



JAEA-Review

2022-045

DOI:10.11484/jaea-review-2022-045

健全性崩壊をもたらす微生物による
視認不可腐食の分子生物・電気化学的診断
及び抑制技術の開発
(委託研究)

—令和3年度 英知を結集した原子力科学技術・人材育成推進事業—

Development of Genetic and Electrochemical Diagnosis and Inhibition Technologies
for Invisible Corrosion Caused by Microorganisms
(Contract Research)

-FY2021 Nuclear Energy Science & Technology and Human Resource
Development Project-

福島研究開発部門 福島研究開発拠点 廃炉環境国際共同研究センター
物質・材料研究機構

Collaborative Laboratories for Advanced Decommissioning Science,
Fukushima Research Institute, Sector of Fukushima Research and Development
National Institute for Materials Science

January 2023

Japan Atomic Energy Agency

日本原子力研究開発機構

JAEA-Review

本レポートは国立研究開発法人日本原子力研究開発機構が不定期に発行する成果報告書です。本レポートはクリエイティブ・コモンズ表示 4.0 国際 ライセンスの下に提供されています。本レポートの成果（データを含む）に著作権が発生しない場合でも、同ライセンスと同様の条件で利用してください。（<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.ja>）
なお、本レポートの全文は日本原子力研究開発機構ウェブサイト（<https://www.jaea.go.jp>）より発信されています。本レポートに関しては下記までお問合せください。

国立研究開発法人日本原子力研究開発機構 JAEA イノベーションハブ 研究成果利活用課
〒319-1195 茨城県那珂郡東海村大字白方2番地4
電話 029-282-6387, Fax 029-282-5920, E-mail:ird-support@jaea.go.jp

This report is issued irregularly by Japan Atomic Energy Agency.
This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.en>).
Even if the results of this report (including data) are not copyrighted, they must be used under the same terms and conditions as CC-BY.
For inquiries regarding this report, please contact Institutional Repository and Utilization Section, JAEA Innovation Hub, Japan Atomic Energy Agency.
2-4 Shirakata, Tokai-mura, Naka-gun, Ibaraki-ken 319-1195 Japan
Tel +81-29-282-6387, Fax +81-29-282-5920, E-mail:ird-support@jaea.go.jp

健全性崩壊をもたらす微生物による視認不可腐食の分子生物・電気化学的診断
及び抑制技術の開発
(委託研究)

—令和3年度 英知を結集した原子力科学技術・人材育成推進事業—

日本原子力研究開発機構 福島研究開発部門 福島研究開発拠点
廃炉環境国際共同研究センター

物質・材料研究機構

(2022年9月30日受理)

日本原子力研究開発機構 (JAEA) 廃炉環境国際共同研究センター (CLADS) では、令和3年度 英知を結集した原子力科学技術・人材育成推進事業 (以下、「本事業」という) を実施している。

本事業は、東京電力ホールディングス株式会社福島第一原子力発電所 (1F) の廃炉等を始めた原子力分野の課題解決に貢献するため、国内外の英知を結集し、様々な分野の知見や経験を、従前の機関や分野の壁を越えて緊密に融合・連携させた基礎的・基盤的研究及び人材育成を推進することを目的としている。

平成30年度の新規採択課題から実施主体を文部科学省から JAEA に移行することで、JAEA とアカデミアとの連携を強化し、廃炉に資する中長期的な研究開発・人材育成をより安定的かつ継続的に実施する体制を構築した。

本研究は、研究課題のうち、令和2年度に採択された「健全性崩壊をもたらす微生物による視認不可腐食の分子生物・電気化学的診断及び抑制技術の開発」の令和3年度の研究成果について取りまとめたものである。

本研究は、微生物が関与して誘起・加速する金属材料の腐食 (微生物鉄腐食) に関して、加速検査試験片、オンサイト遺伝子検査などの革新的な診断技術を開発、1F で想定される微生物腐食の発生・進行条件の洗い出しを行い、水質や環境コントロールによって微生物腐食を防ぐ方法を提案することを目的とした。さらに、材料・微生物・電気化学を基盤とした研究拠点を発展的に形成し、現場技術者が使用可能な技術の開発、さらには高い学際性を持つリーダー人材の育成を目指す。本年度の実験から特に 1F と関連する環境サンプルから淡水では初となる電気微生物鉄腐食を行うメタン生成細菌が単離され、高い鉄腐食能が確認された。その他にも、局所的に激しい腐食を行う細菌の単離や、腐食細菌を集積する材料・技術開発が進んだ。

本報告書は、日本原子力研究開発機構の英知事業における委託業務として、物質・材料研究機構が実施した成果を取りまとめたものである。

廃炉環境国際共同研究センター：〒979-1151 福島県双葉郡富岡町大字本岡字王塚 790-1

Development of Genetic and Electrochemical Diagnosis and Inhibition Technologies
for Invisible Corrosion Caused by Microorganisms
(Contract Research)

— FY2021 Nuclear Energy Science & Technology and Human Resource Development Project —

Collaborative Laboratories for Advanced Decommissioning Science,
Fukushima Research Institute, Sector of Fukushima Research and Development
Japan Atomic Energy Agency
Tomioka-machi, Futaba-gun, Fukushima-ken

National Institute for Materials Science

(Received September 30, 2022)

The Collaborative Laboratories for Advanced Decommissioning Science (CLADS), Japan Atomic Energy Agency (JAEA), had been conducting the Nuclear Energy Science & Technology and Human Resource Development Project (hereafter referred to “the Project”) in FY2021.

The Project aims to contribute to solving problems in the nuclear energy field represented by the decommissioning of the Fukushima Daiichi Nuclear Power Station (1F), Tokyo Electric Power Company Holdings, Inc. (TEPCO). For this purpose, intelligence was collected from all over the world, and basic research and human resource development were promoted by closely integrating/collaborating knowledge and experiences in various fields beyond the barrier of conventional organizations and research fields.

The sponsor of the Project was moved from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology to JAEA since the newly adopted proposals in FY2018. On this occasion, JAEA constructed a new research system where JAEA-academia collaboration is reinforced and medium-to-long term research/development and human resource development contributing to the decommissioning are stably and consecutively implemented.

Among the adopted proposals in FY2020, this report summarizes the research results of the “Development of genetic and electrochemical diagnosis and inhibition technologies for invisible corrosion caused by microorganisms” conducted in FY2021.

The present study aims to develop innovative diagnostic techniques such as accelerated test specimens and on-site genetic testing for microbially induced and accelerated corrosion of metallic materials (microbially influenced corrosion, MIC), and to identify the conditions that promote MIC at 1F for proposing methods to prevent MIC through water quality and environmental control. We also aim to develop a research base based on materials, microorganisms, and electrochemistry, to develop technologies that can be used by engineers in the field, and to cultivate leaders with high interdisciplinary skills. From this year's experiments, the novel iron-corrosive methanogen that induce MIC electrochemically was isolated from freshwater environmental sample, particularly those associated with 1F, and their high iron corrosion capacity was confirmed. Other progress was also made in isolating sulfate-reducing bacteria with capability for local and intense MIC and developing techniques to accumulate electrochemical MIC bacteria from microbial consortia.

Keywords: Microbially Influenced Corrosion, Iron Alloy, Extracellular Electron Transport, Sulfate-reducing Bacteria, On-site Diagnostic Technique

This work was performed by National Institute for Materials Science under contract with Japan Atomic Energy Agency.

目次

1. 英知を結集した原子力科学技術・人材育成推進事業の概要	1
2. 平成 30 年度 採択課題	2
3. 令和元年度 採択課題	5
4. 令和 2 年度 採択課題	8
5. 令和 3 年度 採択課題	10
付録 成果報告書	13

Contents

1. Outline of Nuclear Energy Science & Technology and Human Resource Development Project	1
2. Accepted Proposal in FY2018.....	2
3. Accepted Proposal in FY2019.....	5
4. Accepted Proposal in FY2020.....	8
5. Accepted Proposal in FY2021.....	10
Appendix Result Report	13

This is a blank page.

1. 英知を結集した原子力科学技術・人材育成推進事業の概要

文部科学省では、「東京電力(株)福島第一原子力発電所の廃止措置等研究開発の加速プラン(平成26年6月文部科学省)」等を踏まえ、平成27年度から「英知を結集した原子力科学技術・人材育成推進事業」(以下、「本事業」という。)を立ち上げ、「戦略的原子力共同研究プログラム」、「廃炉加速化研究プログラム」及び「廃止措置研究・人材育成等強化プログラム」を推進している。

具体的には、国内外の英知を結集し、国内の原子力分野のみならず様々な分野の知見や経験を、機関や分野の壁を越え、国際共同研究も含めて緊密に融合・連携させることにより、原子力の課題解決に資する基礎的・基盤的研究や産学が連携した人材育成の取組を推進している。

一方、日本原子力研究開発機構(以下、「JAEA」という。)では、平成27年に廃炉国際共同研究センター(以下、「CLADS」という。現:廃炉環境国際共同研究センター)を組織し、「東京電力ホールディングス(株)福島第一原子力発電所の廃止措置等に向けた中長期ロードマップ」等を踏まえ、東京電力ホールディングス株式会社福島第一原子力発電所廃炉(以下、「1F廃炉」という。)に係る研究開発を進めている。

また、平成29年4月にCLADSの中核拠点である「国際共同研究棟」の運用を開始したことを踏まえ、今後はCLADSを中核に、廃炉の現場ニーズを踏まえた国内外の大学、研究機関等との基礎的・基盤的な研究開発及び人材育成の取組を推進することにより、廃炉研究拠点の形成を目指すことが期待されている。

このため、本事業では平成30年度の新規採択課題から実施主体を文部科学省からJAEAに移行することで、JAEAとアカデミアとの連携を強化し、廃炉に資する中長期的な研究開発・人材育成をより安定的かつ継続的に実施する体制を構築することとし、従来のプログラムを、①共通基盤型原子力研究プログラム、②課題解決型廃炉研究プログラム、③国際協力型廃炉研究プログラム、④研究人材育成型廃炉研究プログラム(令和元年度より新設)に再編した。

2. 平成 30 年度 採択課題

平成 30 年度採択課題については以下のとおりである。

課題数：19 課題

共通基盤型原子力研究プログラム	11 課題（若手研究 6 課題、一般研究 5 課題）
課題解決型廃炉研究プログラム	6 課題
国際協力型廃炉研究プログラム	2 課題（日英共同研究）

平成 30 年度 採択課題一覧

共通基盤型原子力研究プログラム

【若手研究】

課題名	研究代表者	所属機関
被災地探査や原子力発電所建屋内情報収集のための半自律ロボットを用いたセマンティックサーベイマップ生成システムの開発	河野 仁	東京工芸大学
汚染土壌の減容を目的とした重液分離による放射性微粒子回収法の高度化	山崎 信哉	筑波大学
ラドンを代表としたアルファ核種の吸入による内部被ばくの横断的生体影響評価	片岡 隆浩	岡山大学
炉心溶融物の粘性及び表面張力同時測定技術の開発	大石 佑治	大阪大学
iPS 細胞由来組織細胞における放射線依存的突然変異計測系の確立	島田 幹男	東京工業大学
レーザー共鳴イオン化を用いた同位体存在度の低いストロンチウム 90 の迅速分析技術開発	岩田 圭弘	東京大学

共通基盤型原子力研究プログラム

【一般研究】

課題名	研究代表者	所属機関
放射性核種の長期安定化を指向した使用済みゼオライト焼結固化技術の開発	新井 剛	芝浦工業大学
燃料デブリ取り出しを容易にするゲル状充填材の開発	牟田 浩明	大阪大学
レーザー蛍光法を用いた燃料デブリ変質相の同定	斉藤 拓巳	東京大学
過酷炉心放射線環境における線量測定装置の開発	岡本 保	木更津工業 高等専門学校
レーザー加工により発生する微粒子の解析と核種同定手法の開発	長谷川 秀一	東京大学

課題解決型廃炉研究プログラム

課題名	研究代表者	所属機関
合金相を含む燃料デブリの安定性評価のための基盤研究	桐島 陽	東北大学
ガンマ線画像スペクトル分光法による高放射線場環境の画像化による定量的放射能分布解析法	谷森 達	京都大学
燃料デブリ取出し時における放射性核種飛散防止技術の開発	鈴木 俊一	東京大学
アルファダストの検出を目指した超高位置分解能イメージング装置の開発	黒澤 俊介	東北大学
ナノ粒子を用いた透明遮へい材の開発研究	渡邊 隆行	九州大学
先端計測技術の融合で実現する高耐放射線燃料デブリセンサーの研究開発	萩原 雅之	高エネルギー 加速器研究機構

国際協力型廃炉研究プログラム（日英共同研究）

課題名	研究代表者	所属機関
放射性微粒子の基礎物性解明による廃炉作業リスク低減への貢献	五十嵐 康人	茨城大学
放射線耐性の高い薄型 SiC 中性子検出器の開発	三澤 毅	京都大学

3. 令和元年度 採択課題

令和元年度採択課題については以下のとおりである。

課題数：19 課題

- 共通基盤型原子力研究プログラム 7 課題（若手研究 2 課題、一般研究 5 課題）
- 課題解決型廃炉研究プログラム 4 課題
- 国際協力型廃炉研究プログラム 4 課題（日英共同研究 2 課題、日露共同研究 2 課題）
- 研究人材育成型廃炉研究プログラム 4 課題

令和元年度 採択課題一覧

共通基盤型原子力研究プログラム

【若手研究】

課題名	研究代表者	所属機関
ウラニル錯体化学に基づくテーラーメイド型新規海水ウラン吸着材開発	鷹尾 康一朗	東京工業大学
動作不能からの復帰を可能とする多連結移動ロボットの半自律遠隔操作技術の確立	田中 基康	電気通信大学

共通基盤型原子力研究プログラム

【一般研究】

課題名	研究代表者	所属機関
一次元光ファイバ放射線センサを用いた原子炉建屋内放射線源分布計測	瓜谷 章	名古屋大学
低線量・低線量率放射線被ばくによる臓器別酸化ストレス状態の検討	鈴木 正敏	東北大学
単一微粒子質量分析法に基づくアルファ微粒子オンラインモニタリングに向けた基礎検討	豊嶋 厚史	大阪大学
幹細胞動態により放射線発がんを特徴付ける新たな評価系の構築	飯塚 大輔	量子科学技術 研究開発機構
耐放射線性ダイヤモンド半導体撮像素子の開発	梅沢 仁 (~R2. 3. 31) 大曲 新矢 (R2. 4. 1~)	産業技術総合 研究所

課題解決型廃炉研究プログラム

課題名	研究代表者	所属機関
Multi-Physics モデリングによる福島2・3号機ペダスタル燃料デブリ深さ方向の性状同定	山路 哲史	早稲田大学
燃料デブリ取出しに伴い発生する廃棄物のフッ化技術を用いた分別方法の研究開発	渡邊 大輔	日立GE ニュークリ ア・エナジー
アパタイトセラミックスによるALPS沈殿系廃棄物の安定固化技術の開発	竹下 健二 (~R3. 6. 30) 塚原 剛彦 (R3. 7. 1~)	東京工業大学
拡張型スーパードラゴン多関節ロボットアームによる圧力容器内燃料デブリ調査への挑戦	高橋 秀治	東京工業大学

国際協力型廃炉研究プログラム（日英共同研究）

課題名	研究代表者	所属機関
高い流動性および陰イオン核種保持性を有するアルカリ刺激材料の探索と様々な放射性廃棄物の安全で効果的な固化	佐藤 努	北海道大学
再臨界前の中性子線増に即応可能な耐放射線 FPGA システムの開発	渡邊 実	静岡大学 (～R3. 3. 31) 岡山大学 (R3. 4. 1～)

国際協力型廃炉研究プログラム（日露共同研究）

課題名	研究代表者	所属機関
燃料デブリ取出し臨界安全技術の高度化	小原 徹	東京工業大学
微生物生態系による原子炉内物体の腐食・変質に関する評価研究	金井 昭夫	慶應義塾

研究人材育成型廃炉研究プログラム

課題名	研究代表者	所属機関
燃料デブリ取り出し時における炉内状況把握のための遠隔技術に関する研究人材育成	浅間 一	東京大学
化学計測技術とインフォマティクスを融合したデブリ性状把握手法の開発とタイアップ型人材育成	高貝 慶隆	福島大学
放射線・化学・生物的作用の複合効果による燃料デブリ劣化機構の解明	大貫 敏彦 (～R2. 3. 31) 竹下 健二 (R2. 4. 1～)	東京工業大学
燃料デブリ分析のための超微量分析技術の開発	永井 康介	東北大学

4. 令和2年度 採択課題

令和2年度は、2つのプログラムにおいて、研究課題の採択を決定した。
公募の概要は以下のとおりである。

公募期間：令和2年3月17日～令和2年5月14日（課題解決型）
令和2年5月13日～令和2年7月15日（国際協力型）

課題数：10 課題

課題解決型廃炉研究プログラム 8 課題（若手研究 2 課題、一般研究 6 課題）
国際協力型廃炉研究プログラム 2 課題（日英共同研究）

これらの提案について、外部有識者から構成される審査委員会において、書面審査及び面接審査、日英共同研究については二国間の合同審査を実施し、採択候補課題を選定した。

その後、PD（プログラムディレクター）・PO（プログラムオフィサー）会議での審議を経て、採択課題を決定した。

令和2年度 採択課題一覧

課題解決型廃炉研究プログラム

【若手研究】

課題名	研究代表者	所属機関
燃料デブリにおける特性の経年変化と環境劣化割れの調査	楊 会龍 (~R4. 7. 31) 村上 健太 (~R4. 8. 1)	東京大学
健全性崩壊をもたらす微生物による視認不可腐食の分子生物・電気化学的診断及び抑制技術の開発	岡本 章玄	物質・材料 研究機構

課題解決型廃炉研究プログラム

【一般研究】

課題名	研究代表者	所属機関
遮蔽不要な臨界近接監視システム用ダイヤモンド中性子検出器の要素技術開発	田中 真伸	高エネルギー加速器研究機構
α / β / γ 線ラジオリシス影響下における格納容器系統内広域防食の実現：ナノバブルを用いた新規防食技術の開発	渡邊 豊	東北大学
β 、 γ 、X線同時解析による迅速・高感度放射性核種分析法の開発	篠原 宏文	日本分析センター
合理的な処分のための実機環境を考慮した汚染鉄筋コンクリート長期状態変化の定量評価	丸山 一平	東京大学
溶脱による変質を考慮した汚染コンクリート廃棄物の合理的処理・処分の検討	小崎 完	北海道大学
マイクロ波重畳 LIBS によるデブリ組成計測の高度化と同位体の直接計測への挑戦	池田 裕二	アイラボ

国際協力型廃炉研究プログラム（日英共同研究）

課題名	研究代表者	所属機関
革新的水質浄化剤の開発による環境問題低減化技術の開拓	浅尾 直樹	信州大学
無人航走体を用いた燃料デブリサンプルリターン技術の研究開発	鎌田 創	海上・港湾・航空技術研究所

5. 令和3年度 採択課題

令和3年度は、2つのプログラムにおいて、研究課題の採択を決定した。
公募の概要は以下のとおりである。

公募期間：令和3年3月16日～令和3年5月17日（課題解決型）
 令和3年4月13日～令和3年7月1日（国際協力型 日英共同研究）
 令和3年7月12日～令和3年8月18日（国際協力型 日露共同研究）

課題数：12 課題

課題解決型廃炉研究プログラム 8 課題
国際協力型廃炉研究プログラム 2 課題（日英）、2 課題（日露）

これらの提案について、外部有識者から構成される審査委員会において、書面審査及び面接審査、日英・日露共同研究については二国間の合同審査を実施し、採択候補課題を選定した。

その後、PD（プログラムディレクター）・PO（プログラムオフィサー）会議及びステアリングコミッティでの審議を経て、採択課題を決定した。

令和3年度 採択課題一覧

課題解決型廃炉研究プログラム

課題名	研究代表者	所属機関
建屋応答モニタリングと損傷イメージング技術を活用したハイブリッド型の原子炉建屋長期健全性評価法の開発研究	前田 匡樹	東北大学
燃料デブリ周辺物質の分析結果に基づく模擬デブリの合成による実機デブリ形成メカニズムの解明と事故進展解析結果の検証によるデブリ特性データベースの高度化	宇埜 正美	福井大学
ジオポリマー等による PCV 下部の止水・補修及び安定化に関する研究	鈴木 俊一	東京大学
世界初の同位体分析装置による少量燃料デブリの性状把握分析手法の確立	坂本 哲夫	工学院大学
アルファ微粒子の実測に向けた単一微粒子質量分析法の高度化	豊嶋 厚史	大阪大学

課題名	研究代表者	所属機関
連携計測による線源探査ロボットシステムの開発研究	人見 啓太郎	東北大学
中赤外レーザー分光によるトリチウム水連続モニタリング手法の開発	安原 亮	自然科学研究機構
福島原子力発電所事故由来の難固定核種の新規ハイブリッド固化への挑戦と合理的な処分概念の構築・安全評価	中瀬 正彦	東京工業大学

国際協力型廃炉研究プログラム（日英共同研究）

課題名	研究代表者	所属機関
福島第一原子力発電所の廃止措置における放射性エアロゾル制御及び除染に関する研究	Erkan Nejdet (~R4. 1. 31) 三輪 修一郎 (R4. 2. 1~)	東京大学
燃料デブリ取り出しのための機械式マニピュレータのナビゲーションおよび制御	浅間 一	東京大学

国際協力型廃炉研究プログラム（日露共同研究）

課題名	研究代表者	所属機関
福島第一発電所 2、3 号機の事故進展シナリオに基づく FP・デブリ挙動の不確かさ低減と炉内汚染状況・デブリ性状の把握	小林 能直	東京工業大学
非接触測定法を用いた燃料デブリ臨界解析技術の高度化	小原 徹	東京工業大学

本報告書は、以下の課題の令和3年度の研究成果を取りまとめたものである。

課題解決型廃炉研究プログラム【若手研究】

課題名	研究代表者	所属機関
健全性崩壊をもたらす微生物による視認不可腐食の分子生物・電気化学的診断及び抑制技術の開発	岡本 章玄	物質・材料研究機構

研究成果を取りまとめた成果報告書を付録として添付する。

付録
成果報告書

This is a blank page.

令和 3 年度

日本原子力研究開発機構

英知を結集した原子力科学技術・人材育成推進事業

健全性崩壊をもたらす微生物による
視認不可腐食の分子生物・電気化学的診断
及び抑制技術の開発
(契約番号 R03I035)

成果報告書

令和 4 年 3 月

国立研究開発法人物質・材料研究機構

本報告書は、国立研究開発法人日本原子力研究開発機構の「英知を結集した原子力科学技術・人材育成推進事業」による委託業務として、国立研究開発法人物質・材料研究機構が実施した「健全性崩壊をもたらす微生物による視認不可腐食の分子生物・電気化学的診断及び抑制技術の開発」の令和3年度の研究成果を取りまとめたものです。

目次

概略.....	viii
1. はじめに.....	1-1
2. 業務計画.....	2.1-1
2.1 全体計画.....	2.1-1
2.2 実施体制.....	2.1-2
2.3 令和3年度の成果の目標及び業務の実施方法.....	2.2-1
2.3.1 急速かつ局所的電気微生物腐食の診断と抑止技術の開発.....	2.2-1
2.3.2 バイオマーカー遺伝子の探索及びオンサイト診断技術の開発 (再委託先：JAMSTEC).....	2.2-1
2.3.3 1F設備において微生物腐食リスクが高まる環境条件のスクリーニング (再委託先：電中研).....	2.2-2
2.3.4 1F周辺環境の微生物の特徴の把握及び微生物腐食挙動の評価（連携先：JAEA）..	2.2-3
2.3.5 研究推進.....	2.2-3
3. 実施内容及び成果.....	3.1-1
3.1 急速かつ局所的電気微生物腐食の診断と抑止技術の開発.....	3.1-1
3.1.1 令和2年度までの実施内容及び成果（概要）.....	3.1-1
3.1.2 令和3年度実施内容及び成果.....	3.1-1
3.1.3 まとめ.....	3.1-4
参考文献.....	3.1-6
3.2 バイオマーカー遺伝子の探索及びオンサイト診断技術の開発 (再委託先：JAMSTEC).....	3.2-1
3.2.1 令和2年度までの実施内容及び成果（概要）.....	3.2-1
3.2.2 令和3年度実施内容及び成果.....	3.2-2
3.2.3 まとめ.....	3.2-12
参考文献.....	3.2-13
3.3 1F設備において微生物腐食リスクが高まる環境条件のスクリーニング (再委託先：電中研).....	3.3-1
3.3.1 令和2年度までの実施内容及び成果（概要）.....	3.3-1
3.3.2 令和3年度実施内容及び成果.....	3.3-2
3.3.3 まとめ.....	3.3-17
参考文献.....	3.3-18
3.4 1F周辺環境の微生物の特徴の把握及び微生物腐食挙動の評価（連携先：JAEA）.....	3.4-1
3.4.1 令和2年度までの実施内容及び成果（概要）.....	3.4-1
3.4.2 令和3年度実施内容及び成果.....	3.4-5
3.4.3 まとめ.....	3.4-10

3.5 研究推進	3.5-1
4. 結言	4-1
用語の説明書	5-1

執筆者リスト

事業代表者

国立研究開発法人物質・材料研究機構

グループリーダー

岡本 章玄

再委託先

国立研究開発法人海洋研究開発機構 超先鋭研究開発部門

副主任研究員

若井 暁

再委託先

一般財団法人電力中央研究所 環境科学研究所

上席研究員

平野 伸一

連携先

国立研究開発法人日本原子力研究開発機構 廃炉環境国際共同研究センター

炉内状況把握ディビジョン 副ディビジョン長

上野 文義

同 特殊環境腐食研究グループ 研究員

大谷 恭平

燃料デブリ研究ディビジョン

燃料デブリ取扱技術開発グループ 研究主幹

池田 篤史

同 研究副主幹

北垣 徹

同 研究員

土津田 雄馬

表一覧

表 3.1-1	全研究機関の培地情報まとめ.....	3.1-6
表 3.3.2-1	既報の腐食性メタン菌の電気化学的解析結果.....	3.3-6
表 3.3.2-2	Sr 処理水タンクを想定した培養条件	3.3-7

図一覧

図 2.1-1	年度別全体計画.....	2.1-1
図 2.2-1	実施体制図.....	2.1-2
図 3.1-1	開発した磁気ナノ粒子による電気細菌の濃縮前後と電気培養後の微生物群集構造	3.1-2
図 3.1-2	炭素鋼と開発したコーティング剤の効果.....	3.1-3
図 3.1-3	単離した NTE-D12 株の電顕像(A)と近縁種との電流生成の比較(B).....	3.1-5
図 3.2.1-1	各培地で培養した時の腐食加速度.....	3.2-2
図 3.2.2-1	異なる温度での鉄腐食性メタン生成菌による鉄腐食.....	3.2-3
図 3.2.2-2	様々な塩化物イオン濃度下での SUS316 試験片電極の電位挙動.....	3.2-4
図 3.2.2-3	電位モニタリング培養における電位挙動.....	3.2-5
図 3.2.2-4	電位モニタリング培養後に確認できた腐食.....	3.2-6
図 3.2.2-5	各培地で培養した時の腐食加速度.....	3.2-7
図 3.2.2-6	採取した環境サンプルの α 多様性.....	3.2-8
図 3.2.2-7	PCoA プロット (unweighted UniFrac)	3.2-9
図 3.2.2-8	各環境試料の微生物群集構造 (門レベル)	3.2-9
図 3.2.2-9	各培養物の微生物群集構造 (門レベル)	3.2-11
図 3.2.2-10	腐食活性の高い培養物と低い培養物の微生物群集構造 (属レベル)	3.2-11
図 3.3.1-1	Sr 処理水タンク内の Cl ⁻ 、SO ₄ ²⁻ 濃度の範囲	3.3-1
図 3.3.1-2	無機塩培地 (有機物添加無し) を使った培養条件における植え継ぎ培養液中の Fe(II)濃度.....	3.3-2
図 3.3.2-1	室内暴露試験 6 か月後の炭素鋼重量減損量.....	3.3-3
図 3.3.2-2	TO1 株、TO2 株の腐食活性の比較.....	3.3-4
図 3.3.2-3	嫌気条件下における鉄腐食反応の電子の流れ.....	3.3-5
図 3.3.2-4	pH 7.0 での腐食試験結果.....	3.3-8
図 3.3.2-5	pH 7.5 での腐食試験結果.....	3.3-9
図 3.3.2-6	pH 8.0 での腐食試験結果.....	3.3-10
図 3.3.2-7	pH 8.5 での腐食試験結果.....	3.3-11
図 3.3.2-8	各培養条件における腐食活性の比較.....	3.3-12
図 3.3.2-9	腐食試験後の炭素鋼片の表面 (TO1 株、TO2 株、非植菌区)	3.3-13
図 3.3.2-10	TO2 株培養試験片に生じた局部腐食箇所の観察.....	3.3-14
図 3.3.2-11	Sr 処理水タンクを想定した腐食試験後 (培養条件①) の培養液と炭素鋼試験片	3.3-15
図 3.3.2-12	採水試料を用いた室内暴露試験後の試料に含まれる微生物群集構造.....	3.3-16

図 3.4.1-1	富岡町内での環境サンプリング場所.....	3.4-1
図 3.4.1-2	環境サンプリング場所の写真.....	3.4-2
図 3.4.1-3	培養したサンプルの外観（28 日間培養）	3.4-3
図 3.4.2-1	試料調製装置.....	3.4-4
図 3.4.2-2	腐食影響の観察・分析・測定装置.....	3.4-5
図 3.4.2-3	いわき市常磐湯本温泉でのサンプリング状況の写真.....	3.4-6
図 3.4.2-4	大熊町坂下ダムでのサンプリング状況の写真.....	3.4-6
図 3.4.2-5	硫酸還元菌による鉄腐食片表面の 2 次電子像.....	3.4-7
図 3.4.2-6	原子間力顕微鏡によるナノレベルの凹凸の観察.....	3.4-8
図 3.4.2-7	浸漬腐食試験中の試料外観.....	3.4-9
図 3.4.2-8	真空含浸装置.....	3.4-9
図 3.4.2-9	試料断面 FE-SEM 写真	3.4-10

略語一覧

AFM	: Atomic Force Microscope (原子間力顕微鏡)
CLADS	: Collaborative Laboratories for Advanced Decommissioning Science (廃炉環境国際共同研究センター)
電中研	: 一般財団法人電力中央研究所
DDBJ	: DNA Data Bank of Japan (日本 DNA データバンク)
DFAST	: DDBJ Fast Annotation and Submission Tool (DDBJ が提供するゲノムアノテーション及び登録ツール)
EDS	: Energy Dispersive X-ray Spectroscopy (エネルギー分散型 X 線分光器)
FE-SEM	: Field Emission Scanning Electron Microscope (電解放出型走査電子顕微鏡)
JAEA	: Japan Atomic Energy Agency (国立研究開発法人日本原子力研究開発機構)
JAMSTEC	: Japan Agency for Marine-Earth Science and Technology (国立研究開発法人海洋研究開発機構)
NIMS	: National Institute for Materials Science (国立研究開発法人物質・材料研究機構)
OTU	: Operational taxonomy unit (操作上分類単位)
PCoA	: Principal Coordinate Analysis (主座標分析)
3D	: Three Dimension (三次元)
1F	: 東京電力ホールディングス株式会社福島第一原子力発電所

概略

微生物が関与して誘起・加速する金属材料の腐食（微生物鉄腐食）は、暗所や視認不可な場所で最大数十 mm/年で進行し、突発的な石油パイプラインの破損を引き起こすなど、甚大な事故の原因となっている。東京電力ホールディングス株式会社福島第一原子力発電所（以下「1F」という）のストロンチウム処理水タンクにおいても、平成 30 年 10 月に環境中から混入した細菌に由来する硫化水素の発生が確認されたことから、健全性崩壊の新たなリスクとして懸念される。しかし、世界的にも微生物腐食のリスクは未だ定量されておらず、これを制御する技術は確立していない。本研究では、我々が明らかにした腐食反応に重要な役割を演じる鍵酵素や腐食機構の新知見に基づき、加速検査試験片、オンサイト遺伝子検査などの革新的な診断技術を開発する。さらに、1F で想定される微生物腐食の発生・進行条件の洗い出しを行い、水質や環境コントロールによって微生物腐食を防ぐ方法を提案する。また、材料・微生物・電気化学を基盤とした研究拠点を発展的に形成し、現場技術者が使用可能な技術の開発、さらには高い学際性を持つリーダー人材の育成を目指す。令和 2 年度の実験から、特に 1F と関連する環境サンプルから微生物による腐食反応が確認できており、この腐食反応を抑制する条件の特定が今後進むことが期待できる。その他の計画に関しても、令和 4 年度以降の重要な実験を始めるための予備的な知見が得られた。令和 3 年度の実験から、特に 1F と関連する環境サンプルから淡水では初となる電気微生物鉄腐食を行うメタン生成細菌が単離され、高い鉄腐食能が確認された。その他にも、局所的に激しい腐食を行う細菌の単離や、腐食細菌を集積する材料・技術開発が進んだ。

前年度までの成果報告書：

健全性崩壊をもたらす微生物による視認不可腐食の分子生物・電気化学的診断及び抑制技術の開発（委託研究）；令和 2 年度英知を結集した原子力科学技術・人材育成推進事業

JAEA-Review 2021-059

<https://doi.org/10.11484/jaea-review-2021-059>

1. はじめに

1Fには様々な水を取り扱う設備や構造があり、場所によっては高レベルの放射性物質を含んでいる。廃炉作業を進める上で、このような汚染水の漏洩はあってはならない事故であるが、金属腐食によって突発的に生じ得るインシデントの1つである。この設備の健全性の崩壊の引き金になるリスクは長期的な廃炉作業が終了するまで付きまとうため、構造健全性を確認・確保したいというニーズに繋がっている。しかし、現状のガイドラインの中では、これまで多くの化学プラントやエネルギープラントで漏洩事故等を引き起こしてきた微生物による腐食（微生物腐食）に対して明記されていないのが現状である。

腐食の中でも最も診断やコントロールが難しい微生物腐食は、一度発生すると数十 mm/年といった急激な速度で局所的に鉄材料を腐食する事例がある。例えば、日常的に目視確認できない環境（石油パイプライン内部など）での微生物腐食は、これまで突発的かつ重大な事故を誘発した事例が多数報告されている。原子力関連設備においても例外ではなく、米国の原子力関連施設での微生物腐食が報告されており、1Fにおいても地下水が流入している高放射線レベルの建屋内、汚染水や処理水を扱う設備、処理水の貯留タンクなど視認不可な環境に微生物が生息し、微生物腐食リスクがある。実際に、1Fの処理水貯留タンクでの硫化水素発生も確認された。これは環境中の腐食微生物が集積されている確かな証拠であり、微生物腐食が建屋内で現実的な問題になりうることを明確に示している。しかしながら、1Fにおけるリスク評価、微生物腐食を低減させる有効な防止対策は共にその重要性すら認識されていない。

実は、原子力関連施設に限らず、現状の微生物腐食に対する知見の乏しさが、世界的な対応の遅れの本質的な原因である。一方で、近年、微生物が鉄表面から直接電子を引き抜いて能動的に腐食を促進する機構が明らかになった。この「電気腐食」は、古典的な生物由来硫化水素による受動的な腐食では説明できなかった局所的かつ急速な腐食を説明可能であるとして世界中で研究が進められている。我々は、世界に先駆けて電気腐食メカニズムを分子レベルで明らかにしており、得られている基礎的知見を用いて、現場での微生物腐食リスク予知・診断技術ならびに抑制技術を開発する。

これまで想定されてこなかった微生物を原因とする汚染水漏洩事故リスクの把握、1F廃炉までの建屋及び汚染水貯蔵タンクの早急な健全性の評価は喫緊の課題であり、微生物腐食の防止による長期的視野での健全性を確保することが、漏洩事故等を回避しながら安全に廃炉を完了するために不可欠である。

上記のような背景から、本研究では、1Fで想定される環境内での微生物腐食リスクを可視化し、環境コントロールにより微生物腐食リスクを低減させることで、汚染水漏洩をもたらす微生物による視認不可腐食のリスク診断ならびに抑制技術の開発を目指す。

達成目標：構造及び設備の健全性の確認と確保のために、本研究では3つの目標を立てる。

- (1) これまで想定されてこなかった汚染水漏洩事故リスクの把握
- (2) オンサイトで使用可能な腐食リスクを可視化する技術の確立
- (3) 環境コントロールによる微生物腐食防止方法の確立

廃炉に向けて建屋及び構造物の健全性の確認と確保は、汚染物質の漏洩を防ぐために必須の要件である。加えて、東日本大震災以降増え続けている処理水については、近年その処分方法にも注目が集まっており、このような社会的注視の中でタンクからの腐食による漏洩は、廃炉プロセスの大きな弊害となり、絶対に防がなければならない事象の1つである。

2. 業務計画

2.1 全体計画

図 2.1-1 に年度別全体計画を示す。

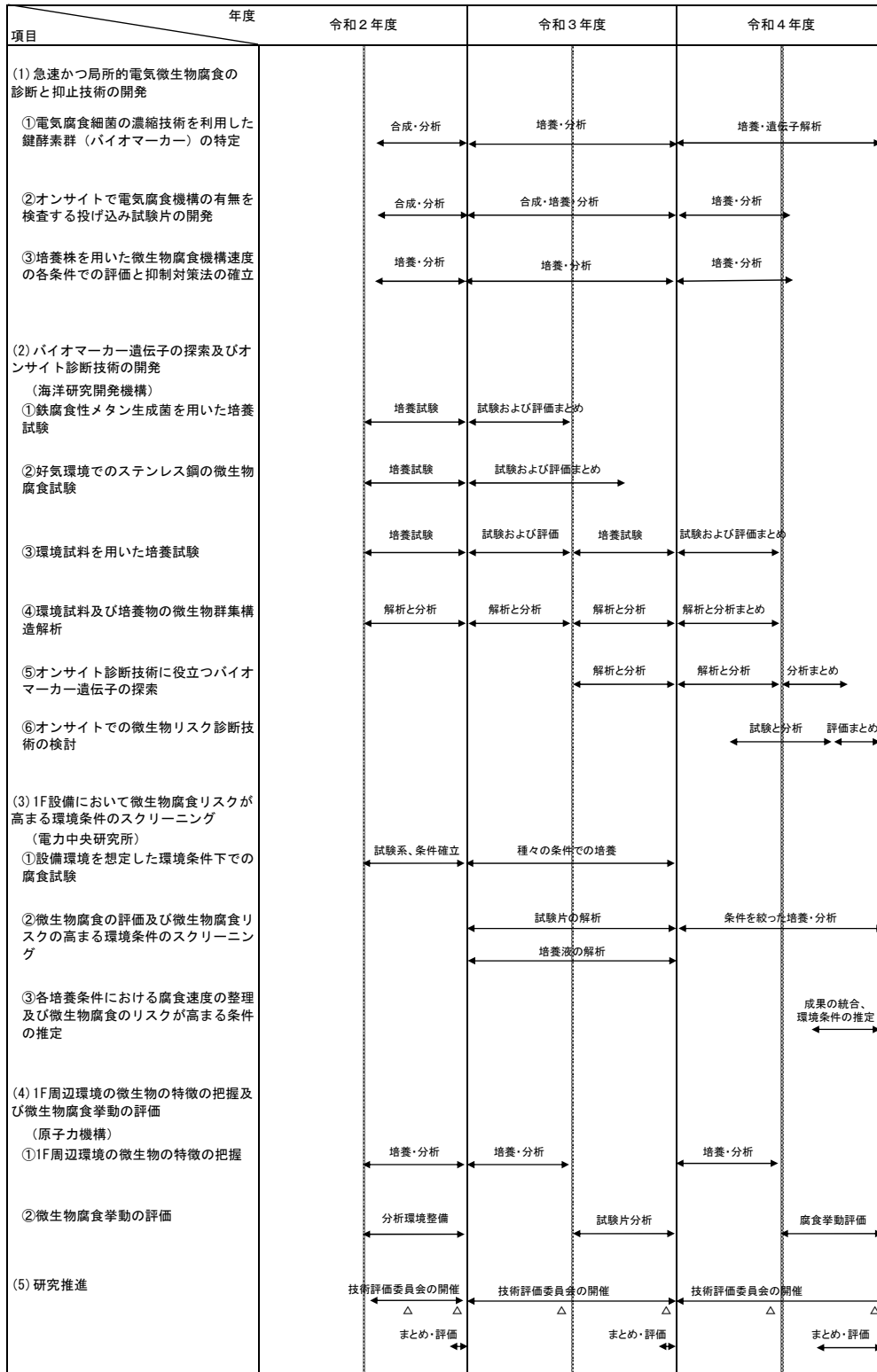


図 2.1-1 年度別全体計画

2.2 実施体制

図 2.2-1 に実施体制を示す。

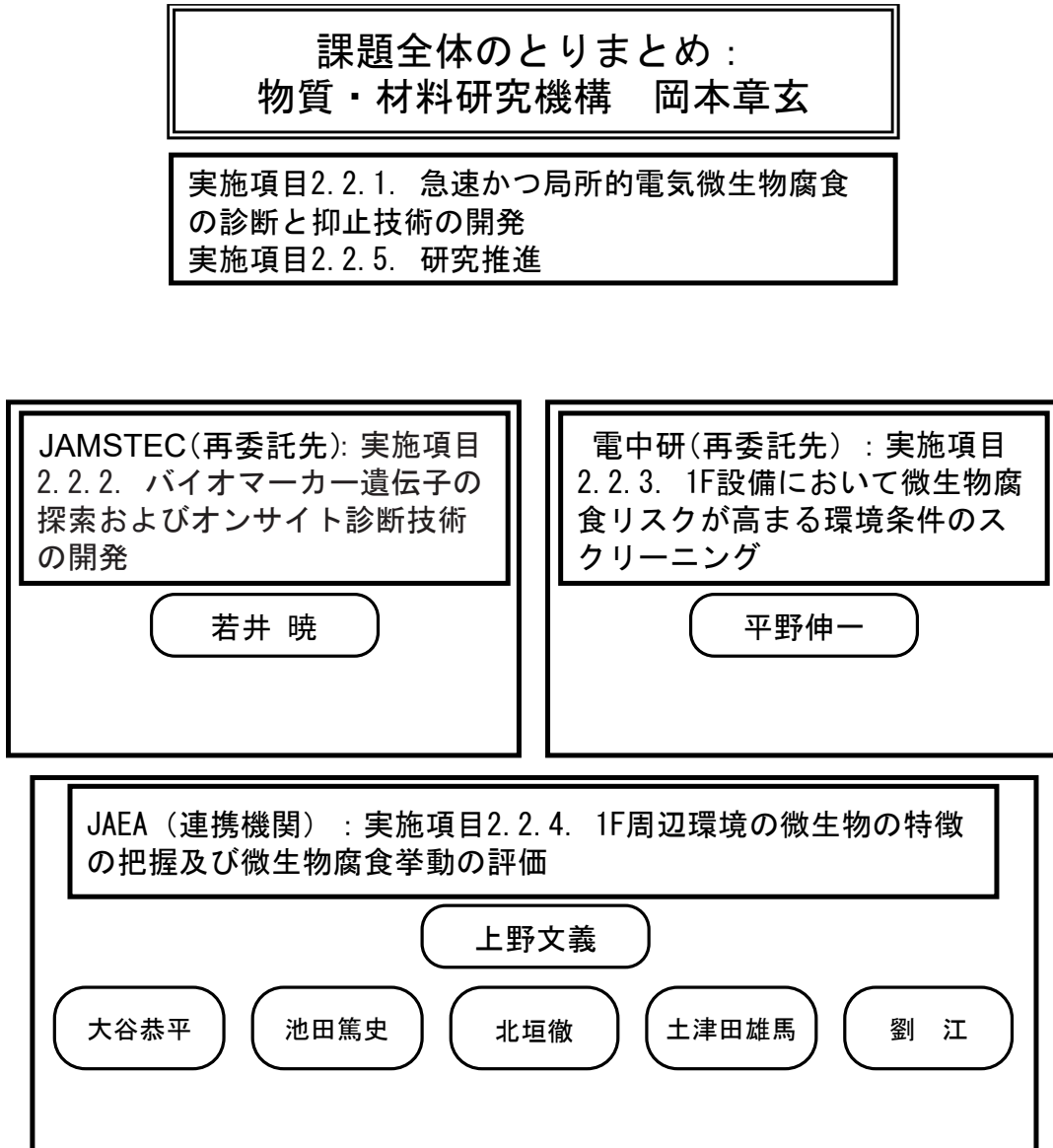


図 2.2-1 実施体制図

2.3 令和3年度の成果の目標及び業務の実施方法

2.3.1 急速かつ局所的電気微生物腐食の診断と抑止技術の開発

① 電気腐食細菌の濃縮技術を利用した鍵酵素群（バイオマーカー）の特定

細菌の表面に局在する電子を引き抜く酵素である外膜シトクロム酵素は、電気腐食機構に重要であることが知られている。そのため、細胞表面の細胞外酵素によって特異的に重合反応が進むモノマー分子とポリマーと高い親和性を持つナノ粒子を用いて、電気腐食細菌を濃縮する技術を開発する。1F 周辺環境水を用いて、鉄腐食実験を行い、電気腐食細菌濃縮を試みる。処理した各試料に対して電気化学測定を行い、カソード電流によって電気腐食細菌が濃縮されているか検討する。濃縮回数と腐食速度の関係性を検討し、培養株で行った結果と比較する。

② オンサイトで電気腐食機構の有無を検査する投げ込み試験片の開発

黒サビの電気導電性に影響を与える鉄合金を作製することで、電気腐食の速度を加速する材料の開発を行うため、Cu、Bi、Zn、Mo、Sb といった金属を 10%程度溶解させた鉄合金を国立研究開発法人物質・材料研究機構（以下「NIMS」という）内の材料創製・加工ステーションを利用して作製し、それぞれの合金について腐食時の重量変化を測定、電気腐食細菌ではないモデル細菌をネガティブコントロールとして用いて電気腐食細菌の結果と比較する。さらに、各合金の腐食速度を電気化学的測定によって検証し、より目的に適合した合金の組成について検討する。

③ 培養株を用いた微生物腐食機構速度の各条件での評価と抑制対策法の確立

1F で想定される環境（主に培地組成、塩濃度、pH 及び温度）を模倣した条件で、腐食されやすい炭素鋼を用いて網羅的に腐食実験を行い、腐食活性を評価する。

2.3.2 バイオマーカー遺伝子の探索及びオンサイト診断技術の開発（再委託先：国立研究開発法人海洋研究開発機構、以下「JAMSTEC」という）

① 鉄腐食性メタン生成菌を用いた培養試験

令和2年度に引き続き、窒素雰囲気下の 1F 格納容器内に当該微生物が存在した場合のリスクを想定して、当該微生物が 1F 環境で腐食反応に影響する可能性について検討する。具体的には、想定される 1F の環境水組成等の条件を用いて鉄腐食性メタン生成菌を培養し、各環境下での腐食速度についてデータを集積する。腐食量の評価は、培養に伴う金属イオンの溶出量とガス生産量を測定することで行う。令和2年度の結果と合わせて、鉄腐食性メタン生成菌が腐食を起こし得る環境パラメータについてリスト化する。

② 好気環境でのステンレス鋼の微生物腐食試験

令和2年度に引き続き、ステンレス鋼に微生物腐食が発生している培養系を用いて、1F 環境を想定した環境の変動を与え、どのような環境下で腐食が進行し、あるいは、腐食が抑制されるのかを調べる。腐食挙動は、培養中のステンレス鋼電極の電位をモニタリングすることで評価する。令和2年度の結果と合わせて、好気環境でのステンレス鋼に微生物腐食が起こる環境パラメータについてリスト化する。

③ 環境試料を用いた培養試験

令和2年度に引き続き、1F周辺の環境サンプル（河川水や土壌）を用いて、ラボベースでの腐食再現実験を実施する。腐食再現試験には、既に多くの腐食性微生物の培養方法として確立されている嫌気培養を実施するとともに、好氣的な環境での電位モニタリング培養を実施する。嫌気条件での腐食特性の解析は、溶出金属イオン濃度の分析や気相のガス分析により行い、好気条件での腐食性は電位の挙動から判断する。

④ 環境試料及び培養物の微生物群集構造解析

令和2年度に引き続き、培養実験に使用するサンプルからDNAを抽出し、どのような微生物が存在しているのか、次世代シーケンス解析を用いてその微生物群集構造を網羅的に明らかにする。また、培養後の微生物群集構造についても、随時解析を実施し、腐食能と微生物群集構造の相関について検討する。

⑤ オンサイト診断技術に役立つバイオマーカー遺伝子の探索

③の培養物に対してメタゲノム及びメタトランスクリプトーム解析を実施し、金属腐食性を示す培養物における腐食遺伝子類似配列の探索と、腐食性培養物とそうでない培養物の比較解析から、腐食サンプルで高い発現を示す新規な腐食遺伝子を探索する。

2.3.3 1F設備において微生物腐食リスクが高まる環境条件のスクリーニング（再委託先：一般財団法人電力中央研究所、以下「電中研」という）

① 設備環境を想定した環境条件下での腐食試験

令和2年度に選定した培養条件を用いて、腐食性微生物の代表株及び令和2年度採取した環境試料を植菌源とした腐食試験（炭素鋼、ステンレス鋼）を実施する。腐食試験終了後に試験片及び培養液を回収する。

② 微生物腐食の評価及び微生物腐食リスクの高まる環境条件のスクリーニング

②-1 試験材料表面の観察、腐食速度の評価

各培養条件において回収した試験片を酸洗浄し、重量測定を行うことで腐食の進行度合いを評価する。また、試験片表面に明確な付着生成物が形成されている場合には付着生成物を回収し、その成分分析及び含まれる微生物の分析を行う。重量測定後の試験片は、電解放出型走査電子顕微鏡（以下「FE-SEM」という）などにより表面の形状変化を観察し、腐食形態（全面腐食、局部腐食、腐食深さ）を評価する。以上の解析結果を評価することで各培養条件における腐食速度を評価し、微生物腐食が進行しやすい培養条件について把握を行う。

②-2 培養液の分析及び腐食に関与した微生物反応の推定

回収した培養液のイオンクロマトグラフィー、液体クロマトグラフィーによる成分分析を行い、硫酸イオンや硝酸イオン濃度の培養に伴った変化を評価することで、腐食試験期間中に起こった微生物反応を特定する。また、JAMSTECと連携し、培養液に含まれる微生物の量及び種類について遺伝子を指標として解析し、腐食試験中に増殖した微生物を特定する。

2.3.4 1F 周辺環境の微生物の特徴の把握及び微生物腐食挙動の評価（連携先：日本原子力研究開発機構、以下「JAEA」という）

① 1F 周辺環境の微生物の特徴の把握

1F 周辺環境に生息する特徴的な微生物を同定するため、令和 2 年度に培養した微生物の種類を分析する。また、1F サイト周辺の環境サンプリングを追加して行い微生物を培養する。1F 周辺環境に生息する微生物を同定するため、1F サイト周辺の表層水・地下水や河川水の環境サンプリングを行う。また、サンプリングされた水試料中に存在する微生物を培養するための培地の種類や培養条件の検討を行い、最適化された条件で当該水試料中の微生物を培養する。

② 微生物腐食挙動の評価

微生物による材料表面での腐食の影響をマイクロレベル及びナノレベルで評価するため、微生物腐食試験後の試験片の表面形状や局部腐食部位について、令和 2 年度に選定した分析手法及び整備された環境を用いて、材料表面の状態・形状をマイクロレベル及びナノレベルで測定する。また、材料表面を当該スケールで測定・分析するために最適な手法を検討・選定し、分析・測定環境を整備する。

2.3.5 研究推進

研究代表者の下で各研究項目間ならびに廃炉環境国際共同研究センター（CLADS）等との連携を密にして、研究を進める。また、研究実施計画を推進するための打合せや会議等を開催する。

3. 実施内容及び成果

3.1 急速かつ局所的電気微生物腐食の診断と抑止技術の開発

3.1.1 令和2年度までの実施内容及び成果（概要）

① 電気腐食細菌の濃縮技術を利用した鍵酵素群（バイオマーカー）の特定

電気腐食細菌の濃縮技術を利用した鍵酵素群（バイオマーカー）の特定においては、電気腐食細菌を濃縮する材料を合成、分離した菌をタンパク質量で定量することで、細菌量の上限や、粒子量と分離効率の関係に関して分析を進めた。

② オンサイトで電気腐食機構の有無を検査する投げ込み試験片の開発

オンサイトで電気腐食機構の有無を検査する投げ込み試験片の開発においては、Cu、Bi、Zn、Mo、Sbといった金属を10%程度溶解させた鉄合金の作成、それぞれの合金について、まず電気腐食を行う培養細菌株を用いて腐食の速度を重量変化によって比較する実験を完了した。腐食の速度を重量変化によって比較、これらの金属を含まない炭素鋼に比べて、Mo、Sb合金では腐食が阻害され、Cu合金では腐食速度が増加する予想通りの結果が得られた。

③ 培養株を用いた微生物腐食機構速度の各条件での評価と抑制対策法の確立

培養株を用いた微生物腐食機構速度の各条件での評価と抑制対策法の確立においては、1F周辺環境サンプル9種類を回収して実験室に持ち帰り、電気化学実験に用いることができる培地5種類を用いて、土壌サンプルから電気細菌の存在を示す電流値を観測できる条件を明らかにすることができた。

3.1.2 令和3年度実施内容及び成果

① 電気腐食細菌の濃縮技術を利用した鍵酵素群（バイオマーカー）の特定

非電気細菌のモデル菌 *Escherichia coli* K12株に対して外膜シトクロム酵素を持つモデル電気細菌である *Shewanella oneidensis* MR-1株を濃縮できる材料と、分離条件の検討を行った。本技術では、細胞表面の外膜シトクロムの反応性によって特異的に重合反応が進むモノマー分子を特定しており、重合反応後にそのポリマーと高い親和性を持つ官能基を表面に有する磁気ナノ粒子を使って、MR-1株を磁気回収する。K12株とMR-1株の細菌懸濁液それぞれに対して開発したナノ材料を作用させたところ、MR-1株の系ではK12株に比べて20倍のタンパク質を回収できた。さらに、透過型電子顕微鏡による観察を行うとMR-1細胞表面にはナノ粒子が局在しているにも関わらず、K12株表面には全く確認できなかった。次に、MR-1とK12を等量混合した細胞懸濁液からMR-1を回収することが可能か検討した。細胞懸濁液に対して、ポリマー重合反応・磁気回収を行い、得られた磁気ビーズから細菌を分離して電気化学セルに添加、電流生成を測定した。磁気ナノ粒子による処理前（K12:MR-1=1:1）の場合に比べて電流生成が直ちに立ち上がり、最大電流値も大きく増加した。以上の結果は、本手法によってMR-1がK12との混合溶液の中から集積されたことを示している。

次に、福島県内から採取してきた土壌サンプルに対して本手法を適用した結果、電気細菌が集積されることを示す結果が得られた。土壌サンプルをLB培地でインキュベートした後、細菌分画に対してポリマー重合反応・磁気回収を行い、得られた磁気ナノ粒子から細菌を分離して、16S rRNA解析を行った(図3.1-1)。すると、*Enterobacteriaceae*属と*Enterobacteriales*属細菌の割合がそれぞれ3倍、200倍と大幅に増加した。一方で、元々の主要細菌で

ある *Comamonas*、*Microvirgula aerodenitrificans*、*Planococcaceae*は全く検出されなくなった。これらの傾向は、2検体（濃縮後1、2）で再現性よく確認された。さらに、この磁気ナノ粒子によって集積された細菌群による電流生成を30 °CのLB培地中、+0.2 V vs Ag/AgCl KCl sat.の条件で測定すると、直ちに電流値が立ち上がり10時間程度で250 nA程度の電流が観測された。一方で、集積前のサンプルの場合には、電流値はすぐに減衰し、その後上昇はしなかった。電気細菌は、電極上で増殖するため、電子ドナーとなる基質が存在する限り電流値は減少しないのが一般的であり、一時的に見られた電流値は、培地に含まれる基質と電極の非生物的な酸化反応であることが考えられる。本手法によって、電極での培養なしで濃縮された *Enterobacteriaceae*属と *Enterobacterales*属細菌に関しては（濃縮後1、2）電流生成を行った後に、電極表面からも3検体で再現性よく同程度の相対比率で検出され（電気培養後1、2、3）（図3.1-1）、電流生成を担っていたことが考えられる。以上の結果は、本手法によって電気細菌が培養操作なしの簡単な操作で濃縮されることを示しており、環境中からのバイオマーカー探索の効率を大幅に向上すると期待できる。

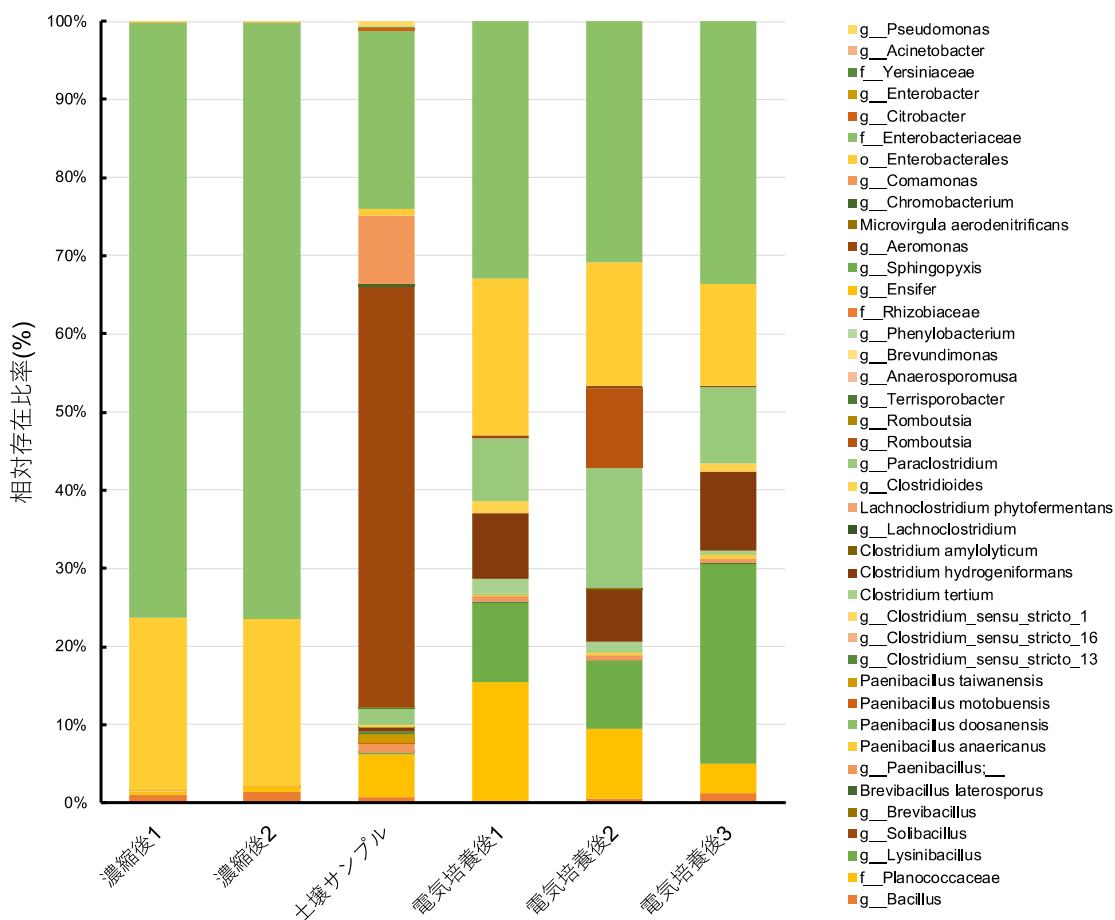


図 3.1-1 開発した磁気ナノ粒子による電気細菌の濃縮前後と電気培養後の微生物群集構造

② オンサイトで電気腐食機構の有無を検査する投げ込み試験片の開発

Cu、Bi、Mo、Sb を 10%溶解させた鉄合金を作成し、モデル電気腐食細菌として用いて腐食速度の比較を行った。ここで、合金が腐食される場合には、生成物である黒サビの組成が変化してその電気導電性が変化することが期待され、令和 2 年度と同様に、電気導電性に応じて腐食速度の変化が観測された。また、合金の作成が難しかった Zn^{2+} に関しては、イオン添加による炭素鋼の腐食速度への影響を重量変化によって検討した。モデル電気腐食細菌と非電気腐食細菌の合計 2 株で検討したところ、腐食速度が減少した。ZnS の電気抵抗率は硫化鉄に比べて相対的に高いため、腐食が阻害されることは予想とよく一致した。一方で、さらに炭素鋼表面に形成される硫化鉄層の導電性を高める工夫を行ったところ、合金以外でも腐食速度が加速されることがわかった。これらの結果は、電気化学測定による腐食速度計測からも支持され、本研究の黒サビの導電率を変化させるアプローチは、腐食速度をある程度制御する上で有効であると考えられる。一方で、大幅な腐食の加速を行うためには、他金属を表面に高濃度に蓄積する新しいアプローチが必要であると考えられた。

そこで、炭素鋼表面を高濃度ドーピングした合金と同様の条件にするためのコーティング剤の開発を行った。3 種の高分子材料に Cu、Ni イオンをドーピングして腐食実験を行い、重量変化を測定した。すると、2 種の高分子材料において硫酸還元細菌が存在することで進む腐食が大きく加速された。そこで、特に効果が高かったポリマー A 材料に関して Cu、Co、Mo、Ni を含有した状態の効果を比較した (図 3.1-2A)。IS5 は、用いた電気鉄腐食細菌であり、黒、赤のバーがそれぞれ菌の有無に対応している。Co 以外の金属 Cu、Mo、Ni において無菌状態に比べて大きく腐食速度が加速されていることがわかる。差分を取って微生物の寄与を絶対値で示した図 3.1-2B を示す (Co に関しては負の値)。Cu を含むコーティング剤では炭素鋼に対して 8 倍程度重量減損量が増加した。CuS は、硫化鉄に比べて導電性が高いことが知られており、比較的高い腐食速度は、CuS の生成が原因である可能性がある。今後は、腐食性生物を解析することで機構を明らかにし、さらなる加速へと繋がることを期待できる。

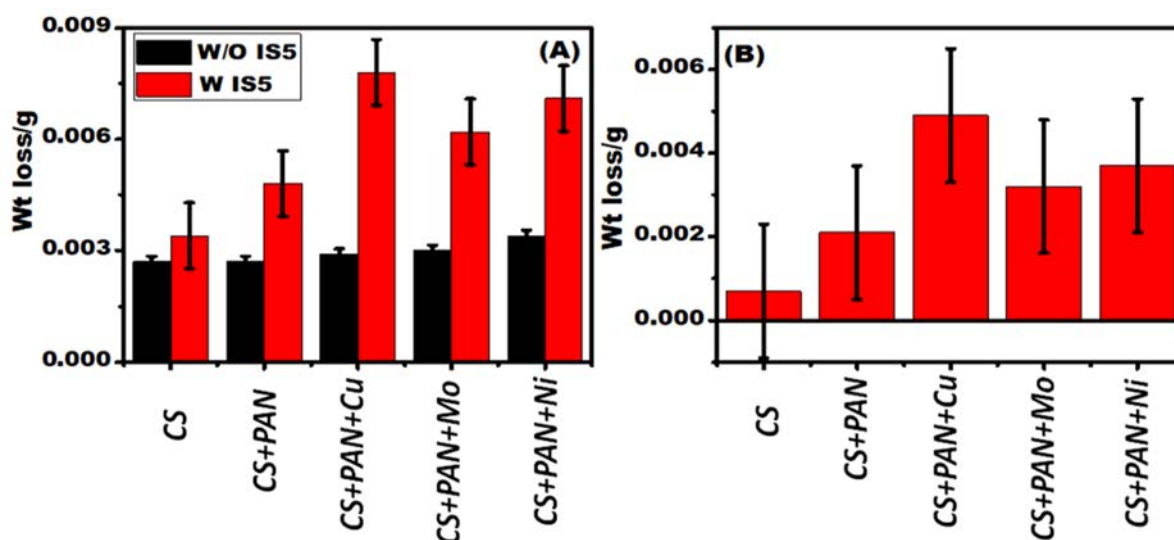


図 3.1-2 炭素鋼と開発したコーティング剤の効果
エラーバーは標準誤差 (n = 2)

③ 培養株を用いた微生物腐食機構速度の各条件での評価と抑制対策法の確立

令和2年度、1F周辺環境に生息する微生物を同定するため、1Fサイト周辺の表層水・地下水や河川水の環境サンプリングを行った。環境サンプリングは、令和2年11月17日(晴れ)に実施、JAMSTEC、電中研と共に様々な条件、培地を用いて炭素鋼を用いた腐食実験を行い、腐食活性を評価した(表3.1-1)。その結果、炭素鋼の嫌気腐食においてpHが腐食速度において重要な要素であることが示された。さらに、NIMSでは、独自のハイスループット電気化学系を用いてサンプリングされた土壌試料中から、新種の可能性が高い微生物を単離した(図3.1-3A)。細菌を集積した電気化学測定系は96ウェルプレートの底辺にカーボンインク電極が、作用電極、対極、Ag/AgCl電極が参照極として印刷されているものを用いた。30℃、200mV vs Ag/AgCl、嫌気条件(窒素99%、水素1%)で、培地には、LB、MB、R2Aを用いたが、電流値の増加はR2A培地からのみ観測された(表3.1-1)。好気条件でR2A寒天培地を用いて培養すると、シングルコロニーが取れ、16S rRNA解析を行うと近縁種として *Cellulomonas algicola* strain NBRC112905、*C. fimi* strain NBRC15513、*C. biazotea* strain NBRC12680 が特定された。相同性はそれぞれ97.9%、97.5%、97.5%であり、これらの近縁種との比較実験からも新種の可能性が極めて高く、近く新種提唱の論文を投稿する予定である。単離された株は、暫定的に *Cellulomonas Sp.* NTE-D12 と名付け、JAMSTECとの共同研究により全ゲノム決定も行った。

NTE-D12株が電気細菌であることを検証するために、近縁種と共に電気化学測定を行った。環境サンプルを集積した際と同様の印刷電極系を用いて、R2A培地で前培養した細菌を、DM電解質培地(表3.1-1のDMGXからxyloseを除いたもの)に懸濁して測定を行った。NTE-D12株は、測定開始後直ちに、グルコース無しのバックグラウンド電流に比べて10nA程度高い電流生成を示し、60nA程度で安定した電流を、測定開始後12時間まで生成することを確認した(n=3)。近縁種3種からも同様に有意な電流生成が観測されたが、NTE-D12株の電流値がより高かった。また、微分パルスボルタメトリー測定から、細胞表面に電子移動を媒介する酵素の存在を示唆する酸化還元種も確認した。以上の結果は、NTE-D12株が電気細菌であることを示している。並行して電気細菌の集積・単離は続けており、今後1F周辺環境サンプルに対してより多様な電気細菌の単離を行い、炭素鋼を使った腐食試験へと移行、条件検討を行う。全研究機関で用いた培地に関して、表3.1-1にまとめた。

3.1.3 まとめ

令和3年度は、電気腐食細菌の濃縮技術を利用した鍵酵素群(バイオマーカー)の特定においては、モデル培養株を用いて電気細菌の濃縮する際の磁性ナノ粒子に対する洗浄条件等の最適化を行い、環境細菌叢に対しての効果を実証することに成功した。電気細菌を簡便かつ短時間に濃縮できることは、該当分野において利用されていた電気培養方法に比べて700倍の時間短縮を実現するものであり、革新的な成果と言える。また、オンサイトで電気腐食機構の有無を検査する投げ込み試験片の開発においては、Cu、Bi、Zn、Mo、Sbといった金属が共存する場合に腐食速度に与える影響を検証し、腐食を10倍程度加速させる表面コーティング剤の開発に成功した。培養株を用いた微生物腐食機構速度の各条件での評価と抑制対策法の確立においては、1F周辺環境サンプルから新種の可能性が高い *Cellulomonas* 属株を単離し、電気化学実験によって電気細菌であることを検証した。



(B)

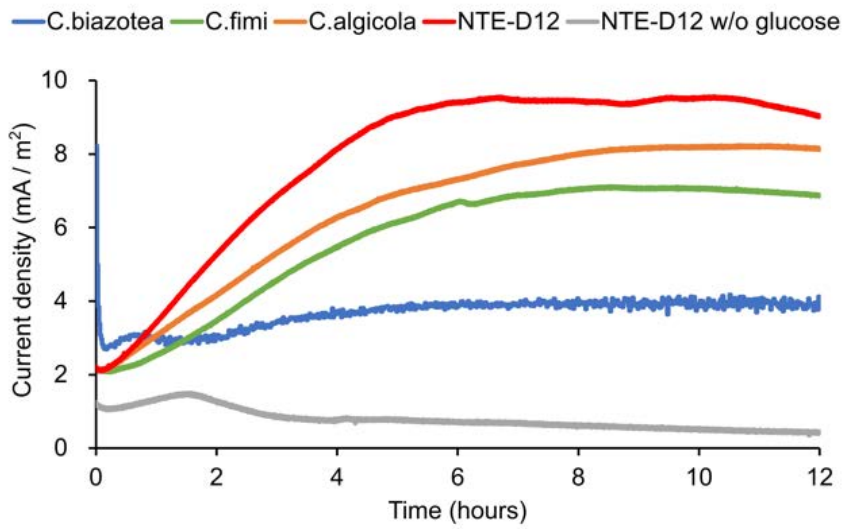


図 3.1-3 単離した NTE-D12 株の電顕像(A)と近縁種との電流生成の比較(B)

表 3.1-1 全研究機関の培地情報まとめ

	培地	組成	培地の特徴	報告書の該当箇所
電流モニタリング培養	LB	Luria-Bertani broth培地を1, 10, 100倍希釈	細菌用栄養培地	3.1.2
	MB	Marine broth培地を1, 10, 100倍希釈	海洋微生物用培地	
	R2A	Reasoner's 2A培地を10倍、100倍希釈	貧栄養培地	
	DM	Roh, Y., et al. [1-1]	海水に近い培地	
電位モニタリング培養	mNB+NaCl培地	1/1000濃度Nutrient Broth、0~10,000 ppm Cl [NaClにて調整]	極貧栄養培地に塩を添加した培地	3.2.2
腐食性微生物の培養 (好気性)	Modified Wolfe's Mineral Medium	ATCC medium: 2672 MWMMを改編 NH ₄ Cl 1.0 g, MgSO ₄ ·7H ₂ O 0.4 g, CaCl ₂ ·2H ₂ O 0.1 g, NaHCO ₃ 1.68 g, Na ₂ SiO ₃ 0.05 g, K ₂ HPO ₄ 0.05 g, KH ₂ PO ₄ 0.05 g(pH6.5) +2.0 g Iron granules	独立栄養性の中性鉄酸化細菌用の培地	3.4.1
腐食性微生物の培養 (嫌気性)	鉄顆粒添加 模擬人工海水培地	鉄腐食性メタン生成菌用培地[1-2]をベースにNaCl濃度を1~5%、pHを5-9に調整した培地	鉄腐食性メタン生成菌用の培地を改変した培地	3.2.2
	Ig-SW	鉄腐食性メタン生成菌用培地[1-2]	鉄腐食性メタン生成菌用の培地	
	Ig-dMB	2.0 g Iron granules、1/10濃度Marine Broth 2216	有機物を栄養塩として生育する塩要求性の微生物を標的とし、鉄腐食能を確認するための純鉄顆粒が入った培地	
	Ig-mNB	2.0 g Iron granules、1/1000濃度Nutrient Broth	生育に塩を要求せず、極貧栄養環境で生育する微生物を標的とし、鉄腐食能を確認するための純鉄顆粒が入った培地	
	Ig-dNB	2.0 g Iron granules、1/10濃度Nutrient Broth	生育に塩を要求せず、有機物を栄養塩として生育する微生物を標的とし、鉄腐食能を確認するための純鉄顆粒が入った培地	
	腐食試験用無機塩培地	鉄腐食試験用培地 [1-3]、鉄粒もしくは炭素鋼試験片を添加	腐食性メタン生成菌、硫酸還元菌の	3.3.2
	Sr処理水タンク想定培地	Sr処理水タンク内の環境を想定し、pH7.0-8.5, Cl 110-2000 ppm, SO ₄ : 54-525.5 ppmの範囲の組み合わせで60条件を設定	鉄腐食性メタン生成菌の培地もしくはVM-I培地をベースとしてSr処理水タンク内の環境を想定した条件に改変した培地	
VM-I培地	従属栄養硫酸還元菌用培地 Wikiel et al [1-4]	栄養塩豊富な培養条件		

参考文献

- [1-1] Roh, Y. et al., Metal Reduction and Iron Biomineralization by a Psychrotolerant Fe(III)-reducing Bacterium, *Shewanella* sp. Strain PV-4, Appl. Environ. Microbiol., vol.72, no.5, 2006, pp.3236-3244.
- [1-2] Uchiyama, T. et al., Iron-corroding Methanogen Isolated from a Crude-oil Storage Tank, Appl. Environ. Microbiol., vol.76, no.6, 2010, pp.1783-1788.
- [1-3] 東京電力ホールディングス株式会社, II. 構内タンク,
https://www.tepco.co.jp/decommission/data/daily_analysis/tank/index-j.html (参照 : 2022 年 3 月 30 日) .
- [1-4] Wikiel, A. J. et al., Impact of *Desulfovibrio Alaskensis* Biofilms on Corrosion Behaviour of Carbon Steel in Marine Environment, Bioelectrochemistry, vol.97, 2014, pp.52-60.

3.2 バイオマーカー遺伝子の探索及びオンサイト診断技術の開発（再委託先：JAMSTEC）

3.2.1 令和2年度までの実施内容及び成果（概要）

① 鉄腐食性メタン生成菌を用いた培養試験

窒素雰囲気下の1F格納容器内に当該微生物が存在した場合のリスクを想定して、当該微生物が1F環境で腐食反応に影響する可能性について検討した。塩濃度0～5%とpH5～9の組み合わせで培養試験を実施し、各条件下での腐食速度を調べた結果、2～3% NaCl、pH6～7で最も腐食が加速され、pH8以上で顕著に抑制されることを明らかにした。

② 好気環境でのステンレス鋼の微生物腐食試験

1F環境では様々な設備においてもステンレス鋼が使用されており、ステンレス鋼材料に対する微生物腐食を検討するために、地下水由来の集積培養物でステンレス鋼に電位貴や腐食発生を誘導する微生物群集を用いて、電位モニタリング培養を実施した。培養に伴いステンレス鋼電極の電位が有意に貴化し、その後突然低下する現象を確認し、電位低下後の試験片には腐食生成物が確認され、実際の腐食挙動を捉えていることが強く示唆された。

③ 環境試料を用いた培養試験

1F周辺の環境サンプル（河川水や土壌）を用いて、ラボベースでの腐食再現実験を実施した。9種類の環境試料を4種類の培養条件で培養した結果、無菌環境で進む無生物的な腐食反応と比較して、有意に腐食を加速させる培養物の取得に成功している（図3.2.1-1）。

④ 環境試料及び培養物の微生物群集構造解析

1F周辺環境から入手したサンプルとラボベースでの培養物の微生物群集の情報を得ることを目的として、原核生物が普遍的に持っている16S rRNA遺伝子を標的とした次世代シーケンス解析を実施するために、DNAを抽出した。全てのサンプルについてDNA抽出に成功しており、令和3年度の実験において解析予定であった。

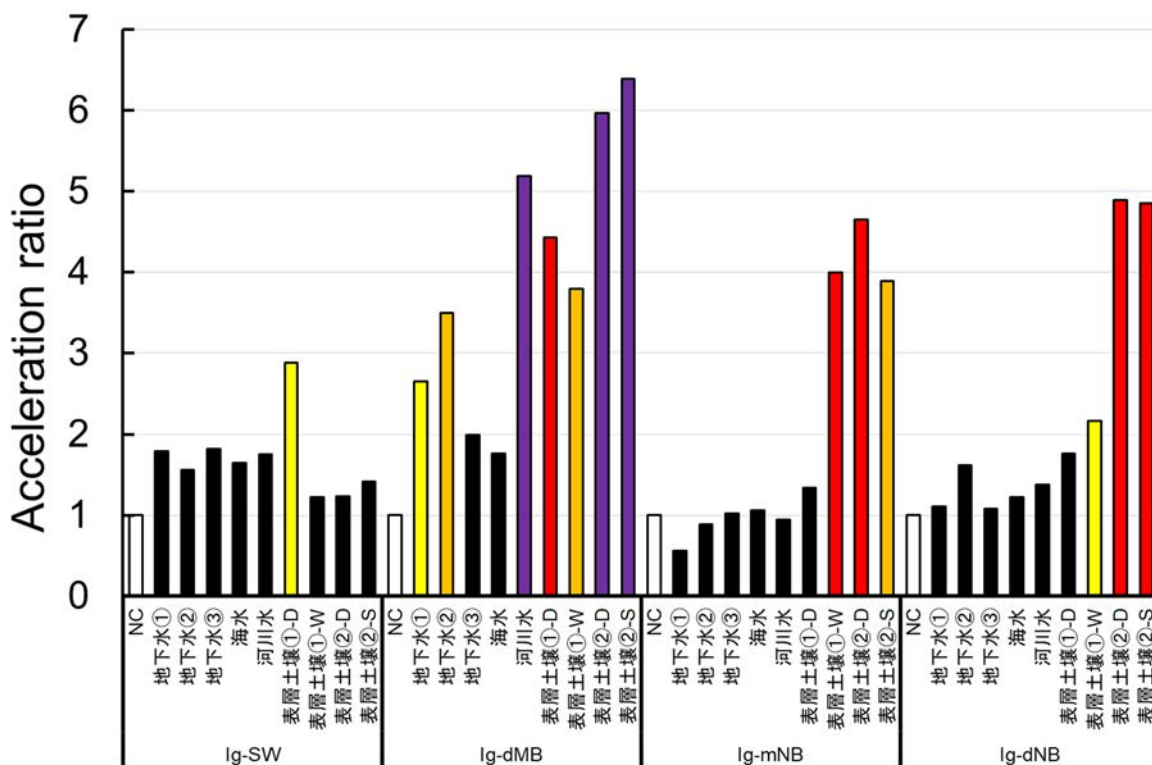


図 3.2.1-1 各培地で培養した時の腐食加速度

3.2.2 令和3年度実施内容及び成果

① 鉄腐食性メタン生成菌を用いた培養試験

令和2年度に引き続き、窒素雰囲気下の1F格納容器内に当該微生物が存在した場合のリスクを想定して、当該微生物が1F環境で腐食反応に影響する可能性について検討した。具体的には、想定される1Fの環境水組成等の条件を用いて鉄腐食性メタン生成菌を培養し、各環境下での腐食速度についてデータを集積した。令和2年度までに、塩濃度とpHについて評価が完了していたため、微生物の活動に影響する温度について検討した。

鉄腐食性メタン生成菌 *Methanococcus maripaludis* KA1 株[2-1]を、鉄顆粒添加模擬人工海水培地 (2% NaCl, pH 7.0) にて2週間 37 °Cで培養し、この培養物を接種源として、20 °C、25 °C、30 °C、37 °C及び50 °Cで培養した。腐食量の評価は、培養に伴う金属イオンの溶出量とガス生産量を測定することで行った。

本菌の生育至適温度である37 °Cで最も高い腐食活性が確認され、温度の低下に伴い腐食活性は低下した (図 3.2.2-1)。また、本菌の生育が難しい50 °Cでは、ケミカルな腐食に由来する水素発生は確認できたが、本菌のエネルギー代謝産物であるメタンを検出することはできなかった。以上から、屋外タンク等で想定される温度 (20~25 °C) においては、比較的腐食活性が低いことが明らかになった。特に、20 °Cにおいては、ケミカル腐食で発生する量と同程度の腐食しか起こっておらず、20 °C以下に管理できるのであれば、鉄腐食性メタン生成菌によって加速されても腐食は起こらないと言える。

令和2年度との結果とも合わせることで、鉄腐食性メタン生成菌による腐食を想定した場合、アルカリ性・低塩・低温に維持管理することで本菌による腐食は最低限に抑えることができるだろう。また、夏場は屋外タンク等の環境水の水温が上昇することが想定されるため、温度管理が難しい環境では、アルカリ環境を維持することが腐食低減に効率である。

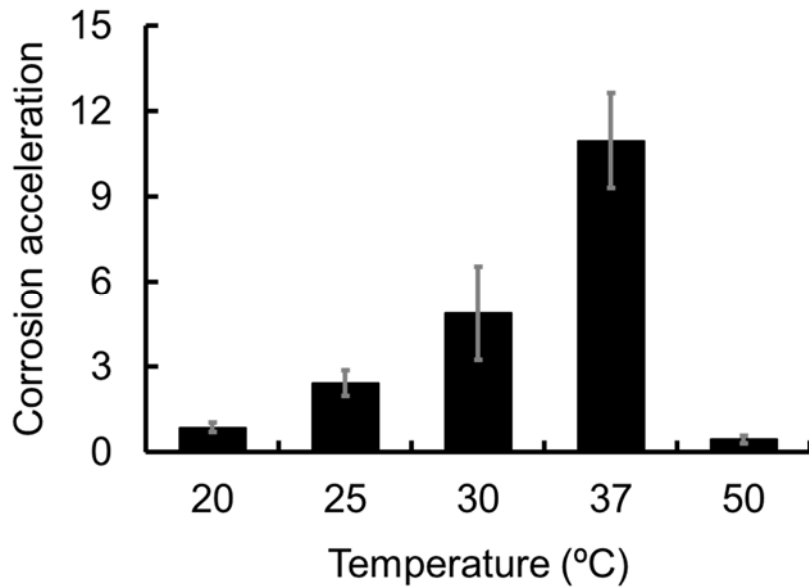


図 3.2.2-1 異なる温度での鉄腐食性メタン生成菌による鉄腐食無菌区の腐食量に対する鉄腐食性メタン生成菌による腐食量の相対比として表しており、無菌区でのケミカルな腐食量と、植菌区での腐食量が同じ時を1として算出している。エラーバーは、 $n=3$ の実験から得られた標準偏差を表している。

② 好気環境でのステンレス鋼の微生物腐食試験

1F 環境では様々な設備においてもステンレス鋼が使用されており、ステンレス鋼材料に対する微生物腐食を検討するために、令和 2 年度に引き続き、地下水由来の集積培養物でステンレス鋼に電位貴や腐食発生を誘導する微生物群集を用いて電位モニタリング培養を実施した。1F 環境では、損傷を受けた建屋に地下水が流入しており、このような環境にどのような環境要因の変動が起こると腐食発生に繋がるかを検討するために、塩化物イオン濃度を変えて SUS316 ステンレス鋼電極に対する電位変化をモニタリングした。

電位モニタリング培養に用いる作用電極は、溶接線加工された SUS316 ステンレス鋼 (50×20×10 mm) に穴あけ加工を行い、穴加工部分に樹脂被覆銅線を結線し、絶縁性のシリコン樹脂で結線部を被覆することで作製した。参照電極には、銀・塩化銀電極を用いた。250 mL 容量のメディウム瓶に 200 mL の試験液を入れ、被せ式シリコ栓 (C-55) をセットし、シリコ栓のメッシュ状シリコン部分に樹脂被覆銅線を貫通させ、電圧ロガー (日置電機株式会社 LR5042) と結線した。試験液には、1/100 濃度の Nutrient Broth を添加し、NaCl を用いて塩化物イオン濃度を 200、500、1,000、2,000、5,000 及び 10,000 ppm に調節した。この培地にステンレス鋼腐食性集積培養物を接種し、30 °C で培養しながら、電位を 5 分間隔でロギングした。

ステンレス鋼の不働態皮膜の破壊に寄与する塩化物イオン濃度が 10,000 ppm の時、培養開始時よりコンスタントに低い電位 (-0.20 ~ -0.25 V) を示した (図 3.2.2-2)。これは、微生物の寄与は関係なく、塩化物イオン濃度の影響が出ていると考えられる。一方で、塩化物イオン濃度を 5,000 ppm に下げたところでは、-0.18 V の低い電位を維持した後で、約 130 時間後に電位の上昇を示した。同様に、塩化物イオン濃度が 1,000 ppm の場合においても約 120 時間後に電位が上昇した。これらの塩化物イオン濃度では、電位が急上昇した時点で不働態皮膜の再生が起こっていると考えられる。他方、塩化物イオン濃度を 200 ppm とした時、徐々に電位が上昇し、-0.1 V 付近で推移している。48 時間の時点で電位が急激に減少し、再び上昇していることから、不働態皮膜破壊が起こるも短い時間で不働態皮膜再生が起こったものと考えられる。

以上の結果より、塩化物イオン濃度としては 200 ppm 以下に制御しておくことが重要であり、1,000 ppm を超えると腐食発生リスクが著しく上昇すると考えられる。令和 2 年度までの結果を踏まえると、塩化物イオン濃度は 200 ppm 以下に制御すると共に、微生物の栄養塩が供給される環境では特に注意が必要であり、塩化物イオン濃度の制御が難しい環境に環境水が連続的に流入する場合には、積極的な殺菌処理が必要であると提言する。

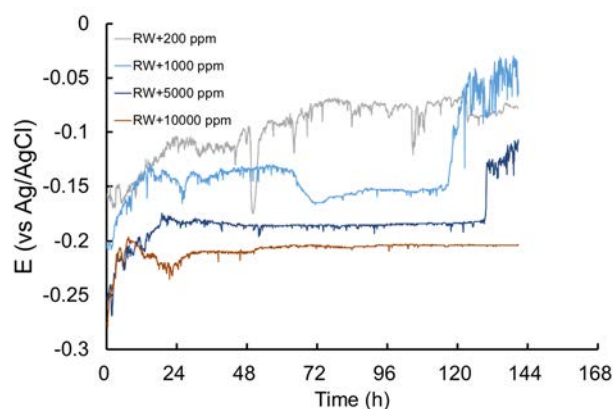


図 3.2.2-2 様々な塩化物イオン濃度下での SUS316 試験片電極の電位挙動

③ 環境試料を用いた培養試験

1Fでは損傷を受けた建屋内に環境水が流入している環境にあり、環境サンプルに潜在的に含まれる腐食性微生物のリスクを完全に排除することが難しい。また、腐食性の微生物の全容は微生物腐食研究においてもブラックボックスとなっており、環境中の微生物群集構造解析だけでは微生物腐食のリスクを可視化することは現状難しい。そこで、本項目では、1F周辺の環境サンプル（河川水や土壌）を用いて、ラボベースでの腐食再現試験を実施する。腐食再現試験には、既に多くの腐食性微生物の培養方法として確立されている嫌気培養を実施するとともに、好気的な環境での電位モニタリング培養を実施する。嫌気条件での腐食特性の解析は、溶出金属イオン濃度の分析や気相のガス分析により行い、好気条件での腐食性は電位の挙動から判断する。

単一の培地で培養可能な微生物種は限られている反面、個々の微生物種に最適化された培地は1,000種類以上存在するため網羅的に培養することは難しい。一方で、最適化された培地は栄養塩濃度が自然環境ではありえないほどの高濃度で設定されていることが多く、実際に腐食が懸念される環境とは大きく異なることから、本実験では有機物フリーあるいは希薄な栄養塩存在下、金属鉄顆粒と培養することで加速的な鉄溶解が起こるかどうかなかを検討した。

令和2年度にサンプリングを行い、培養を開始した電位モニタリング培養において、電位の著しい変化（図3.2.2-3）と試験片表面における腐食発生を確認した（図3.2.2-4）。腐食の発生部位の多くは溶接線上であったが、河川水（No.4）の培養物では平面部位に孔食が発生していることが確認された。小良浜古墳表層土壌（No.6：表層土壌②-S）は、電位挙動に大きな変化はなく、培養試験後にも腐食は観察されなかった。一方で、小良浜古墳深部土壌（No.5：表層土壌②-D）、学びの森裏手河川乾燥土壌（No.7：表層土壌①-D）、学びの森裏手河川水＋土壌（No.8：表層土壌①-W）、及び、病院駐車場脇湧き水（No.9：地下水③）においては、培養期間中での急激な電位のシフトが観察された。また、培養試験後の試験片においても溶接線上や近傍に腐食が発生していた。電位の急激なシフトと腐食の相関は明らかにできていないが、腐食が発生した試験片電極においてのみこの電位シフトが生じており、腐食とリンクした挙動であると推定される。

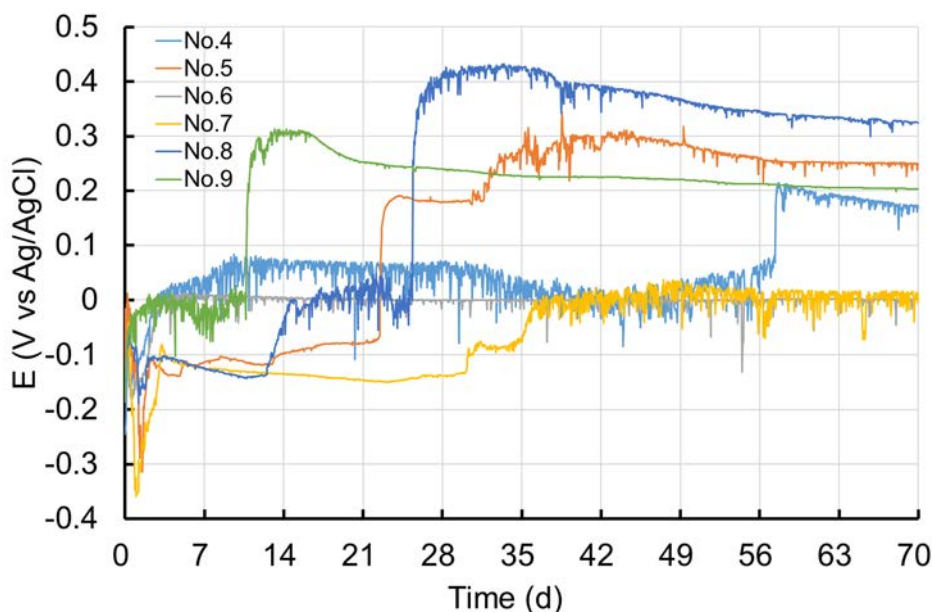


図 3.2.2-3 電位モニタリング培養における電位挙動

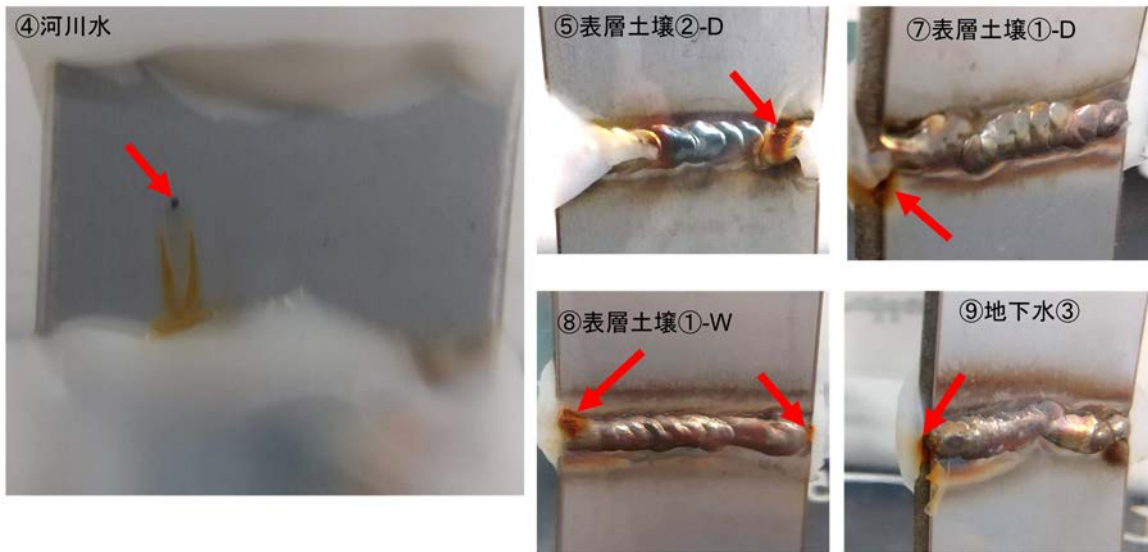


図 3.2.2-4 電位モニタリング培養後に確認できた腐食

令和 3 年度では、新たに 8 つの環境試料（いわき市温泉水、坂下ダム湖水、坂下ダム周辺土壌①～⑥）を採取し、それぞれを用いて令和 2 年度と同様の 4 種の培地（Ig-dMB、Ig-ASW、Ig-dNB、Ig-mNB）を用いて培養した。1 か月培養後の培養物の鉄濃度を測定し、無菌区に対する腐食加速度を求めた結果、最大 1.8 倍程度であった（図 3.2.2-5）。令和 2 年度の培養サンプルでは、無菌区に対して 6 倍以上の腐食加速度が観察されており、これまでに試験した培養物の中では令和 2 年度の物が最も高いと言える。

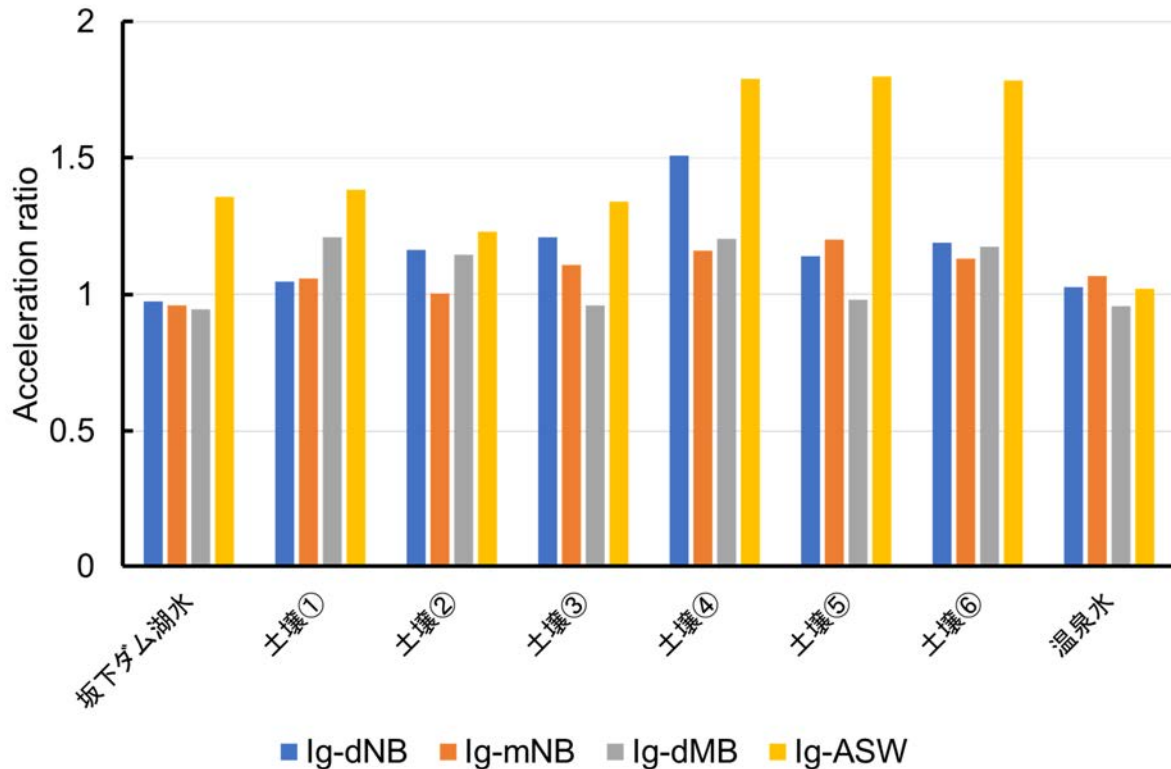


図 3.2.2-5 各培地で培養した時の腐食加速度

④ 環境試料及び培養物の微生物群集構造解析

培養実験は培養可能な微生物の能力を知る方法としては有効であるが、培養可能な微生物は限られており環境中に潜在的に存在する微生物群集の情報を得るためには遺伝子解析が有効である。本実験では、1F 周辺環境から入手したサンプル中の微生物群集とラボベースでの培養実験で腐食能の有無を調べている培養物の微生物群集の情報を得ることを目的としている。微生物群集構造の解析には、原核生物が普遍的に持っている 16S rRNA 遺伝子を標的とし、次世代シーケンサを用いたアンプリコンシーケンシングにより実施した。

令和 2 年度及び令和 3 年度に採取した環境サンプル全てから DNA を抽出した。水試料は、孔径 0.22 μm のメンブレンフィルターでろ過をして微生物を集積し、このメンブレンフィルターから DNA を抽出した。土壌試料は、湿重量 0.5 g から DNA 抽出を実施した。DNA 抽出には、ZymoBIOMICS DNA/RNA Miniprep Kit (Zymo Research 社) を用いて、取り扱い説明書に従い微生物由来の DNA を抽出した。また、培養実験の培養物からも同キットを用いて DNA 抽出を実施した。

抽出した DNA を鋳型にして細菌とアーキアの 16S rRNA 遺伝子を標的とした U530F/U907R プライマー[2-1]を用いた PCR により遺伝子断片を増幅した。これらの PCR 断片にサンプル識別用のインデックス配列を付与し、次世代シーケンサ MiSeq (Illumina 社) を用いてシーケンシングを行った。得られた fastq ファイルを用いて QIIME2 パイプライン[2-2]により、操作上分類単位 (OTU) の系統解析、α 多様性解析、β 多様性解析を実施した。

環境サンプルの α 多様性解析の結果を図 3.2.2-6 に示す。α 多様性はサンプル内の種の多様性を表す指標であり、ここでは Chao1[2-3]と Shannon index[2-4]について示す。Chao1 は観測種数をベースとして希少種に重みを付けた値であり、比較的観測種数に近い値となっており、

また、土壌試料においては高い数値となっており、地下水①や温泉水では極めて小さい値となっている。すなわち、土壌試料では種の多様性が高く、地下水①や温泉水では種の多様性が低いことを示している。Shannon index はサンプル全体に対する種の割合に基づいて計算される値であり、Chao1 と同様に、土壌試料で種の多様性が高く、水試料で中間程度、地下水①と温泉水で低い値となっている。また、実環境からサンプルから持ち込まれる場合、地下水として流入してくるが、土壌粒子を含んだ地下水が建屋等に流れ込んでいる場合、多様性に富んだ環境微生物が建屋環境に持ち込まれていることになり、より多くの微生物種に対する腐食の可能性を考える必要があるだろう。

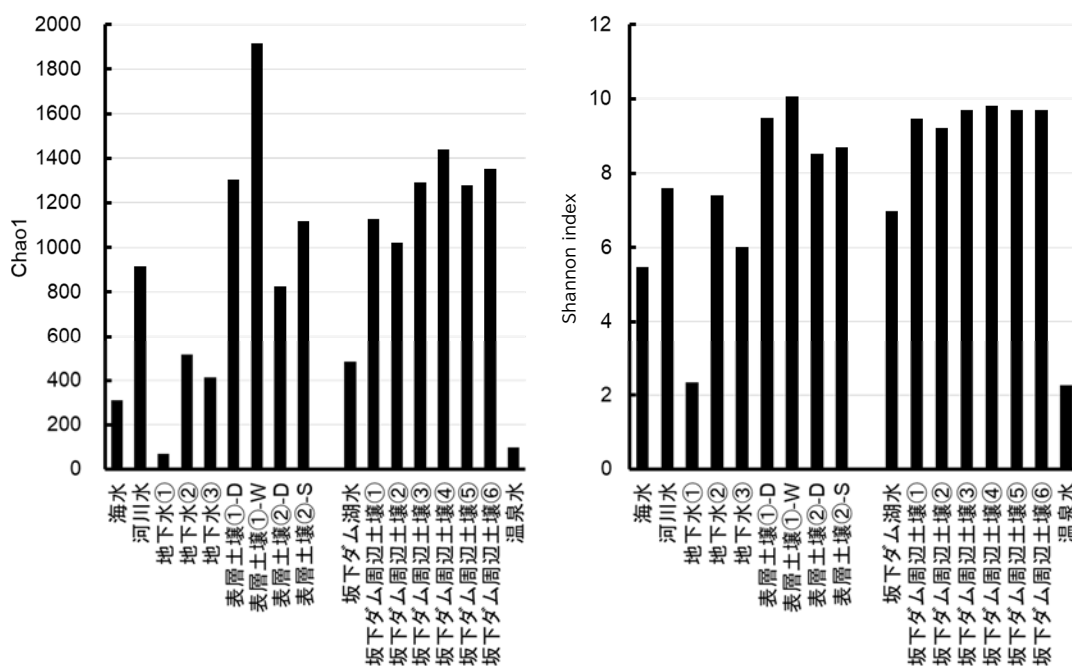


図 3.2.2-6 採取した環境サンプルの α 多様性

次に、 β 多様性解析の結果を PCoA プロットとして図 3.2.2-7 に示す。 β 多様性はサンプル間の多様性を調べる手法であり、ここでは UniFrac 距離に基づいてそれぞれのサンプルを構成する微生物群集の構造の違いをプロットしている[2-5]。すなわち、各プロット間の距離が微生物群集構造の類似度を反映しており、近くにプロットされるものほど似ていて、離れた場所にプロットされるものほど異なる。土壌試料と水試料を丸枠で囲みクラスターとしてみた場合、土壌試料と水試料は完全に分けることができ、かつ、土壌試料と水試料のそれぞれのクラスターは細長い円を形成しており各クラスターの中でもかなり異なるようである。特に種の多様性の低い温泉水や地下水①は他のプロットからもっとも離れた位置にあり、他の環境試料と比較してユニークな微生物群集構造を形成している。

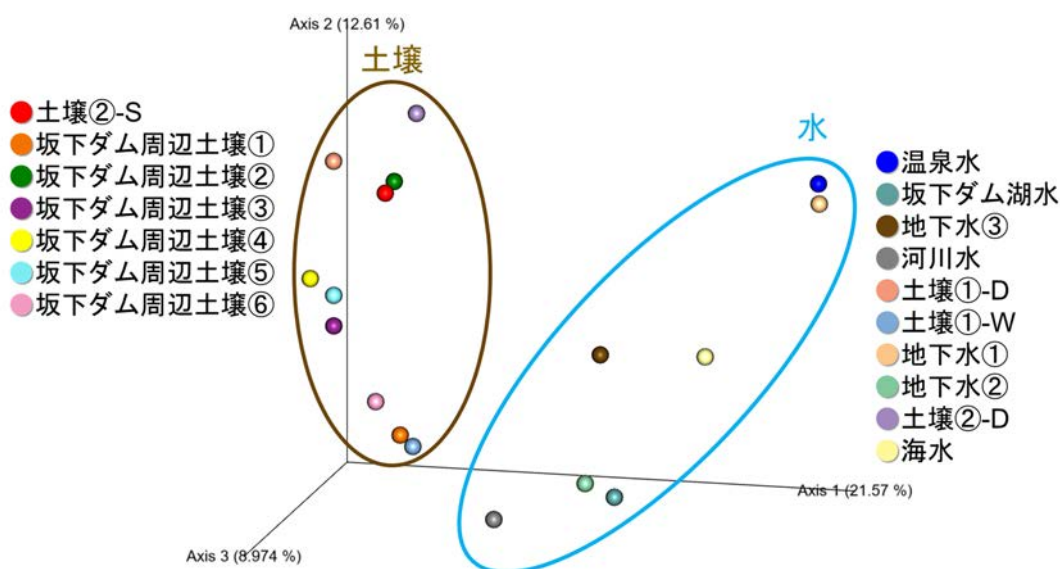


図 3.2.2-7 PCoA プロット (unweighted UniFrac)

次に、各環境試料に含まれる微生物群集構造を微生物の系統分類における門レベル（上位レベルから、界・門・綱・目・科・属・種。下位程種類が多い。）で相対存在比として図 3.2.2-8 に示した。全体で Bacteria 界と Arachaea 界に渡り、51 門の微生物種が検出され、幅広い系統分類に渡る微生物種を含む環境試料が採取できたと評価できる。種の多様性の低い地下水①と温泉水は、96%以上が Proteobacteria 門で占められており、水試料に比べて土壌試料において Acidobacteriota 門が多い傾向にあった。また、微生物腐食において注目度の高い硫酸塩還元細菌を多く含む Desulfobacterota 門[2-6]は主に土壌試料で検出され、表層土壌①-W で最も高い存在比（約 6%）であった。

また、同様に種レベルでの構成を調べた結果、全体で 2,485 種が検出されている。本研究では、1F の敷地内や建屋内の試料を入手することはできていないが、建屋内に連続的に流入している地下水を想定したサンプリングを実施しており、1F の建屋内においても同様に非常に多様な微生物種が外部環境から持ち込まれていると推察され、これらの微生物による腐食活性やバイオマーカーを特定することが今後重要である。

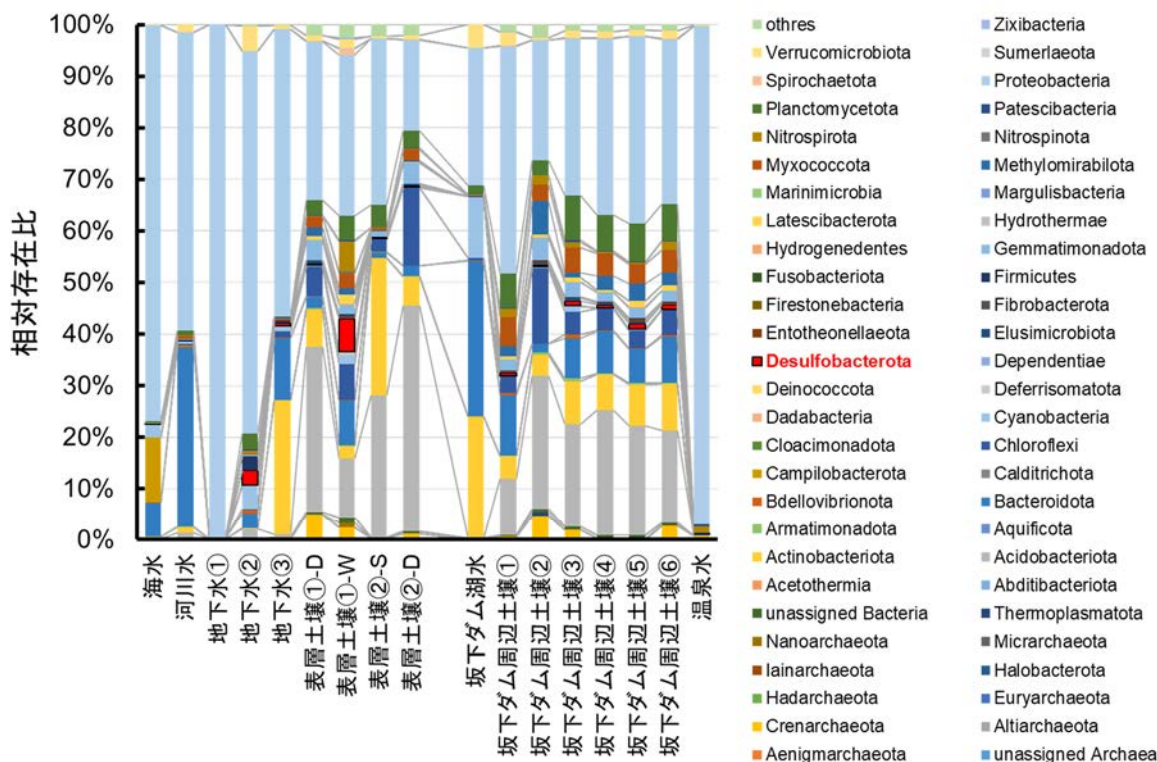


図 3.2.2-8 各環境試料の微生物群集構造 (門レベル)

これらの環境サンプルを用いて培養実験を行った後の微生物群集構造を図 3.2.2-9 に示した。嫌気培養を実施した培養物 (Ig から始まる培養物及び F から始まる培養物) の幾つかにおいて、赤いバーで示したメタン生成菌を含む Euryarchaeota 門や黒いバーで示した Desulfobacterota 門の集積が見られた。特に、電中研において高い腐食活性が示されている培養物 (F から始まる培養物) ではこの特徴が顕著であり、鉄腐食性メタン生成菌の純粋分離に至った結果 (3.3.2) とも一致している。一方で、JAMSTEC において実施した多嫌気培養において、高い腐食活性を示した IgdMB-Soil2S (Ig-dMB 培地—表層土壌②-S) や IgdMB-Soil2D (Ig-dMB 培地—表層土壌②-D) では、メタン生成菌や硫酸塩還元細菌がほとんど検出されず、Firmicutes 門が全体の 86%以上を占めている。使用した環境試料において Firmicutes 門の相対存在比は低く、この Firmicutes 門の中に腐食性の微生物が含まれると考えられる。

Firmicutes 門のどの微生物種が腐食活性の高い培養物で多いのかを属レベルまで解像度を上げて解析を行った結果、IgdMB-Soil2S では、*Desulfosporosinus* 属細菌 (硫酸塩還元細菌)、*Sporomusa* 属細菌 (酢酸生成菌)、*Desulfotomaculales* 目細菌 (硫酸塩還元細菌) が、21.1%、18.4%、12.4%、6.7%となっており、Desulfobacterota 門以外の硫酸塩還元細菌が濃集していることが明らかになった (図 3.2.2-10)。また、一緒に検出されている *Sporomusa* 属の酢酸生成菌においては、鉄腐食性酢酸生成菌が報告されており [2-7]、本菌も腐食に寄与している可能性が高い。同様に、腐食活性の高い IgdMB-soil2D でこれらの微生物の濃集が確認され、同じ環境試料由来ながら腐食活性の低い IgSW-soil2S や IgSW-soil2D では検出されなかった。以上の結果より、腐食活性の高い培養物では Firmicutes 門に属する腐食性微生物がその腐食能に寄与していることが強く示唆された。

また、好氣的な環境での電位モニタリング培養における電極表面のバイオフィーム（SUS-BF）の微生物群集構造では、Proteobacteira 門と Firmicutes 門で 60~99%を占めていた。電位モニタリング培養では、SUS-BF 4、5、7、8、9 で電位の顕著な変化と腐食発生が確認されているが、電位の変化がほとんどない他のサンプルでも同様の結果となっており、微生物群集構造レベルでは腐食性の微生物の有無を議論するのは難しい。

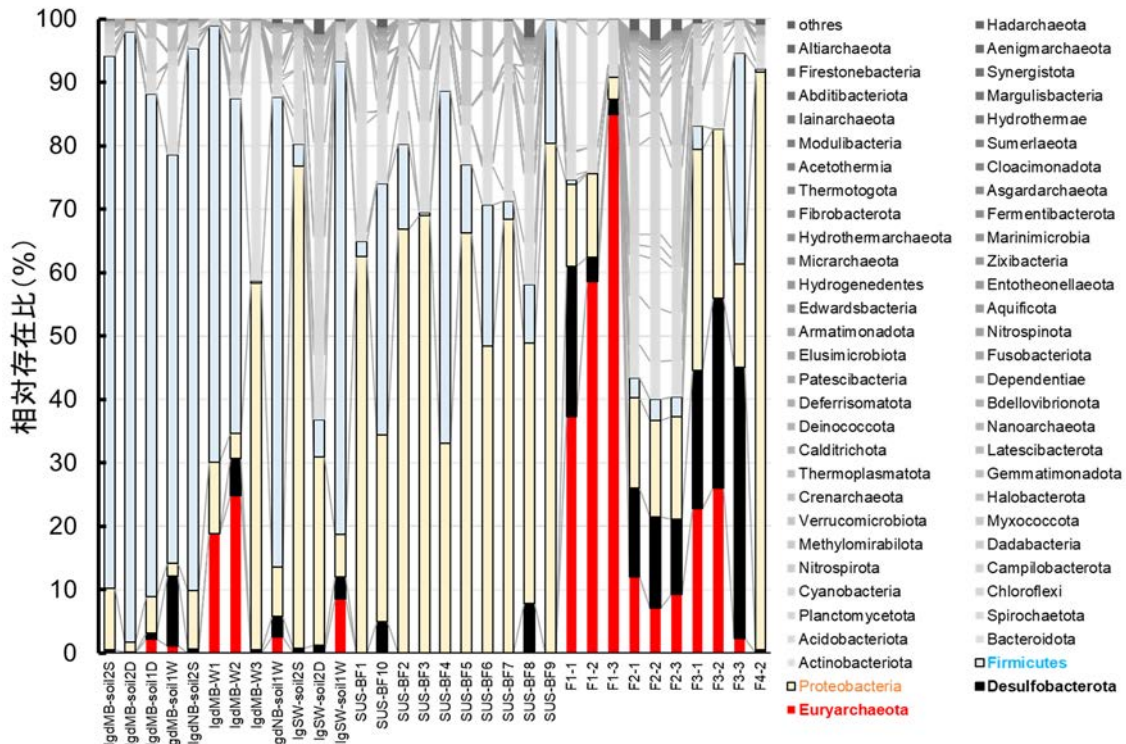


図 3.2.2-9 各培養物の微生物群集構造（門レベル）

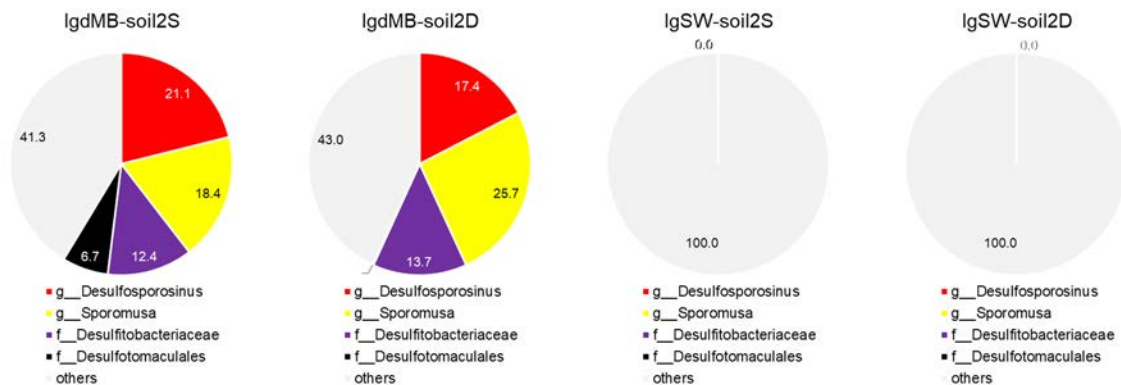


図 3.2.2-10 腐食活性の高い培養物と低い培養物の微生物群集構造（属レベル）

⑤ オンサイト診断技術に役立つバイオマーカー遺伝子の探索

④で実施した微生物群集構造解析は、その環境や当該培養物中の微生物群集構造に関する情報だけであり、その腐食活性に対する生体分子の情報が含まれていない。そこで、腐食活性に関与する既知の遺伝子情報や新規の遺伝子情報をバイオマーカーとして抜き出すために、メタゲノム及びメタトランスクリプトーム解析を実施した。

培養物から ZymoBIOMICS DNA/RNA Miniprep Kit (Zymo Research 社) を用いてメタゲノム解析用に DNA を、メタトランスクリプトーム解析用に RNA を抽出した。また、純粋分離株からの全ゲノム解析のためには、Quick-DNA HMW MagBead Kit (Zymo Research 社) を用いて長鎖 DNA を回収した。メタゲノム及びメタトランスクリプトームのためのシーケンシングには、次世代シーケンサ MiSeq (Illumina 社) を用い、全ゲノム解析のためのシーケンシングには MinION (Oxford Nanopore Technologies 社) を用いた。

NIMS において純粋分離された電気化学活性を持つ新規 *Cellulomonas* sp.株について、全ゲノム解析を終了した。MiSeq から得られたショートリード配列と MinION から得られたロングリード配列を用い、Unicycler[2-8]を用いたハイブリッドアセンブリを実施した。環状構造を持つ 3,684,286 塩基対からなるゲノムと 5,386 塩基対から成るプラスミドの全配列が決定された。DDBJ が提供する DFAST を用いてアノテーションを行った結果、3,450 個の遺伝子が見つかった。細胞外電子伝達を担う生体分子として外膜マルチヘムタンパク質を探索したが、ヘム結合モチーフ (Cys-Xxx-Xxx-Cys-His アミノ酸配列) を複数持つ生体分子は検出されなかった。本菌はグラム陽性細菌であり、グラム陽性細菌では細胞最外層に肉厚なペプチドグリカン層を持つことからフラビンを介した細胞外電子伝達能が報告されている。本菌においても、外膜マルチヘムタンパク質を介さないフラビン経由の細胞外電子伝達能が電気化学活性に寄与していると考えられ、今後、外膜マルチヘムタンパク質に加えてフラビン系細胞外電子伝達システムのバイオマーカーの探索として重要な知見を得たと言える。

3.2.3 まとめ

本研究項目の最終的な目的は、1F 環境での腐食リスクになる微生物のバイオマーカー遺伝子の特定及びオンサイトで実施可能な遺伝子診断方法の確立であり、令和 3 年度では、バイオマーカー遺伝子の特定のために重要な 1F 環境で起こり得る微生物腐食に対して情報を獲得すると共に、1F 周辺環境試料から腐食性微生物を培養し、バイオマーカー遺伝子候補の探索を進めた。令和 2 年度に引き続き、既知の腐食性微生物が 1F で想定される環境内でどのような腐食活性を示すか検討を行い、鉄腐食性メタン生成菌による腐食では pH をアルカリにコントロールすることが有効であり、好気的な環境でのステンレス鋼腐食では塩化物イオン濃度のコントロールが重要であることが示された。また、1F 周辺環境の様々な環境試料を用いて培養及び遺伝子解析実験を実施し、1F 建屋に浸入する地下水を想定した場合、非常に多様性に富む微生物が持ち込まれている可能性を示唆し、その中には高い腐食活性を持つものも示唆された。また、培養物等のメタゲノム・メタトランスクリプトーム解析が進行中であり、得られた膨大な塩基配列データの中から今後バイオマーカーと成り得る遺伝子情報の特定を進める。

参考文献

- [2-1] Caporaso, J. G. et al., Ultra-high-throughput Microbial Community Analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq Platforms, *ISME J.*, vol.6, no.8, 2012, pp.1621-1624.
- [2-2] Bolyen, E. et al., Reproducible, Interactive, Scalable and Extensible Microbiome Data Science Using QIIME 2, *Nature Biotechnol.*, vol.37, no.9, 2019, pp.852-857.
- [2-3] Chao, A., Nonparametric Estimation of the Number of Classes in a Population, *Scand. J. Stat.*, vol.11, no.4, 1984, pp.265-270.
- [2-4] Shannon, C. E., A Mathematical Theory of Communication, *Bell Sys. Tech. J.*, vol.27, no.3, 1948, pp.379-423.
- [2-5] Lozupone, C. A. et al., Quantitative and Qualitative β Diversity Measures Lead to Different Insights into Factors that Structure Microbial Communities, *Appl. Environ. Microbiol.*, vol.73, no.5, 2007, pp.1576-1585.
- [2-6] Waite, D. W. et al., Proposal to Reclassify the Proteobacterial Classes *Deltaproteobacteria* and *Oligoflexia*, and the Phylum *Thermodesulfobacteria* into Four Phyla Reflecting Major Functional Capabilities, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, vol.70, no.11, 2020, pp.5972-6016.
- [2-7] Kato, S. et al., Isolation of Acetogenic Bacteria that Induce Biocorrosion by Utilizing Metallic Iron as the Sole Electron Donor, *Appl. Environ. Microbiol.*, vol.81, no.1, 2015, pp.67-73.
- [2-8] Wick, R. R. et al., Unicycler: Resolving Bacterial Genome Assemblies from Short and Long Sequencing Reads, *PLoS Comput. Biol.*, vol.13, no.6, 2017, e1005595.

3.3 1F 設備において微生物腐食リスクが高まる環境条件のスクリーニング(再委託先:電中研)

3.3.1 令和2年度までの実施内容及び成果(概要)

設備環境を想定した環境条件下での腐食試験

(i) 腐食試験における培養条件の選定

1F 設備(処理水タンク底部、格納容器トールス部、使用済燃料プール等)における微生物腐食リスクを評価するため、これらが晒される環境を想定した種々の環境条件下での腐食試験(培地組成、塩素濃度、pH、温度、溶存酸素量、試験材料等)が必要である。そこで、1F 設備が晒されうる環境条件を公知情報から収集し、条件の範囲を Sr 処理水タンク:pH 7.1~8.4、Cl 濃度 500~2,600 ppm、 SO_4^{2-} 濃度 54~450 ppm(図 3.3.1-1)、ALPS 処理水タンク:pH 8.4~8.9、Cl 濃度 2,700~4,800 ppm、 SO_4^{2-} 濃度 290~6,000 ppm、格納容器:1~3 号機で異なり地下水(淡水)~海水の条件と推定した。本情報をもとに腐食試験に用いる試験条件の選定を行った。

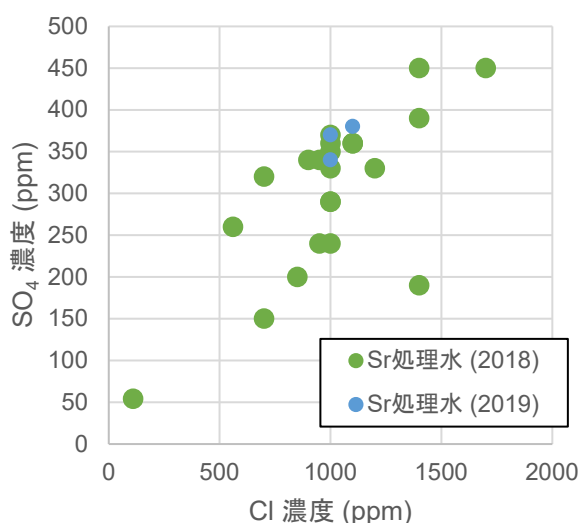


図 3.3.1-1 Sr 処理水タンク内の Cl、 SO_4 濃度の範囲

(ii) 微生物試料の取得及び実験条件の確立

既報の腐食微生物を用い、腐食活性を評価するための室内腐食試験系を確立した。この室内腐食試験系を用い、1F サイト周辺の地下水、河川水、海水を植菌源として種々の栄養条件下において鉄顆粒を用いた集積培養を行った結果、一部の培養条件において非植菌区と比較して腐食促進が確認され、腐食微生物の増殖が推定された(図 3.3.1-2) [3-11]。

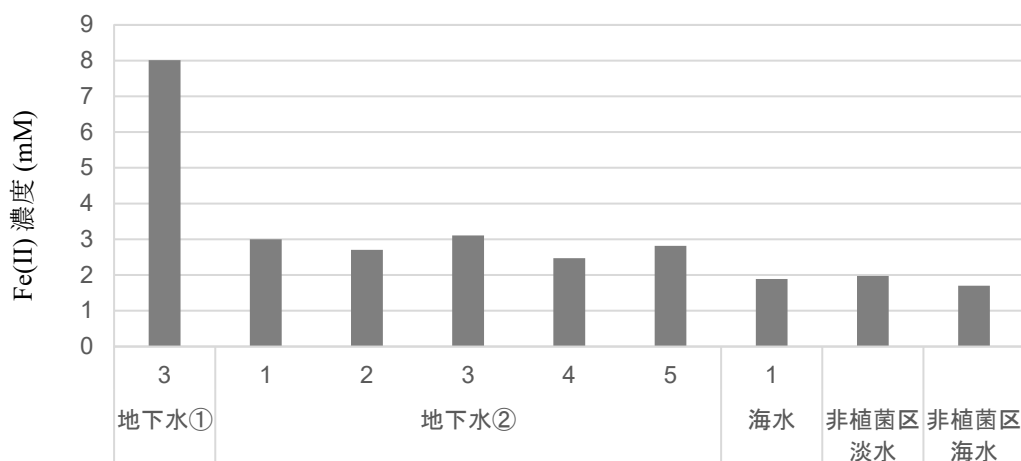


図 3.3.1-2 無機塩培地（有機物添加無し）を使った培養条件における
植え継ぎ培養液中の Fe(II)濃度

3.3.2 令和 3 年度実施内容及び成果

① 設備環境を想定した環境条件下での腐食試験

令和 2 年度に続き、1F 周辺より採取した水試料に含まれる微生物の腐食活性を評価するために、(i) 水試料を使った炭素鋼の室内暴露試験を実施するとともに、(ii) 水試料から腐食を引き起こす微生物を単離し、(iii) Sr 処理水タンクの水質を想定した条件での腐食試験を行った。

(i) 採水試料を用いた室内暴露試験

令和 2 年 11 月に 1F 周辺において採取した地下水（2 検体:GW1、GW2）、河川水（RW）、海水試料（SW）に腐食性微生物が含まれているか、また、これら水試料が炭素鋼と接触した際の微生物腐食リスクを評価するため、炭素鋼の室内暴露試験を実施した。各水試料 10 mL を添加したガラスバイアル瓶（50 mL 容器）に炭素鋼試験片（SS400、0.8 cm 角、#400 で研磨）1 枚を浸漬し、ブチルゴム栓で密栓後、気相部分を混合ガス（ $N_2:CO_2=8:2$ ）で置換した。気相置換後、25℃に設定した恒温機において 6 か月間静置培養を行った（非滅菌区、繰り返し数 $n=3$ ）。また、フィルターろ過滅菌（0.22 μm ）を行った水試料 10 mL を使った滅菌区を対照として設定した（繰り返し数 $n=3$ ）。6 か月の培養試験後、炭素鋼試験片を取り出し、表面に付着した腐食生成物を ISO 8407:2021 に準拠し、20g/L Sb_2O_3 、50 g $SnCl_2$ を含む HCl 溶液で除去、洗浄した。洗浄後の炭素鋼試験片の重量を測定し、試験開始前の重量との差分として重量減損量を算出した（図 3.3.2-1）。滅菌により微生物の作用を除外した水試料（滅菌区）による腐食量は淡水（GW1、GW2、RW）において 4 mg 前後、海水（SW）に置いて 6 mg 程度であった。GW2 と SW 非滅菌区においては、滅菌区と同程度の腐食量であった一方で、GW1 は重量減損量 7 mg と滅菌区よりも高い腐食活性を示した。また、RW は繰り返し 3 検体のうち、1 検体においてのみ 7.2 mg と滅菌区よりも高い腐食活性を示した。本結果は、GW1 が 1F 設備に流入することで設備を構成する炭素鋼の腐食を引き起こす可能性を示唆する。これら腐食活性を担う微生物を推定するために DNA を指標とした微生物群集構造解析を行い、結果は 3.3.2②-2 において示す。

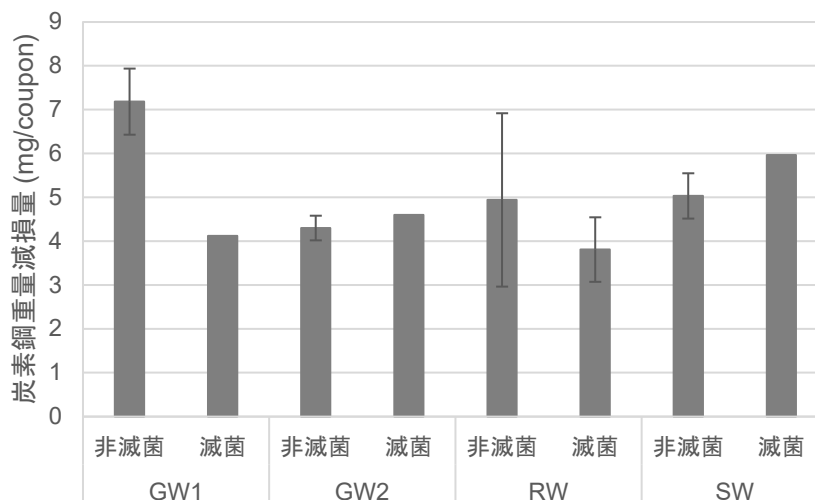


図 3.3.2-1 室内暴露試験 6 か月後の炭素鋼重量減損量

(ii) 令和 2 年度試験において高い腐食活性を示した集積培養液からの腐食性微生物の単離・培養

令和 2 年度、鉄腐食活性を有する微生物群集を集積するために、1F 周辺から採水した試料を植菌源として、複数の培地条件において鉄顆粒との共存下、嫌気培養を行った。その結果、地下水①、地下水②を植菌源とし、無機塩培地 (NaCl を含まない淡水条件、pH 7.2) を用い、鉄顆粒を単一エネルギー源とした培養試料は非植菌区より高い腐食活性を示し (図 3.3.1-2)、これらの培養液は安定して継代培養が可能であった[3-11]。地下水①を植菌源とした集積培養液 (e-GW1) では、メタンの発生が検出されたため、腐食活性を有するメタン菌の増殖が推定された。一方、地下水②を植菌源とした集積培養液 (e-GW2) では、硫酸イオンの減少と黒色の腐食生成物の発生が見られたため、硫酸還元菌の増殖が推定された。そこで、e-GW1 から腐食性メタン菌、e-GW2 から腐食性硫酸還元菌の単離を目的として限界希釈、コロニー分離を繰り返し、最終的に寒天培地上で単一コロニーを得た。e-GW1 より単離したメタン菌を TO1 株、e-GW2 より単離した硫酸還元菌を TO2 株と命名した。これらの単離株を 1F 周辺の腐食微生物の一例として、それぞれの腐食活性・速度を評価した。50 mL バイアル瓶を用い、別途オートクレーブ滅菌した 30 mL の無機塩培地 (淡水、pH 7.2) 及び、炭素鋼試験片 (SS400、0.8 cm 角) を添加、ブチルゴム栓で密栓し、気相部分を混合ガス ($N_2:CO_2=8:2$) で置換した。気相置換後、TO1 株、TO2 株の前培養液を 1 mL 植菌し、培養を開始した (繰り返し数 $n=3$)。培養条件は 30 °C、静置培養とした。また、同様の試験条件において植菌しない非植菌区を対照として設定した (繰り返し数 $n=3$)。2 か月間の培養後、炭素鋼試験片の重量減損量を(i)に記載の手法で測定し、TO1 株、TO2 株の腐食活性を比較した (図 3.3.2-2a)。その結果、非植菌区に対して TO1 株は約 15 倍、TO2 株は約 1.7 倍腐食を促進する活性を有することが明らかとなった。TO1 株の平均腐食速度は 0.36 mm/年と算出された。炭素鋼表面の観察結果は②-1 に示す。

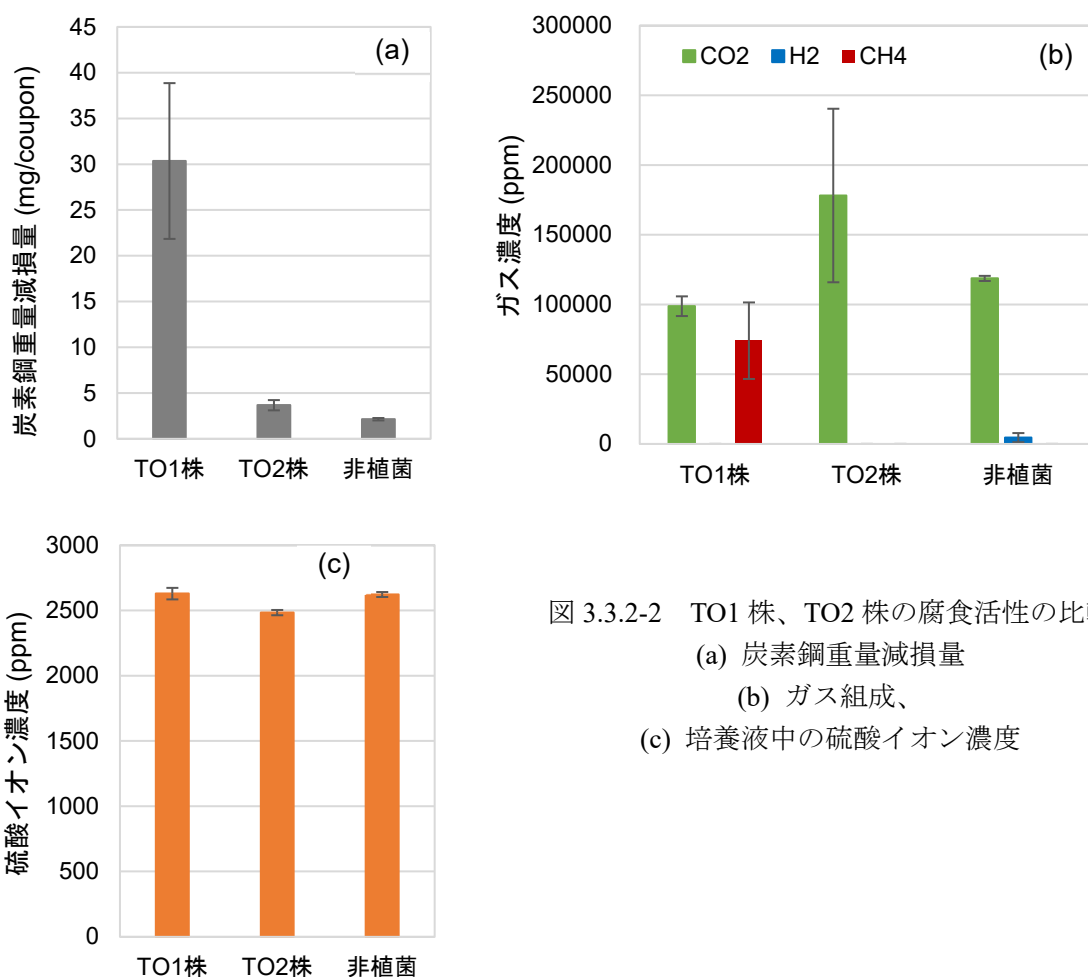


図 3.3.2-2 TO1 株、TO2 株の腐食活性の比較
 (a) 炭素鋼重量減損量
 (b) ガス組成、
 (c) 培養液中の硫酸イオン濃度

次に、気相成分、培養液成分（硫酸イオン）を測定した結果を示す（図 3.3.2-2b、図 3.3.2-2c）。気相については、あらかじめ高純度窒素ガスにて置換しておいたブチルゴム栓付バイアル瓶（容量 10 mL）に、密閉瓶からガスタイトシリンジを用いてヘッドスペースガス（2 mL）を採取後、ガスクロマトグラフ（TCD 検出器搭載の Varian Inc 製 CP4900）によって H₂、CO₂、CH₄ の測定を行った。硫酸イオン濃度の測定はイオンクロマトグラフ ICS-1500（日本ダイオネクス株式会社）、陰イオン用カラム AS11-HC（日本ダイオネクス株式会社）を用いることで行った。TO1 株培養試料の気相部においてのみ 74,000 ppm のメタンガスの発生が見られた一方で、非植菌区では 4,500 ppm の水素の発生が確認された。また、培養液中の硫酸イオン濃度は TO2 株培養試料においてのみ非植菌区と比較して 100 ppm 程度の減少が確認された。以上の結果より、非植菌区では式 1 と式 2 の組合せにより非生物的に水素が発生し（図 3.3.2-3a）、TO1 株培養試料では式 1 とメタン菌による式 3 の反応によりメタン発生（図 3.3.2-3b）、TO2 株培養試料では式 1 と硫酸還元菌による式 4 の硫酸還元反応の組合せで腐食反応が進んでいることが推定された。そのなかで、TO1 株による鉄から電子を引き抜く活性が顕著に高いため、TO1 株培養試料が最も高い腐食活性を示したと考えられた。

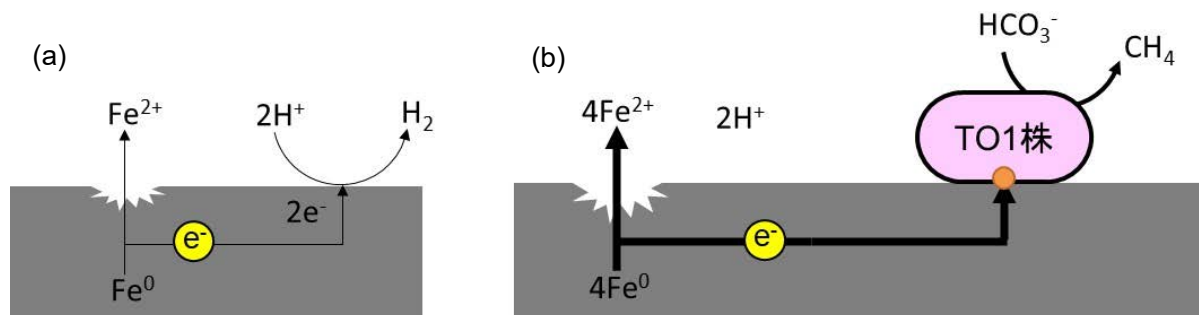
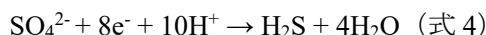
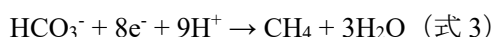


図 3.3.2-3 嫌気条件下における鉄腐食反応の電子の流れ
(a) 無菌条件、(b) TO1 株存

TO1 株の微生物分類学上の同定を行うため、培養液からゲノム DNA を DNeasy PowerSoil Pro Kit (QIAGEN 社) を用いて抽出し、16S rRNA 遺伝子の配列を PCR により増幅、解析を行った。解析した TO1 株の 16S rRNA 遺伝子約 1400 bp の配列を GenBank データベースに登録の塩基配列と比較し、近縁の微生物を推定した。その結果、TO1 株と近縁であった微生物は *Methanobacterium movilense* strain MC-20 (相同性 97.01%)、*Methanobacterium oryzae* strain Fpi (相同性 96.37%) であり、TO1 株は *Methanobacterium* 属に位置するメタン菌と推定された。そこで、本研究で単離した腐食性メタン菌を *Methanobacterium* sp. TO1 株と命名した。これまでに腐食性メタン菌として *Methanobacterium* sp. IM1 株[3-1]、*Methanococcus maripaludis*[1-2]、*Methanosarcina barkeri*[3-2]が報告されているが、これらは全て海水環境から分離されたメタン菌であり、淡水環境下で腐食を引き起こすメタン菌としては本研究で単離した TO1 株が初めての事例である。

1F 周辺の地下水より単離した TO1 株が炭素鋼から電子を引き抜く活性が高いことが推定された。この電子を引き抜くメカニズムを理解し、関与する遺伝子類を特定することは、3.1 や 3.2 において実施している腐食診断のためのバイオマーカー開発につながる。そこで、TO1 株が外部から電子を獲得するメカニズムについて知見を得るために、NIMS との連携のもと、TO1 株細胞を対象とした電気化学的解析を行った。電気化学測定のために、3.1.2③と同様のマイクロウェル型の電気化学セルを使用し、作用極（炭素）の電位を変えながら（-0.23、-0.42、-0.61、-0.83 V (SHE)）、電流値を計測することで作用極から TO1 株細胞への電子の流れを評価した。その結果、作用極の電位を -0.61 V よりも低い値に設定した場合において電流値の増加が検出された。また、Cyclic voltammetry 解析（-1.03~0.173 V）の結果、-0.62 V 近傍において酸化還元ピークが検出された。これらの結果から、-0.62 V 近傍に酸化還元ピークを有する酵素類が TO1 株の細胞外からの電子獲得に寄与していることが推定された。既報の腐食性メタン菌においても同様の電気化学的解析が実施されており、それぞれ表 3.3.2-1 に示す電位

を持つ酵素類が電子の引き抜きに関与していることが推定されている。これらの値は今回明らかになった TO1 株の電気化学的特性と異なる。また、同属の IM1 株の腐食速度は 0.15 mm/年であり[3-3]、TO1 株の腐食速度は約 2 倍程度速い。よって、TO1 株はこれまでの腐食性メタン菌（海洋性）とは異なるメカニズムにより電子を引き抜き、速い腐食を引き起こしていることが推定された。

また、*Methanobacterium* sp. TO1 株の他の金属に対する腐食特性を把握するために、炭素鋼片の代わりにステンレス鋼試験片 SUS304 (0.8 cm 角) を使った腐食試験を実施したが、2 か月間の培養期間では腐食は確認されなかった。そのため、以下の試験では炭素鋼を対象を絞って実施した。加えて、TO1 株、TO2 株の単離源である 1F 周辺から採取した環境試料を用いたステンレス鋼の好気条件下での腐食試験を JAMSTEC との連携のもと実施した結果、環境中の Cl⁻ 濃度と腐食発生の相関及び、腐食発生を電位シフトとして捉えることができる可能性が示唆された。詳細については(2)②③に記載した。

表 3.3.2-1 既報の腐食性メタン菌の電気化学的解析結果

既報の腐食性メタン菌	電位 (vs SHE)	酵素	参考文献
<i>Methanobacterium</i> sp. IM1 株	-0.4 V	未同定	[3-4]
<i>Methanococcus maripaludis</i>	-0.28 V	Hydrogenase	[3-5]
	-0.48 V	未同定	[3-6]
<i>Methanosarcina barkeri</i>	-0.48 V	未同定	[3-7]

(iii) Sr 処理水タンクを想定した環境条件での腐食試験

令和 2 年度、公開情報をもとに 1F 設備 (Sr 処理水タンク、ALPS 処理水タンク、格納容器) の環境条件を推定した[3-11]。令和 2 年度の推定結果をもとに、令和 3 年度はまず Sr 処理水タンクの水質を想定した培養条件を設定し、腐食試験を実施した。培養条件としては有機物を含まない無機塩培地をベースとして、微生物の増殖・活性に影響を及ぼす Cl⁻、SO₄²⁻ 濃度条件について表 3.3.2-2 に示す 5 条件、各条件について 4 つの pH 条件 (pH 7.0、7.5、8.0、8.5) を設定し、TO1 株、TO2 株を植菌源とした腐食試験を 2 か月間実施した (各繰り返し数 n = 3、計 120 本)。Cl⁻、SO₄²⁻ 濃度条件については、令和 2 年度の調査の結果、Sr 処理水タンク内の両濃度には正の相関関係が見られたため (図 3.3.1-1)、相関に基づいて両者の濃度を設定した。加えて、有機物を添加する試験系として、アミノ酸等を含む VM-I 培地をベースとして同様に pH 7.0~8.5、表 3.3.2-2 の条件を設定し、令和 2 年度の試験において腐食活性を示した培養液 (GW2 を植菌源とした VM-I 培地での集積培養液) を植菌源として 2 か月間の腐食試験を行った F2 (VM)、繰り返し数 n = 3、計 60 本)。また、対照として植菌をしない非植菌区を設定した。

表 3.3.2-2 Sr 処理水タンクを想定した培養条件

	培養条件①	培養条件②	培養条件③	培養条件④	培養条件⑤
NaCl (mg/L)	110	500	1000	1500	2000
Na ₂ SO ₄ (mg/L)	50	148	274	400	525.5

pH 7.0 において実施した腐食試験の結果を図 3.3.2-4 に示す。TO1 株は培養条件①において最も高い重量減損量を示し(平均腐食速度:0.86 mm/年、非植菌区の 27.9 倍)、培養条件④を除き、Cl⁻、SO₄²⁻濃度の増加に伴った大きな減損量の変化は見られなかった。メタン発生量に関しても同様の傾向が見られた。本結果において、興味深い点として、図 3.3.2-2 で示した NaCl を含まない培地を用いた際の TO1 株の腐食量よりも培養条件①での腐食量は 2 倍程度大きく、NaCl の存在が腐食活性を向上させた可能性が考えられた。TO2 株については硫酸イオン濃度が最大となる培養条件⑤において最も腐食活性が高く、非植菌区の 2.65 倍となった(培養条件① 1.3 倍、培養条件③ 1.8 倍)。培養液中の硫酸イオン濃度を測定した結果、培養条件⑤において最も硫酸イオン濃度の減少量が 50 ppm 程度(非植菌区との差分)と大きい値を示し、腐食活性と一致する傾向を示した。有機物を含む培養液 F2 (VM) は培養条件④、⑤において腐食活性を示し、培養条件⑤において非植菌区に比べて約 2.1 倍の腐食活性を示した。F2 (VM) 培養液においては気相部に水素発生が確認され、非植菌区よりも量が多いことから有機物分解で発生した水素と推定された。

pH 7.5 において実施した腐食試験の結果を図 3.3.2-5 に示す。TO1 株は培養条件②において最大の腐食活性(非植菌区の 26.5 倍)を示し、Cl⁻、SO₄²⁻濃度がより低い培養条件①やより高い培養条件③、④、⑤では濃度増加に応じて腐食活性が低下する傾向が見られた。それぞれの培養条件におけるメタン発生量も同様の傾向を示した。また、TO2 株及び F2 (VM) 培養液においては非植菌区と比較して、腐食促進が見られなくなった。TO2 株培養液中の硫酸イオン濃度の減少量や F2 (VM) 培養液での水素発生量も低下しており、代謝活性自体が低下していることが推定された。

pH 8.0 において実施した腐食試験の結果を図 3.3.2-6 に示す。TO1 株培養液では培養条件に関わらず全体的に pH 7.0 や pH 7.5 の試験区と比較して低い腐食活性を示した。そのなかで培養条件①において最大の腐食活性を示し(非植菌区の 4.7 倍)、Cl⁻、SO₄²⁻濃度の増加に伴って腐食活性は低下した(非植菌区の 1.8 倍)。腐食活性と同様に TO1 株培養液ではメタン発生量が pH 7.0、pH 7.5 の試験区に対して大きく低下した。また、TO2 株、F2 (VM) 培養液では、培養条件によらず非植菌区よりも低い腐食量を示し、TO2 株、F2 (VM) の植菌が非生物的な腐食に対して抑制的に作用していることが推定された。TO2 株培養液中の硫酸イオン濃度の減少量は低下し、F2 (VM) 培養液での水素発生量は見られなくなった。

pH 8.5 において実施した腐食試験の結果を図 3.3.2-7 に示す。TO1 株培養液においても全ての培養条件で非植菌区と同程度の腐食量であった。メタン発生もほぼ検出されず、TO1 株の増殖と腐食活性が抑制されていることが推定された。TO2 株、F2 (VM) は pH 8.0 の培養条件同様に植菌による腐食促進は観察されなかった。

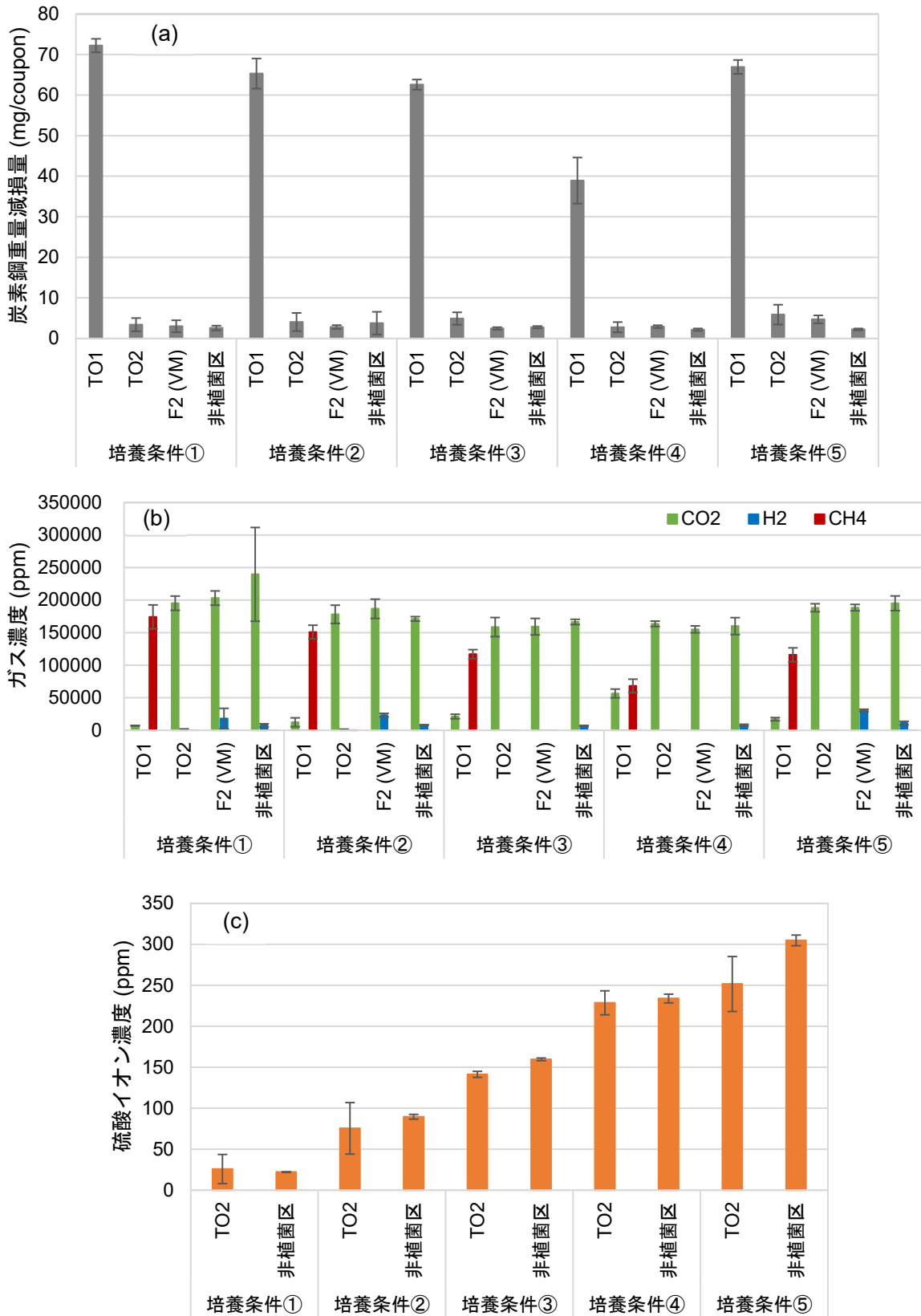


図 3.3.2-4 pH 7.0 での腐食試験結果
(a) 重量減損、(b) ガス組成、(c) 硫酸イオン濃度

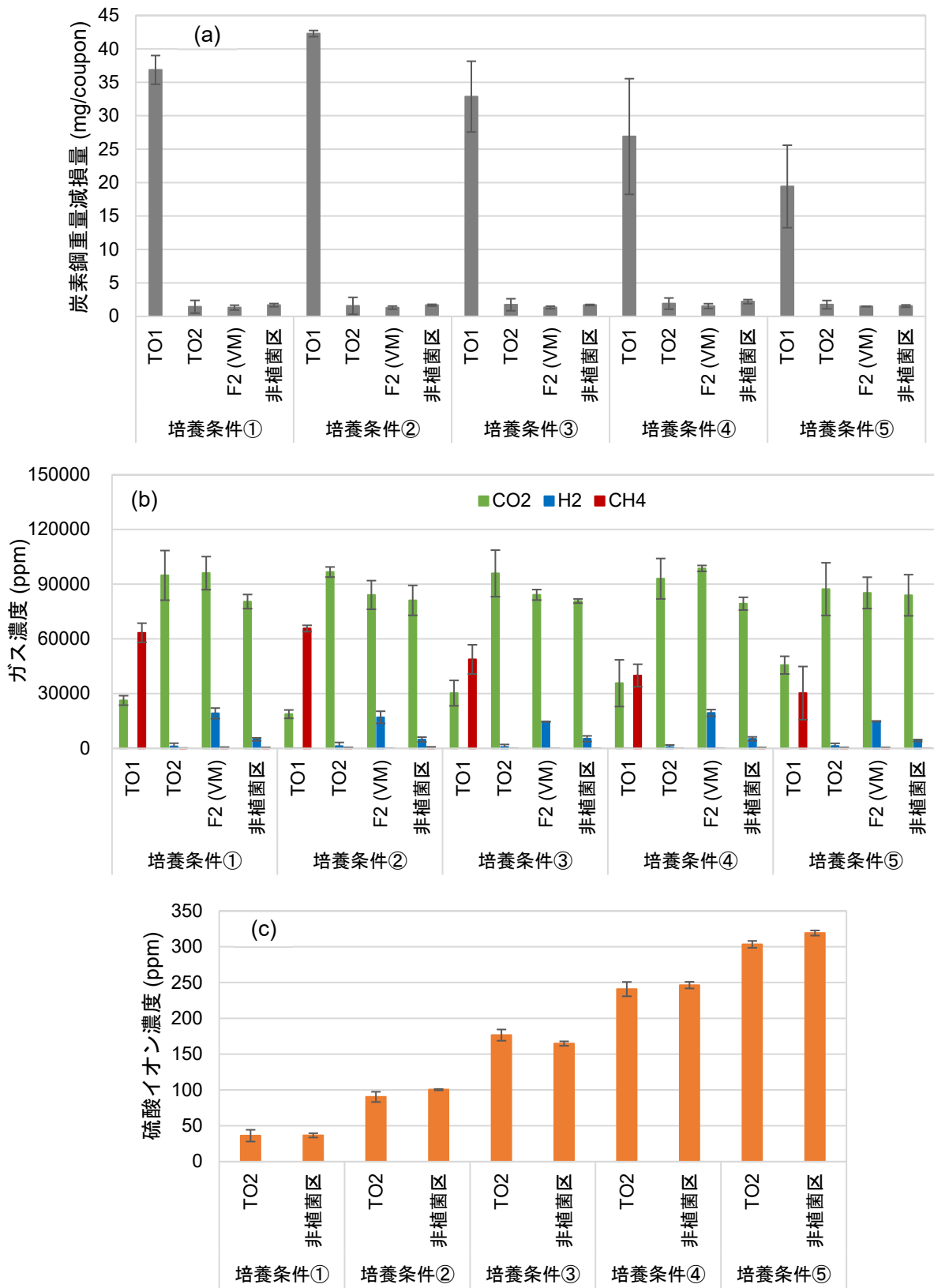


図 3.3.2-5 pH 7.5 での腐食試験結果
 (a) 重量減損、(b) ガス組成、(c) 硫酸イオン濃度

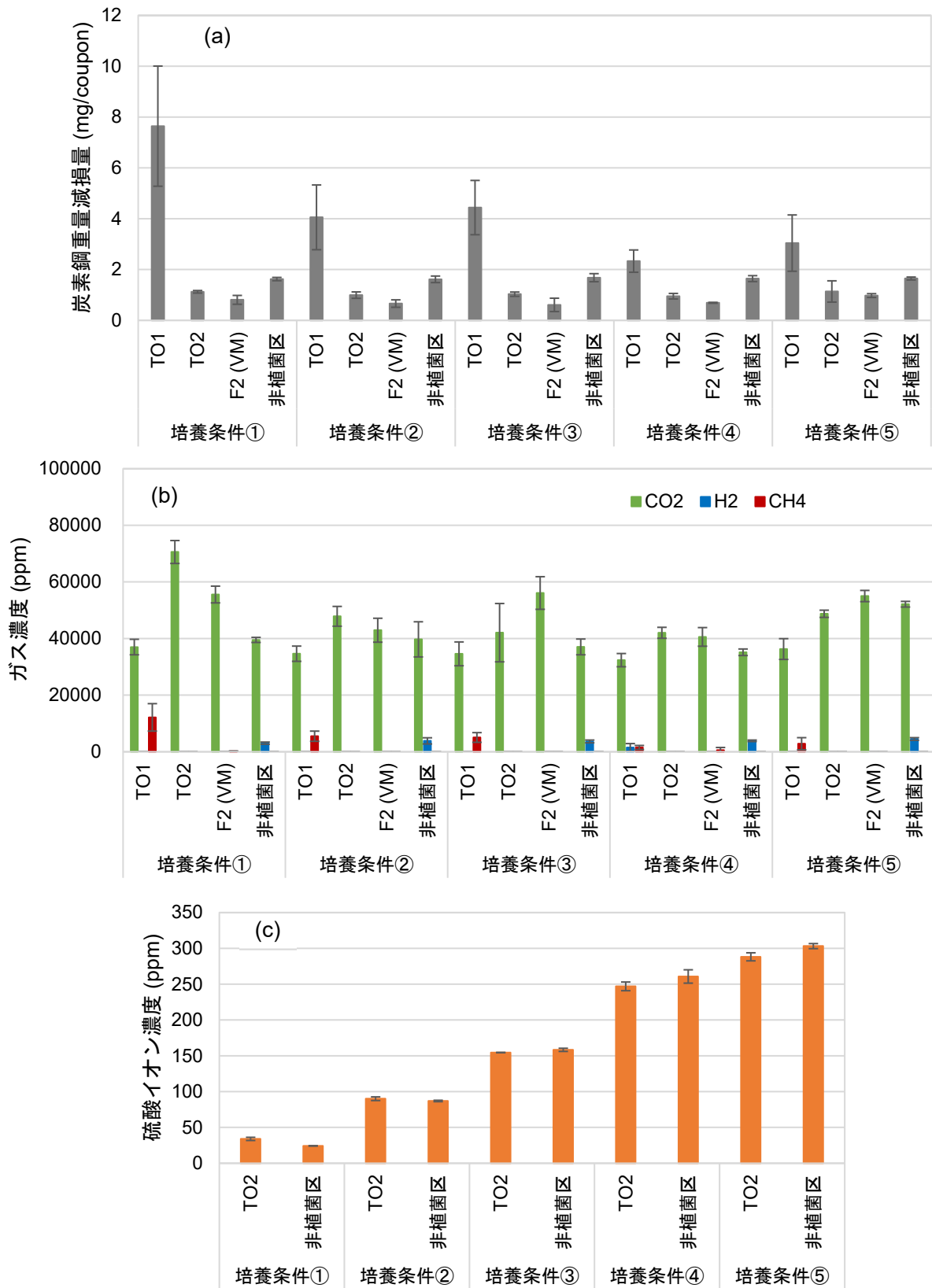


図 3.3.2-6 pH 8.0 での腐食試験結果
 (a) 重量減損、(b) ガス組成、(c) 硫酸イオン濃度

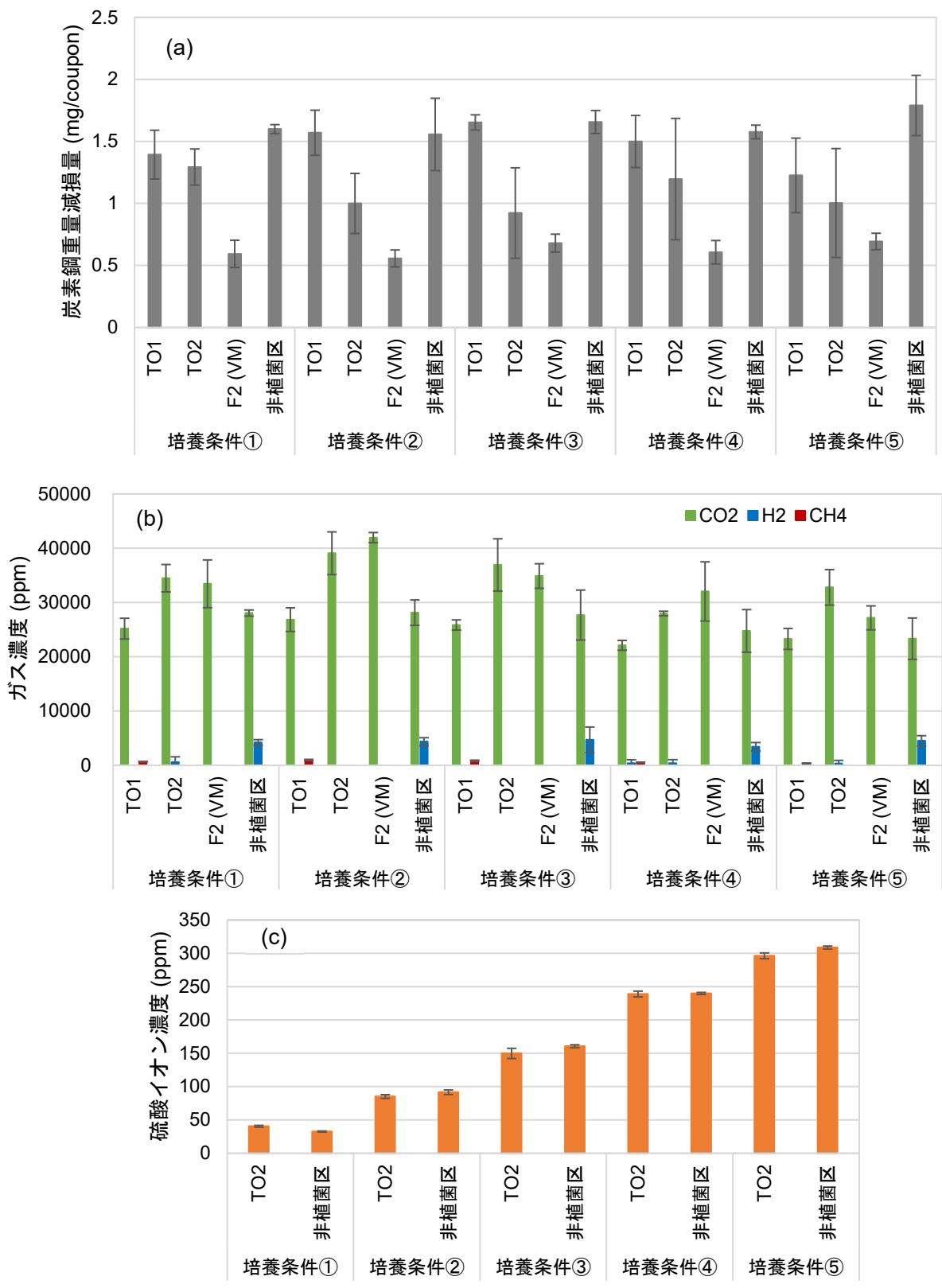


図 3.3.2-7 pH 8.5 での腐食試験結果
 (a) 重量減損、(b) ガス組成、(c) 硫酸イオン濃度

本研究で対象とした植菌源（メタン菌 TO1 株、硫酸還元菌 TO2 株、集積培養液（微生物群集）である F2 (VM)）ごとに、各培養条件下での腐食活性を非植菌区に対する腐食促進の倍率として整理した（図 3.3.2-8）。TO1 株の腐食活性は pH 7.0 に対して pH 7.5 では約 50%、pH 8.0 では約 10%まで低下したことから（培養条件①のデータより算出）、Sr 処理水タンク内で想定される範囲内での Cl⁻、SO₄²⁻ 濃度条件の違いよりも pH の違いが大きな影響を与えることが明らかとなった。また、TO2 株、F2 (VM) においては、Sr 処理水タンク内で想定される条件下での腐食活性は低く、pH 7.0 培養条件⑤において 2~3 倍の腐食促進は見られたが、pH 7.5 より高い pH では腐食促進は見られなくなった。以上の結果から、微生物腐食活性の抑制のためには pH が重要な因子と考えられた。

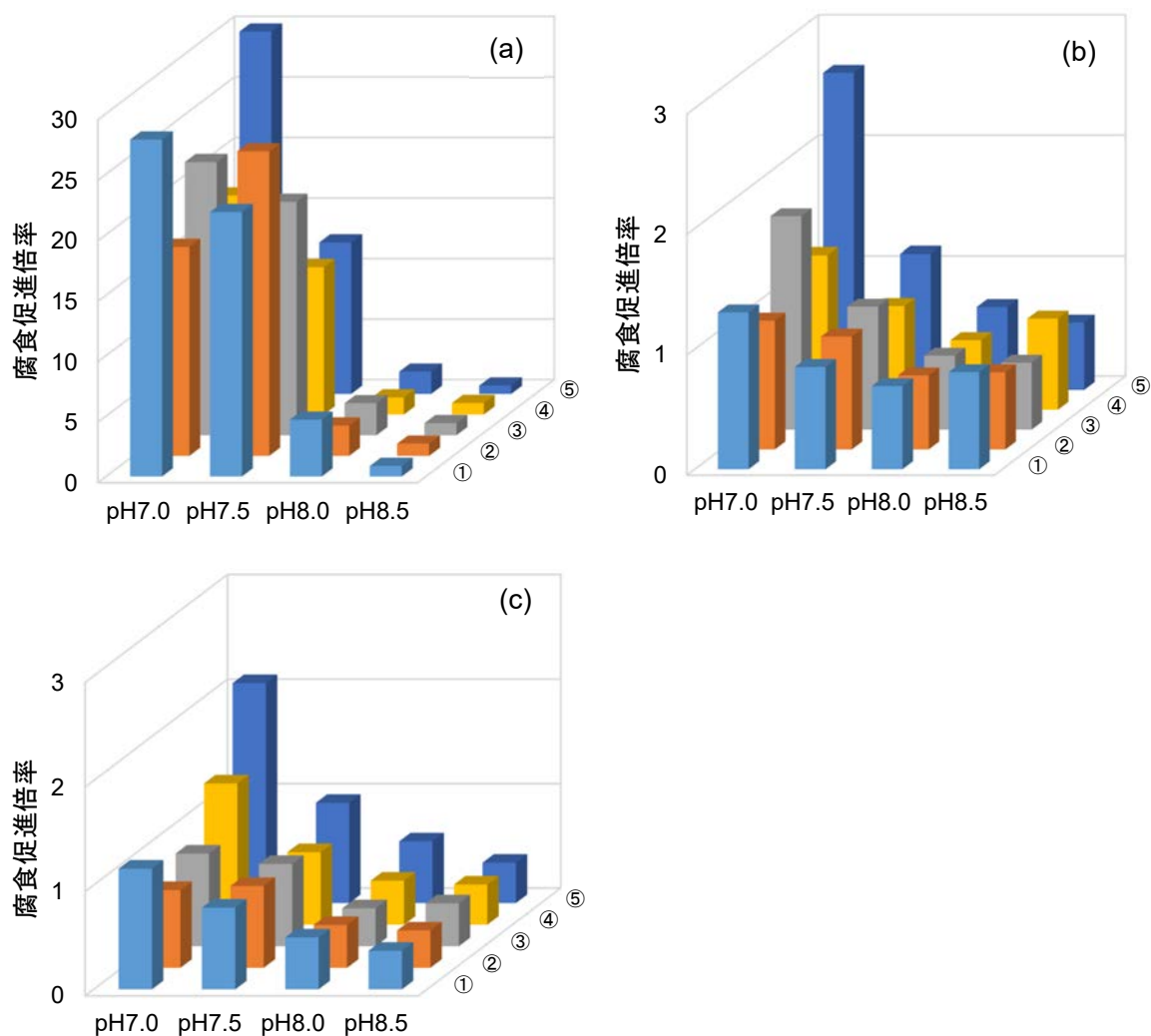


図 3.3.2-8 各培養条件における腐食活性の比較
(a) TO1 株、(b) TO2 株、(c) F2 (VM)

② 微生物腐食の評価及び微生物腐食リスクの高まる環境条件のスクリーニング

②-1 試験材料表面の観察、腐食速度の評価

腐食活性が高かった試料 (ii) TO1 株、TO2 株、(iii) Sr 処理水タンクを想定した腐食試験について腐食形態に関する知見を得るため、試験後の炭素鋼試験片を回収し、SEM-EDS (SEM: Miniscope TM4000PlusII, Hitachi 社、EDS: AZtecOne, Oxford Instruments 社) を用いて腐食生成物・微生物の分析を行った。腐食生成物として TO1 株培養試料ではリン酸鉄、炭酸鉄、TO2 株培養試料では硫化鉄が検出され、表面に明確な微生物の局在は観察できなかった。次に、試験片の酸洗浄後、目視もしくはワンショット 3D 形状測定機 (VR-3000、株式会社キーエンス) にて炭素鋼試験片の表面観察を行った (図 3.3.2-9)。観察の結果、(ii) の腐食試験において、TO1 株培養試料の試験片の面粗さ Sa (算術平均高さ) は 15.79 μm 、TO2 株培養試料の試験片の面粗さ Sa は 11.82 μm であり、非植菌区の試験片の面粗さ Sa は 6.89 μm であり、TO1 株培養試料において最も試験片の凹凸が大きいことが示された。また、TO1 株培養試料の試験片では凹凸が表面全体に広がっていたのに対して、TO2 株培養試料では試験片の中心に円形で局部的に腐食が進んでいることが観察された。この円の部分について、より高解像度の形状解析レーザー顕微鏡 (VK-X1000、株式会社キーエンス) で観察を行い、腐食の深さを測定したところ深い箇所において 61.9 μm の腐食による減肉が確認された (図 3.3.2-10)。TO2 株の重量減損量 (図 3.3.2-2) から算出した平均腐食速度は 0.044 mm/年であったが、局部腐食の最大減肉深さから算出した局部的な腐食速度は 0.37 mm/年と 10 倍程度の値を示した。TO2 株のような局部腐食を引き起こす微生物は短期間で深い孔食を引き起こしうることから、慎重に腐食活性を評価する必要がある。



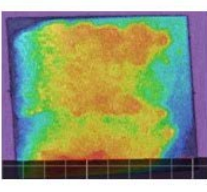


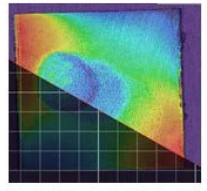


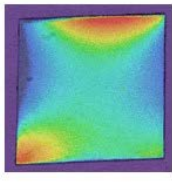
	培養終了後	酸洗浄後	表面形状分析
TO1株			
TO2株			
非植菌区			

図 3.3.2-9 腐食試験後の炭素鋼片の表面 (TO1 株、TO2 株、非植菌区)

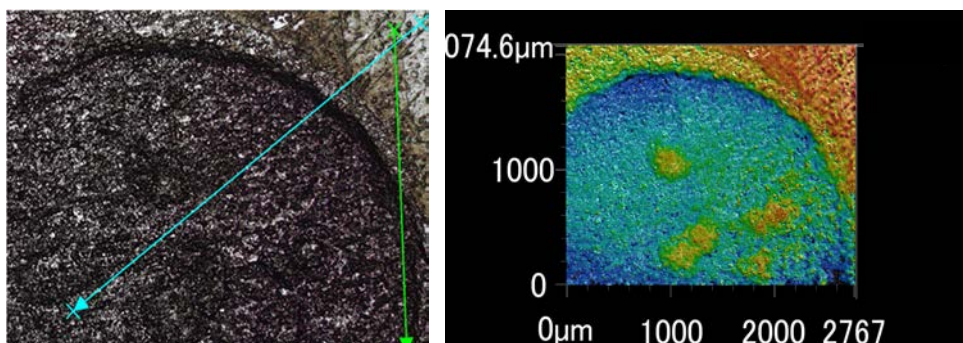


図 3.3.2-10 TO2 株培養試験片に生じた局部腐食箇所を観察

Sr 処理水タンクを想定した培養条件で 2 か月間腐食試験を行った後 (3.3.2①(iii))、炭素鋼試験片を回収し、観察を行った (図 3.3.2-11)。TO1 株培養後は培養液中に白い腐食生成物が生じた一方で、TO2 株や F2 (VM) 培養後は硫化鉄と推定される腐食生成物が発生した。図 3.3.2-8a で示された TO1 株の重量減損量を指標とした腐食活性と一致し、TO1 株培養試験区の炭素鋼試験片は pH 7.0、pH 7.5 条件においては腐食による凹凸が目視でも確認できたが、pH 8.0、pH 8.5 では試験前から存在する研磨痕が表面に残ったままであり、腐食が抑制されていることが示唆された。TO2 株培養試験区においては、腐食減損量を指標とした場合、pH 7.5 以上の培養条件においてほぼ腐食促進は見られないという結果が得られたが、試験片の観察結果からは TO2 株に特徴的な局部腐食は pH 8.5 においても発生していた。重量減損量で評価した場合には、pH を上げることにより TO2 株の腐食を抑制できると推定されたが、局部腐食という観点から今後再評価が必要である。F2 (VM) については炭素鋼試験片上の腐食状況は腐食減損量を指標とした腐食評価の結果とほぼ一致し、pH 7.5 においてはわずかに腐食痕が見られるものの、pH 8.0 以上の培養条件では試験片上には研磨痕のみで F2 (VM) による腐食促進は生じていないことが確認された。

以上の結果より、TO1 株、TO2 株の腐食活性に対して Cl^- や SO_4^{2-} の濃度条件よりも pH の違いが大きな影響を与えることがわかった。中性環境において TO1 株、TO2 株ともに最大の腐食速度を示し、TO1 株では全面腐食で 0.36 mm/年、TO2 株は局部腐食で 0.37 mm/年であった。
















	TO1株	TO2株	F2 (VM)
pH7.0 (培養液)			
pH7.0			
pH7.5			
pH8.0			
pH8.5			

図 3.3.2-11 Sr 処理水タンクを想定した腐食試験後（培養条件①）の培養液と炭素鋼試験片

②-2 培養液の分析及び腐食に関与した微生物反応の推定

3.3.2①(i)に示した採水試料を用いた室内暴露試験後の試料のうち GW1 と RW の一部においては微生物の存在による腐食促進が確認された。回収された培養液のイオンクロマトグラフィー、液体クロマトグラフィーによる成分分析を行った結果、腐食促進が確認された試料において培養に伴った硫酸イオンの減少が確認され、硫酸還元菌の関与が推定された。また、培養液中に硝酸イオンも含まれていたが、全ての試料において培養に伴う減少は確認できなかった。次に、そこで、腐食反応に関与した微生物を推定するために、JAMSTEC との連携のもと、DNA（16S rRNA 遺伝子）を指標とした微生物群集構造解析を行った。試験終了後の試料から DNeasy PowerWater kit（QIAGEN 社）を用いて DNA を抽出し、3.2.2④に記載の手法に従って微生物群集構造解析を実施した（n=3、SW のみ 1 検体）。

各試料に含まれる微生物の種類と構成比率について、微生物分類属レベルで図 3.3.2-12 に示した。試験後の水試料のうち GW2 は多様な微生物を含んでいたが、GW1、RW、SW については炭素鋼試験片と接することで特定の微生物が優占化し、微生物構成が単純化していた。GW1 では 3 検体に共通して、全体に占めるメタン菌 *Methanobacterium* の比率が非常に高くなっており（37～84%）、*Methanobacterium* の比率が相対的に低い検体では硫酸還元菌 *Desulfovibrio* が検出された。*Methanobacterium* は TO1 株と同一の属であり、*Desulfovibrio* も腐食を引き起こす微

生物として知られている[3-8]。よって、GW1 が炭素鋼と接した場合に、これらの腐食との関与が推定される微生物の優占化が生じることが推定された。GW2 においては、GW1 同様に硫酸還元菌 *Desulfovibrio* (23~43%)、メタン菌 *Methanobacterium* の比率 (2.4~26.5%) が高いが、GW1 よりも *Desulfovibrio* の比率が高いという特徴を示した。海水試料においては 80%以上の比率で *Hoeflea* が優占化していたが、炭素鋼片の腐食は見られておらず、*Hoeflea* が優占化した理由は不明である。水素を発生させるカソード電極上での増殖が報告されており[3-9]、本試験条件においては炭素鋼から非生物的な腐食反応で発生する水素を利用して増殖した可能性が考えられる。

以上、1F 周辺の地下水の一部には腐食を引き起こす微生物が含まれており、鉄材料と接触することで腐食を引き起こすリスクが存在することが推定された。

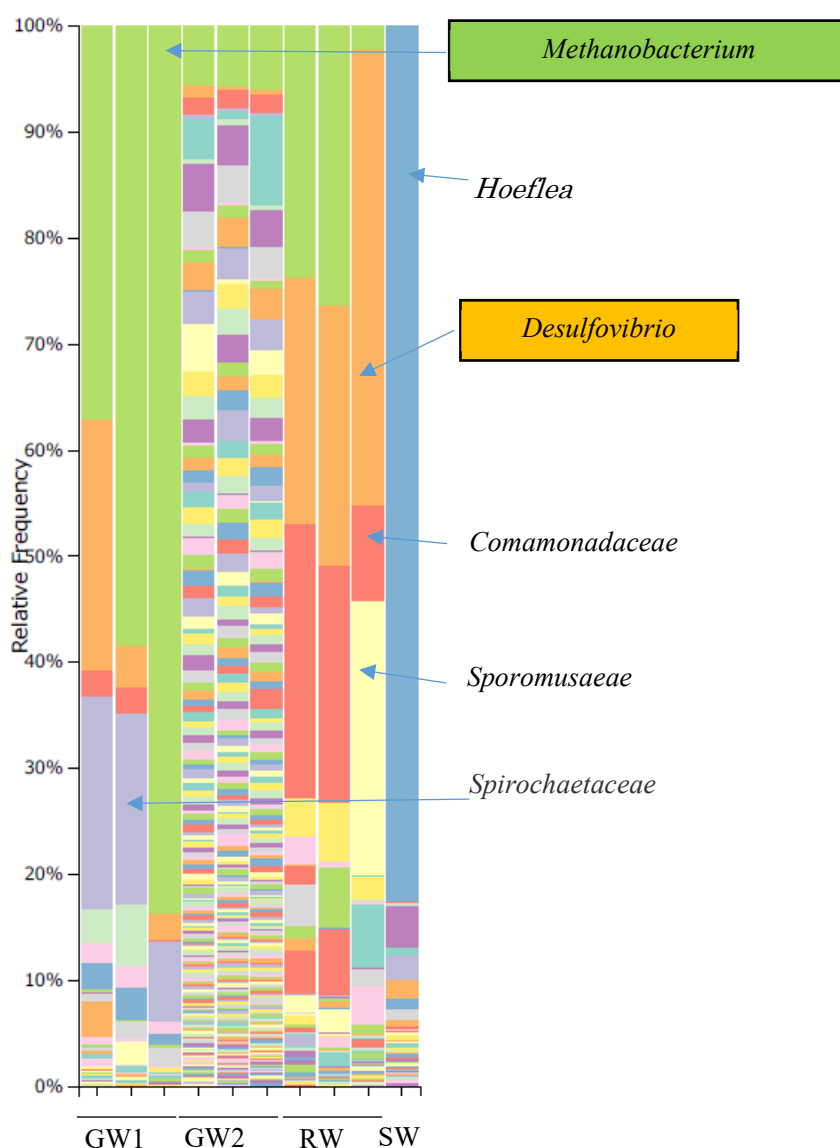


図 3.3.2-12 採水試料を用いた室内暴露試験後の試料に含まれる微生物群集構造

3.3.3 まとめ

令和 3 年度は、1F 周辺の水試料に含まれる微生物による微生物腐食の可能性を検証することを目的として、採水試料を用いた炭素鋼の室内暴露試験を行い、炭素鋼と地下水試料の接触によりメタン菌や硫酸還元菌による微生物腐食が生じる可能性が提示された。また、地下水試料から腐食反応を担う微生物として、鉄から電子を獲得することで増殖し、腐食を引き起こすメタン菌 TO1 株、硫酸還元菌 TO2 株を単離した。TO1 株は NaCl を含まない淡水環境において非植菌区の約 15 倍の平均腐食速度 0.36 mm/年を示し、既報の腐食性メタン菌（海洋性）よりも高い腐食活性を示した。これらの成果の一部は学術論文として公知化済みである[3-10]。TO2 株は炭素鋼試験片に対して局所的な腐食を引き起こしており、腐食が深い箇所の減肉量から局所的な腐食速度は 0.37 mm/年と算出された。1F 設備環境のような栄養源が少ない環境においては、炭素鋼のような金属を電子源とする TO1 株や TO2 株のような微生物が腐食を引き起こす可能性がある。一方で、ステンレス鋼に対して TO1 株は腐食活性を示さず、環境試料を用いた腐食試験からステンレス鋼腐食における Cl⁻濃度の重要性が示唆された。これら単離株及び令和 2 年度取得した腐食活性を持つ微生物群集を用いて、Sr 処理水タンクの環境条件下での炭素鋼腐食試験を行った結果、pH が腐食活性に及ぼす影響が大きく、pH 7.0 から pH 8.0 に変わるだけで重量減損量を指標とした腐食活性は 1/10 に低減した。環境条件の制御により、腐食活性を抑制可能であると考えられる。ただし、TO2 株については試験片の重量減損量からは腐食活性が低いと考えられた pH 8.5 の培養条件においても局所的な腐食を示したため、今後腐食活性を抑制できる条件をスクリーニングする上で複数の手法から腐食活性を評価する必要がある。また、本研究項目で得られた腐食微生物の単離株は NIMS、JAMSTEC、JAEA と共有、連携することでバイオマーカーの探索や、腐食試験片の詳細な観察に活用する予定である。

参考文献

- [3-1] Dinh, H. T. et al., Iron Corrosion by Novel Anaerobic Microorganisms, *Nature.*, vol.427, 2004, pp.829-832, DOI:10.1038/nature02321.
- [3-2] Palacios, P. A. et al., Baltic Sea Methanogens Compete with Acetogens for Electrons from Metallic Iron, *ISME J.*, vol.13, 2019, pp.3011-3023, DOI: 10.1038/s41396-019-0490-0.
- [3-3] An, B. A. et al., Iron to Gas: Versatile Multiport Flow-column Revealed Extremely High Corrosion Potential by Methanogen-induced Microbiologically Influenced Corrosion (Mi-MIC), *Front. Microbiol.*, vol.11, 2020, no.527, DOI: 10.3389/fmicb.2020.00527.
- [3-4] Beese-Vasbender, P. F. et al., Selective Microbial Electrosynthesis of Methane by a Pure Culture of a Marine Lithoautotrophic Archaeon, *Bioelectrochemistry*, vol.102, 2015, pp.50-55, DOI: 10.1016/j.bioelechem.2014.11.004.
- [3-5] Deutzmann, J. S. et al., Extracellular Enzymes Facilitate Electron Uptake in Biocorrosion and Bioelectrosynthesis, *mBio.*, vol.6, no.2, 2015, e00496-15, DOI: 10.1128/mBio.00496-15.
- [3-6] Lohner, S. T. et al., Hydrogenase-independent Uptake and Metabolism of Electrons by the Archaeon *Methanococcus Maripaludis*, *ISME J.*, vol.8, 2014, pp.1673-1681, DOI: 10.1038/ismej.2014.82.
- [3-7] Rowe, A. R. et al., Methane-linked Mechanisms of Electron Uptake from Cathodes by *Methanosarcina Barkeri*, *mBio.*, vol.10, no.2, 2019, e02448-18, DOI: 10.1128/mBio.02448-18.
- [3-8] Enning, D. et al., Corrosion of Iron by Sulfate-reducing Bacteria: New Views of an Old Problem, *Appl. Environ. Microbiol.*, vol.80, no.4, 2014, pp.1226-1236, DOI: 10.1128/AEM.02848-13.
- [3-9] Battle-Vilanova, P. et al., Assessment of Biotic and Abiotic Graphite Cathodes for Hydrogen Production in Microbial Electrolysis Cells, *Int. J. Hydrogen Ener.*, vol.39, no.3, 2014, pp.1297-1305, DOI: 10.1016/j.ijhydene.2013.11.017.
- [3-10] Hirano, S. et al., Novel *Methanobacterium* Strain Induces Severe Corrosion by Retrieving Electrons from Fe⁰ under a Freshwater Environment, *Microorganisms.*, vol.10, no.2, 2022, 270, DOI:10.3390/microorganisms10020270.
- [3-11] 廃炉環境国際共同研究センター, 物質・材料研究機構, 健全性崩壊をもたらす微生物による視認不可腐食の分子生物・電気化学的診断及び抑制技術の開発 (委託研究) -令和2年度英知を結集した原子力科学技術・人材育成推進事業-, JAEA-Review 2021-059, 2022, 71p, DOI:10.11484/jaea-review-2021-059.

3.4 1F 周辺環境の微生物の特徴の把握及び微生物腐食挙動の評価（連携先：JAEA）

3.4.1 令和2年度までの実施内容及び成果（概要）

① 1F 周辺環境の微生物の特徴の把握

1F 周辺環境に生息する微生物を同定するため、1F サイト周辺の表層水・地下水や河川水の環境サンプリングを行った。サンプリングした場所及び写真を図 3.4.1-1 及び図 3.4.1-2 にそれぞれ示す。計7か所からサンプリングした。



図 3.4.1-1 富岡町内での環境サンプリング場所
 （国土地理院 地理院地図 電子国土 Web

<https://maps.gsi.go.jp/#15/37.335173/141.011302/&base=std&ls=std&disp=1&vs=c1j0h0k0l0u0t0z0r0s0m0f1&d=m> にサンプリング場所を追記して作成)



図 3.4.1-2 環境サンプリング場所の写真
(文献[3-11]より引用)

サンプリングされた水試料中に存在する微好気性の鉄酸化細菌を取り扱うこととし、以下の培地の組成を編成した。Modified Wolfe's Mineral Medium : NH_4Cl 1.0 g/L、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.4 g/L、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g/L、 NaHCO_3 1.68 g/L、 Na_2SiO_3 0.05 g/L、 K_2HPO_4 0.05 g/L、 KH_2PO_4 0.05 g/L (pH 6.5)。この培地に鉄源として 2.0 g/L の鉄粉を湿熱滅菌 (121 °C、15 min) したものを添加し鉄酸化細菌培養用培地とした。上記の培地を用いて環境試料由来微生物を培養したところ、図 3.4.1-3 のような変化が観察された。本試験で生成した茶褐色の鉄酸化物の大部分は微生物の代謝由来であると推察される。

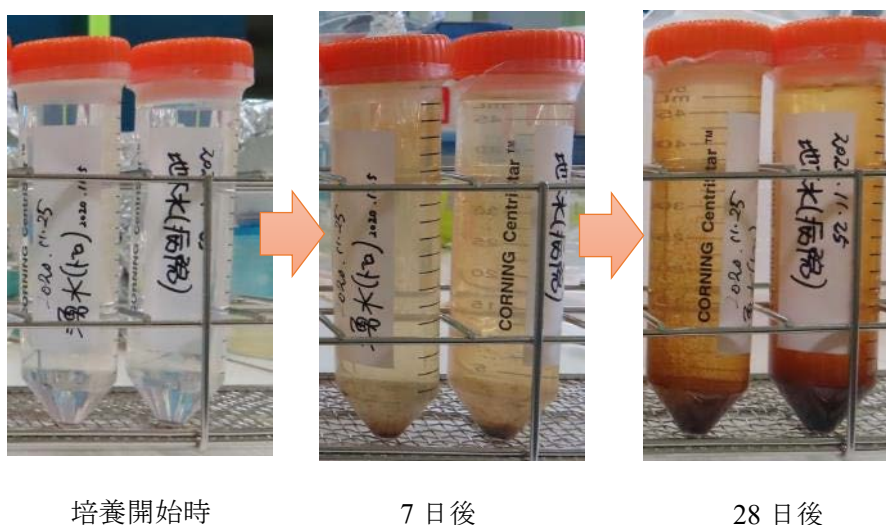


図 3.4.1-3 培養したサンプルの外観（28 日間培養）
（文献[3-11]より引用）

② 微生物腐食挙動の評価

微生物による材料表面での腐食の影響をマイクロレベル及びナノレベルで評価するため、材料表面の最適な測定・分析手法を検討・選定し、分析・測定環境を整備した。

腐食試験後、観察・分析までの手順を検討し、次のような手法を選定した。

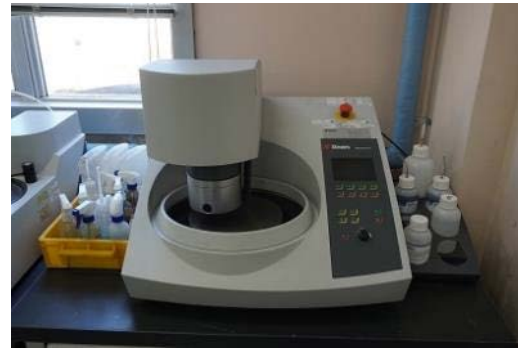
- (i) 腐食試験後の試料表面に付着した微生物あるいは腐食生成物の様相を観察して腐食が発生したと考えられる場所を推測し、腐食の状況を調べる対象部位を絞り込む。
- (ii) 絞り込んだ部位の表面付着物（微生物あるいは腐食生成物）を酸溶液で除去し、試料表面や断面の観察・分析のために切断・研磨等の試料調製を行う。
- (iii) 調製した試料を用い、FE-SEM を用いた表面・断面の観察や EDS を用いた元素分析を行って、腐食の状況を把握する。
- (iv) ワンショット 3D 形状測定機を用いたマイクロレベルの凹凸観察・測定、原子間力顕微鏡（以下「AFM」という）を用いたナノレベルの凹凸観察・測定等を行って、腐食の進展を定量的に把握する。

上記の手順で微生物腐食挙動を分析・測定し評価するために必要な装置等を整備した。これらの装置は既に JAEA が所有しているものである。

試料調製には図 3.4.2-1(a)切断機及び図 3.4.2-1(b)自動研磨機のほか、マイクロレベル以下の精密研磨には図 3.4.2-1(c)イオンミリングを用いる。上記にて調整した試料は、光学顕微鏡や図 3.4.2-2(a)の FE-SEM を用いて表面観察や FE-SEM に付属する EDS を用いて元素分析を行う。腐食進行の状況を定量化するための減肉や局部腐食深さまたは腐食減肉の分布の測定として、マイクロレベルの場合は図 3.4.2-2(b)ワンショット 3D 形状測定機、ナノレベルの場合は同図 3.4.2-2(c)AFM を用いる。



(a) 切断機



(b) 自動研磨機



(c) イオンミリング

図 3.4.2-1 試料調製装置
(文献[3-11]より引用)



(a) 電解放出型走査電子顕微鏡 (FE-SEM)



(b) ワンショット 3D 形状測定機



(c) 原子間力顕微鏡 (AFM)

図 3.4.2-2 腐食影響の観察・分析・測定装置 (文献[3-11]より引用)

以上の手順や装置を用いて腐食の状況を把握し、微生物や腐食生成物と腐食との関係を調べ、また腐食の進展を可能な限り定量化して腐食速度を求めることにより、微生物による腐食の影響を評価することが可能となる。

3.4.2 令和3年度実施内容及び成果

① 1F 周辺環境の微生物の特徴の把握

1F 周辺環境に生息する特徴的な微生物を同定するため、令和2年度に培養した微生物の種類を分析した。また、1F サイト周辺の環境サンプリングを追加して行い微生物を培養した。

令和2年度に富岡町の病院敷地外の湧水から採取した地下水サンプルから微生物を培養した。現在炉内は窒素充填されているが、十分な酸素があると、燃料デブリからの放射線の影響により窒素と酸素から硝酸が生成し、冷却水中に溶け込むと考えられる。硝酸イオンを還元する脱窒菌は、硝酸イオンの還元と同時に鉄の酸化腐食を生じる。また、硝酸イオンの還元により生成する亜硝酸は、 UO_2 の酸化、溶解を促進する。1F 周辺環境での脱窒菌の生息状況を把握するため、富岡町病院脇から採取した地下水を、窒素源を硝酸イオンのみとした2種類の液体培地 (M9 最小培地の NH_4Cl : 1 g/L を KNO_3 : 1.59 g/L に変更した液体培地、または Czapek 培地) を用いて 30℃にて培養した。これより、細菌が残ることを確認したため、これ

らは硝酸イオンを分解する脱窒菌であり、1F 周辺環境においても脱窒菌は生息することがわかった。

令和3年度の1F サイト周辺の表層水・地下水や河川水の環境サンプリングは、令和3年11月8日にいわき市の常磐湯本温泉、令和3年11月9日に大熊町坂下ダムにて行った。サンプリングした場所の写真を図3.4.2-3及び図3.4.2-4にそれぞれ示す。



図 3.4.2-3 いわき市常磐湯本温泉でのサンプリング状況の写真



図 3.4.2-4 大熊町坂下ダムでのサンプリング状況の写真

② 微生物腐食挙動の評価

微生物による材料表面での腐食の影響をマイクロレベル及びナノレベルで評価するため、微生物腐食試験後の試験片の表面形状や局部腐食部位について、令和2年度に選定した分析手法及び整備された環境を用いて、材料表面の状態・形状をマイクロレベル及びナノレベルで測定した。

硫酸還元菌を用いて鉄腐食試験片の腐食試験を行い、97%エタノール中で超音波洗浄した腐食片の表面観察を実施した。図3.4.2-5に示すように、目視ではマクロな楕円状の凹みを確認し、FE-SEMを用いた2次電子像では、局部的な腐食はなく、表面は比較的均質であることを確認した。また、原子間力顕微鏡を用いて表面のナノレベルの凹凸の観察を実施した。図3.4.2-6に観察結果の例を示す。この結果、金属の結晶粒によると思われる凹凸が数マイクロメートル程度あることを確認したが、一般的に金属表面で確認できる構造であり、特異的な構造は認められなかった。

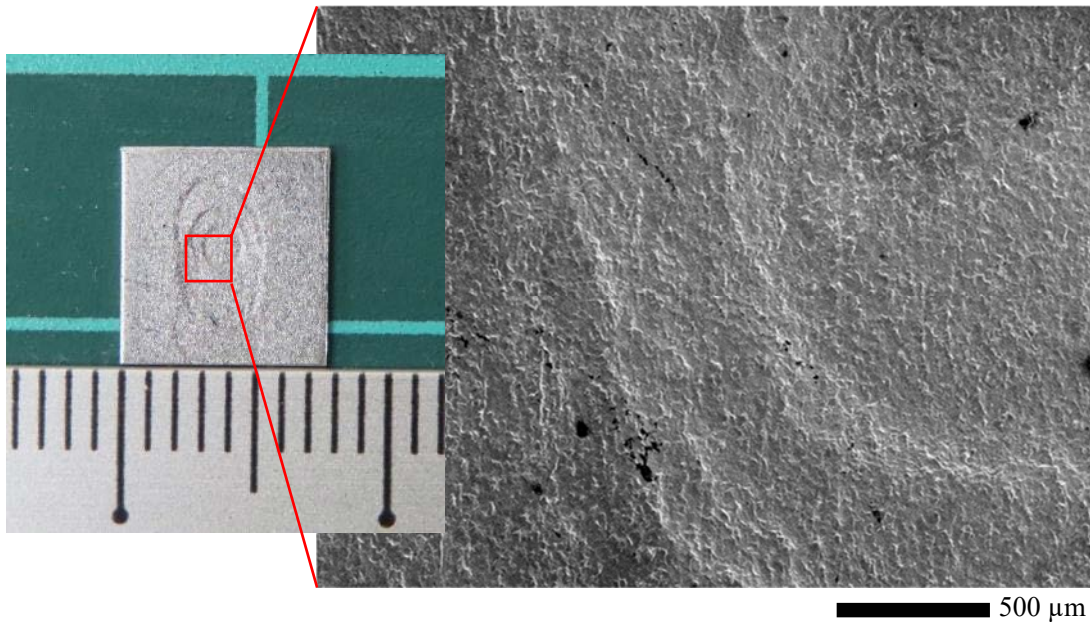


図 3.4.2-5 硫酸還元菌による鉄腐食片表面の2次電子像

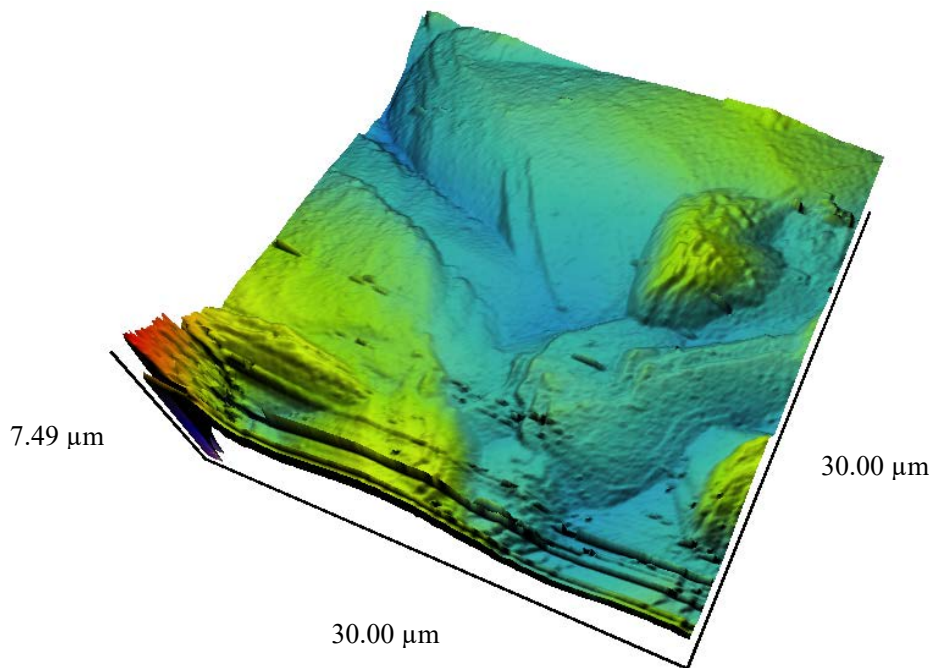


図 3.4.2-6 原子間力顕微鏡によるナノレベルの凹凸の観察

当初計画に追加して、腐食生成物が付着したまま試料断面を観察する手法を開発し、試料断面の FE-SEM 観察により微生物腐食によって形成した腐食生成物が付着した炭素鋼の断面観察が可能であることを確認した。

検討した手順を以下に示す。

- (a) 微生物を培養した溶液中に炭素鋼を浸漬し、図 3.4.2-7 のように 1 か月以上浸漬腐食試験を実施した。
- (b) 腐食試験後の試料を腐食生成物が付着したままエタノール中に 48 時間以上浸漬し、腐食生成物中の水分をエタノールで置換した。
- (c) 試料をエタノール中から取り出して真空デシケーター中で 24 時間以上乾燥させた。
- (d) 乾燥後の試料をテフロンモールドにセットした後、図 3.4.2-8 に示す真空含浸装置を用いて真空中で生体固定用樹脂（Kulzer 社 Technovit®8100）をテフロンモールドに注いだ。樹脂を注ぎ終わった直後に真空含浸装置を大気開放することで、腐食生成物中に十分に樹脂を含浸した。
- (e) 48 時間以上放置して十分に樹脂を固化させた。
- (f) 十分に固化した樹脂ごと試料をモールドから取り出し、観察に適したサイズにファインカッターを用いて切断した。
- (g) SiC 研磨紙を用いて断面部を面出し研磨した後、柔らかい腐食生成物に機械的な破壊が起こらないようにイオンミリングを用いた研磨を実施した。
- (h) 研磨後に FE-SEM を用いて断面を観察した。



図 3.4.2-7 浸漬腐食試験中の試料外観



図 3.4.2-8 真空含浸装置

図 3.4.2-9 に上述した方法によって観察した腐食生成物が付着した試料断面の FE-SEM 写真を示す。炭素鋼と樹脂の間には固定化されたさび層を観察することができ、上述した方法によって鉄さび層中に樹脂が良く含浸されていることがわかる。また鉄さびは外側の空隙を含んだ層と内側の密な層に分かれており、内側の密な層は EDS の分析によって FeS であることがわかった。外側の空隙を含んだ層は空隙内に耐熱性の低い樹脂が存在しており、EDS 分析に必要な高電圧の電子ビームで崩壊してしまうため元素分析が困難であった。FE-SEM による断面観察、分析用の試料を作製する際には耐熱性のある樹脂の使用が望ましいと考えられる。

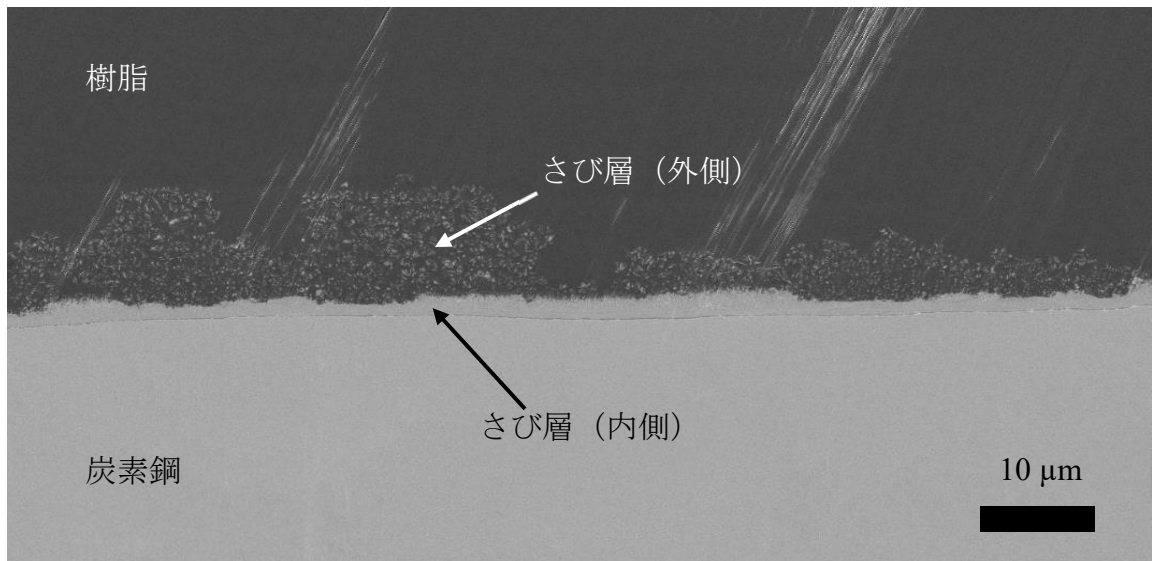


図 3.4.2-9 試料断面 FE-SEM 写真

3.4.3 まとめ

令和3年度は、PCV内の環境中で生成する可能性がある硝酸イオンを還元する脱窒菌に着目し、1F周辺環境中での生息状況を確認する培養試験を行い、1F周辺環境においても脱窒菌は生息することがわかった。また、硫酸還元菌を用いて鉄腐食試験片の腐食状況の観察を行い、局部腐食等の兆候を示す特異的な構造は認められないことを確認した。さらに、当初計画に追加して、腐食生成物が付着したまま試料断面を観察する手法を開発し、試料断面のFE-SEM観察により微生物腐食によって形成した腐食生成物が付着した炭素鋼の断面観察が可能であることを確認した。

3.5 研究推進

研究代表者の下で各研究項目間ならびに CLADS 等との連携を密にして、研究を進めた。また、研究実施計画を推進するための打合せや会議等を開催した。

- ・打合せ会議（1回目）

開催日：令和3年6月29日

参加者：（以下敬称略）

NIMS 岡本

JAMSTEC 若井

電中研 平野

JAEA 山本、池田、上野、大谷

場所：オンライン

内容：各機関における研究の進捗状況と本プロジェクトにおける目標の共有

- ・打合せ会議（2回目）

開催日：令和3年11月8～9日

参加者：

NIMS 岡本

JAMSTEC 若井

電中研 平野

JAEA 池田、上野

場所：いわき

内容：環境サンプリングと進捗状況の確認と令和4年度研究計画の確認

4. 結言

計画に沿って研究計画が行われ、順調に進んでいる。特に 1F と関連する環境サンプルから微生物による腐食反応が確認できており、この腐食反応を抑制する条件の特定が今後進むことが期待できる。その他の計画に関しても、重要な実験を始めるための知見が得られ始めており、令和 4 年度での成果が期待できる。2.1 全体計画の表における令和 3 年度の計画に対して、それぞれの項目でどう達成されたかを以下に具体的に示す。

項目(1)の急速かつ局所的電気微生物腐食の診断と抑止技術の開発では、電気腐食細菌の濃縮技術を利用した鍵酵素群（バイオマーカー）の特定するために、モデル培養株を用いて電気細菌の濃縮する際の磁性ナノ粒子に対する洗浄条件等の最適化を行った。さらに、環境細菌叢に対しての効果を実証し、電気細菌を実際に濃縮できることを証明した。オンサイトで電気腐食機構の有無を検査する投げ込み試験片の開発においては、Cu、Bi、Zn、Mo、Sb といった金属が共存する場合に腐食速度に与える影響を検証し、腐食を 10 倍程度加速させる表面コーティング剤の開発に成功した。培養株を用いた微生物腐食機構速度の各条件での評価と抑制対策法の確立においては、1F 周辺環境サンプルから新種の可能性が高い *Cellulomonas* 属株を単離し、電気化学実験によって電気細菌であることを検証した。

項目(2)のバイオマーカー遺伝子の探索及びオンサイト診断技術の開発では、塩濃度、pH、温度を変動させた実験から鉄腐食性メタン生成菌による腐食では pH をアルカリにコントロールすることが有効であり、好気的な環境でのステンレス鋼腐食では栄養塩濃度よりも塩化物イオン濃度のコントロールが重要であることを明らかにした。加えて、1F 周辺環境の様々な環境試料を用いた培養及び遺伝子解析実験では、1F 建屋に浸入することが想定される地下水などにおいて非常に多様性に富む微生物が存在し、その中には高い腐食活性を持つ微生物の存在も明らかにした。また、培養物等のメタゲノム・メタトランスクリプトーム解析が進行中であり、得られた膨大な塩基配列データの中から今後バイオマーカーと成り得る遺伝子情報の特定を進めており、全ての実験を計画通り進めることができた。

項目(3)の 1F 設備において微生物腐食リスクが高まる環境条件のスクリーニングにおいては、1F サイト周辺の環境試料を用いた培養試験のうち高い腐食活性が得られた集積培養物から、淡水では初となる電気微生物鉄腐食を行うメタン生成細菌 TO1 株、局所的に腐食を引き起こす硫酸還元菌 TO2 株を単離し、これら単離株を用いることで、1F 設備のうち Sr 処理水タンクを想定した環境条件において腐食試験を行った。その結果、中性環境では高い腐食活性が見られ、1F 周辺環境に存在する微生物による腐食リスクはあるが、弱アルカリ環境では腐食活性は大きく低下したことから、環境条件の制御により腐食活性を抑制可能であることが推定された。以上、計画通り令和 3 年度の目標を達成した。今後は、他の 1F 設備を想定した環境条件での腐食試験を進め、微生物腐食リスクが高まる環境条件の推定を行う。また、本研究項目で得られた腐食微生物の単離株は NIMS、JAMSTEC、JAEA と共有、連携することでバイオマーカーの探索や、腐食試験片の詳細な解析に活用する予定である。

項目(4)の 1F 周辺環境の微生物の特徴の把握及び微生物腐食挙動の評価では、PCV 内の環境中で生成する可能性がある硝酸イオンを還元する脱窒菌に着目し、1F 周辺環境中での生息状況を確認する培養試験を行い、1F 周辺環境においても脱窒菌は生息することがわかった。また、硫酸還元菌を用いて鉄腐食試験片の腐食状況の観察を行い、局部腐食等の兆候を示す特異的な構造は認められないことを確認した。さらに、当初計画に追加して、腐食生成物が付着したまま試料断面を観察する手法を開発し、試料断面の FE-SEM 観察により微生物腐食によって形成した腐食生成物が付着した炭素鋼の断面観察が可能であることを確認した。

用語の説明書

電気腐食：細胞外に存在する鉄や硫化鉄などの電子ドナーから電子を取り出し、生命活動を行う際のエネルギー源として用いる電気細菌が引き起こす鉄腐食。

多核シトクロム膜酵素：細菌の細胞膜に存在し、電子を細胞膜の内外へと動かす電気導線のよ
うに働くタンパク質。内部に数十個並ぶヘム反応中心が電子キャリアーとして働く。

ナノワイヤー：外膜シトクロムを持つ直径の 20 nm 程度のワイヤーであり、これを用いて細菌
から離れた鉄からも電子を引き抜くと考えられている。

DAB ポリマー：シトクロム酵素を電顕観察用に染色するために使われるポリマー。本研究では、
外膜シトクロムを持つ電気腐食細菌を環境サンプルから濃縮するために用いる。

バイオマーカー：特定の微生物のみが持つ情報。例えば、微生物腐食を引き起こす微生物のみ
が持っている酵素（タンパク質）など。

電位貴化：電位の上昇のこと。耐食性のあるステンレス鋼では、その表面に不働態皮膜と呼ば
れる緻密な酸化層が存在し、金属の溶出を防いでおり、環境中に酸化性物質があっ
た場合には電位の上昇が生じる。電位が隙間腐食発生電位や孔食発生電位を超えて
上昇した場合には、不働態皮膜が破壊されて腐食が生じる。

電位卑化：電位の下降のこと。特に、電位貴化を起こしたステンレス鋼材で急激な電位の卑化
が生じた場合には、不働態皮膜の破壊による腐食の発生として捉えることができる。

次世代シーケンス：21 世紀初頭に普及しだした新しい核酸塩基配列解析方法であり、超並列型
ショートリード解析と呼ばれるように、100~300 塩基対程度の短い塩基配列を同時
進行で大量に解析することで、一度の解析で 100 億塩基対を超える情報を得ること
ができる手法。この手法を用いる装置を次世代シーケンサと呼ぶ。

ナノポアシーケンサ：微小な孔（ポア）を核酸塩基が通過する際に生じる電気信号を用いて塩
基配列を決定することができる解析装置。次世代シーケンサが超並列型ショール
ード解析であるのに対して、ナノポアシーケンサは並列型ロングリード解析が可能
であり、長い核酸分子を解析できる。加えて、MinION という装置はハンディタイプ
のナノポアシーケンサであり、ノートパソコンに接続することで野外調査にも利用
可能。

メタゲノム：一生物の持つ全遺伝情報をゲノムと呼び、メタゲノムとは一試料中に存在する複
数の生物のゲノム情報を差す。例えば、腐食環境の微生物のメタゲノム解析を実施
することで、どのような微生物が存在しているかだけでなく、それらの微生物の持
つ遺伝子の種類についても情報を得ることができる。

メタトランスクリプトーム：一生物がある一時点で実際に活動させている遺伝子の種類と量の情報をトランスクリプトームと言い、メタトランスクリプトームとは、複数の生物種から成る集団がある一時点で実際に活動させている遺伝子の種類と量の情報のこと。例えば、一種の微生物は数千の遺伝子を持っているが、その全てが常に活動状態にあるわけではなく、特定条件でのみ活動する遺伝子も多々ある。したがって、腐食環境と非腐食環境の比較解析によって、腐食時に活動している遺伝子の特定が可能。

16S rRNA 遺伝子：全ての細菌が持っている遺伝子の1つで、タンパク質合成装置を構成する必須遺伝子であり、全世界共通のデータベース上にこの遺伝子情報が集約されており、系統分類的な微生物同定に使うことのできる遺伝子。

アンプリコンシーケンス：次世代シーケンスの手法の1つで、メタゲノム解析と異なりある特定の遺伝子領域だけを増幅させて解析する手法。16S rRNA 遺伝子のアンプリコンシーケンスによって、ある環境中に存在する微生物の種構成を解析することが可能。

QIIME2（微生物群集構造解析パイプライン）：16S rRNA 遺伝子のアンプリコンシーケンスを実施すると、大量の塩基配列データが得られるが、それを1つずつ人間の手で解析することは情報量的に不可能であり、塩基配列データから微生物群集構造及び微生物多様性に関する情報をアウトプットするまでの解析を可能にしたソフトウェアの集合体。世界中の多くの微生物生態学研究者が使用している。

微生物群集構造解析：環境中には様々な微生物が混在しており、それらを網羅的に全て培養することができないので、微生物が共通して持っている遺伝子を標的としてその遺伝子配列を決定してどのような微生物がどれくらいの割合で存在しているかを解析する方法。

プライマー：核酸分子の部分配列を増幅させる技術である PCR において使用される 20 塩基程度からなる一本鎖のオリゴヌクレオチド。増やしたい遺伝子領域の両端に対応した塩基配列を持たせることで、挟み込んだ遺伝子領域を増幅することができる。

PCR：DNA は四種類のヌクレオチド（塩基部分が異なる）がリン酸時エステル結合により鎖状に長くつながったポリマー構造をしており、このような非常に長い生体高分子の一部を特異的に増幅する方法。耐熱性ポリメラーゼと呼ばれる酵素とプライマーを用いて連続的に反応させることで特定領域の増幅が可能。ポリメラーゼを連続的に反応させることから PCR と呼ばれる。

（培養）基質：微生物培養において培地成分の中でもエネルギーや炭素源として使われるものを基質と呼ぶ。例えば、グルコースなどの糖はエネルギー源や炭素源になり得るが、一部の微生物が使える鉄や硫黄といった無機物の基質はエネルギー源にしかならず、生体を構成する炭素は別から供給する必要がある。

オートクレーブ：微生物実験で頻繁に使用される高圧蒸気滅菌機のこと。一部の好熱性微生物や芽胞（微生物の卵のようなもの）を形成する微生物は煮沸では滅菌することができないので、121 °Cで20分程度処理することで滅菌ができる。

（菌の）植え継ぎ：微生物細胞は永久的には存在せず、時間と共に溶菌（細胞膜が劣化して中身が漏れ出した状態）して死んでしまうので、実験等で継続的に微生物を使用する場合には、培養物の一部を新鮮な培地に接種して、再度培養することで培養物を維持する。

