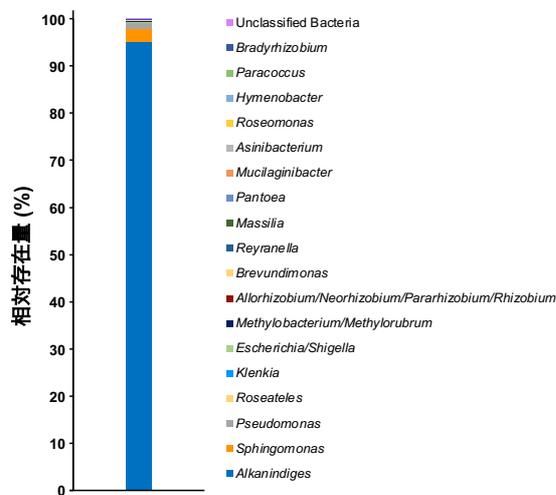


図3 バイオフィーム内の菌叢

採取したバイオフィーム内には *Alkanindiges* 属細菌が最優占種として存在し、相対存在量は95%以上だった。また、*Spingomonas*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。*Alkanindiges*属細菌のゲノム内には、金属腐食に必要な遺伝子クラスターが存在しない。従って、*Alkanindiges*属細菌は金属腐食を引き起こさず、バイオフィーム形成に作用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ームが形成したと推察された。

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を調製できなかった。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った。そこで、金属片上に生育する細菌を増殖させるため、炭酸カリウムを単一炭素源に調製した合成培地を用いて集積培養した。集積培養後、 ΔOD_{600} 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。

菌叢解析の結果、80属以上の細菌が観測された (図4)²⁾。また、*Spingomonas*属を含む8種の細菌が1%以上の相対存在量を示した。

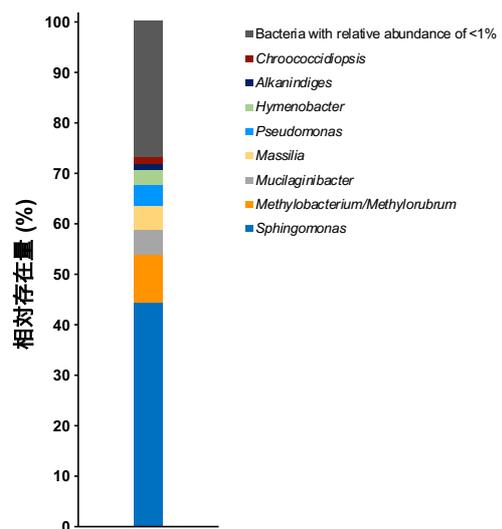


図4 集積培養物内の菌叢

最優占種として観測された *Spingomonas* 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でき、バイオフィームからも単離・同定されている。さらに、*Methylobacterium* 属細菌や *Pseudomonas* 属細菌等のバイオフィーム形成能を有する細菌も観測された。以上の結果から、解析対象とした金属片には、種々の細菌が混在し、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、*Spingomonas* 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形成されると推察された。

4. 結言

本研究では、腐食が発生していない係留リングから採取したバイオフィームと、金属片を加えた集積培養物を対象に菌叢解析を行った。両サンプルからは、金属腐食細菌が観測されなかったことから、バイオフィームの形成・発達と金属腐食に作用する細菌の種類が異なると示唆された。

参考文献

- 1) H. Akita, Y. Shinto, Z. Kimura, "Bacterial community analysis of biofilm formed on metal joint", *Appl. Biosci.*, (2022) 1:221–228.
- 2) H. Akita, Y. Shinto, Z. Kimura, "Analysis of the bacterial community of metal scrap using an enrichment culture approach", *Appl. Biosci.*, (2022) 2:23–30.