(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2005-509089
(P2005-509089A)
(43)公表日　平成17年4月7日(2005.4.7)

(51)Int.Cl.[7]	F I		テーマコード（参考）
C23F 15/00	C23F 15/00		4B065
// C12N 1/20	C12N 1/20	Z	4K062

審査請求 有　予備審査請求 有　（全 22 頁）

(21)出願番号	特願2002-543053 (P2002-543053)
(86)(22)出願日	平成13年10月23日 (2001.10.23)
(85)翻訳文提出日	平成15年4月28日 (2003.4.28)
(86)国際出願番号	PCT/US2001/051103
(87)国際公開番号	WO2002/040746
(87)国際公開日	平成14年5月23日 (2002.5.23)
(31)優先権主張番号	60/243,881
(32)優先日	平成12年10月26日 (2000.10.26)
(33)優先権主張国	米国 (US)

(71)出願人　502139046
ユニヴァーシティ　オブ　コネチカット
アメリカ合衆国　０６０３２　コネチカット州　ファーミントン　ファーミントン　アヴェニュー　２６３
(71)出願人　500020955
ユニヴァシティ　オブ　サザーン　カリフォルニア
アメリカ合衆国　カリフォルニア州　９００８９，ロサンジェルス，ユニヴァシティ　パーク
(74)代理人　100059959
弁理士　中村　稔
(74)代理人　100067013
弁理士　大塚　文昭

最終頁に続く

(54)【発明の名称】有益なバイオ膜による腐蝕防止

(57)【要約】
本発明は、金属表面の腐蝕を防止および／または低減する保護バイオ膜を形成する細菌類を提供する。また、本発明は、金属腐蝕の抑制剤であるポリアニオン性化学組成物を分泌する金属上に保護バイオ膜を形成する細菌類も提供する。

【特許請求の範囲】
【請求項１】
外表面を有する基体；および、
前記外表面の腐蝕を低減する前記外表面上の保護バイオ膜；
を含む金属であって、前記金属が鋼、銅またはアルミニウムでないことを特徴とする金属。
【請求項２】
前記金属が黄銅ＵＮＳ－Ｃ２６０００である、請求項１記載の金属。
【請求項３】
前記バイオ膜が細菌である、請求項１記載の金属。
【請求項４】
前記細菌が好気性生物である、請求項３記載の金属。
【請求項５】
前記細菌がバチルス　スブチリスまたはバチルス　リケニホルミスである、請求項４記載の金属。
【請求項６】
前記バイオ膜が約１０μｍ～約２０μｍの厚さである、請求項１記載の金属。
【請求項７】
外表面を有する金属を調製する工程；
前記外表面上に、前記外表面の腐蝕を低減する保護バイオ膜を適用する工程；
を含む金属腐蝕の低減方法であって、
前記金属が銅、アルミニウムまたは鋼でないことを特徴とする方法。
【請求項８】
前記調製工程が、黄銅ＵＮＳ－Ｃ２６０００である金属を調製する工程を含む、請求項７記載の方法。
【請求項９】
前記適用工程が、細菌である保護バイオ膜を適用する工程を含む、請求項７記載の方法。
【請求項１０】
前記適用工程が、好気性生物である細菌を適用する工程を含む、請求項９記載の方法。
【請求項１１】
前記適用工程が、バチルス　スブチリスまたはバチルス　リケニホルミスである細菌を適用する工程を含む請求項１０記載の方法。
【請求項１２】
前記適用工程が、約１０μｍ～約２０μｍの厚さである保護バイオ膜を適用する工程を含む請求項７記載の方法。
【請求項１３】
前記調製工程が、液体中に浸漬された金属を調製する工程を含む請求項７記載の方法。
【請求項１４】
前記調製工程が、人工海水またはルリアーバータニ媒体中に浸漬された金属を調製する工程を含む請求項１３記載の方法。
【請求項１５】
外表面を有する基体；および、
前記外表面の腐蝕を低減する前記外表面上の保護バイオ膜；
を含む金属であって、前記保護バイオ膜がポリアニオン性化学組成物を分泌する細菌であることを特徴とする金属。
【請求項１６】
前記金属が、アルミニウム、アルミニウム合金、銅、銅合金、チタン、チタン合金、ニッケルおよびニッケル合金からなる群から選ばれる請求項１５記載の金属。
【請求項１７】
前記金属が鋼である、請求項１５記載の金属。

【請求項１８】
前記鋼が軟鋼－１０１０である、請求項１７記載の金属。
【請求項１９】
前記細菌が好気性生物である、請求項１５記載の金属。
【請求項２０】
前記細菌が大腸菌である、請求項１９記載の金属。
【請求項２１】
前記細菌が、ポリアニオン性化学組成物を分泌するように遺伝子操作されている、請求項１５記載の金属。
【請求項２２】
前記ポリアニオン性化学組成物がポリホスフェートである、請求項１５記載の金属。
【請求項２３】
前記バイオ膜が約１０μｍ～約２０μｍの厚さである、請求項１５記載の金属。
【請求項２４】
外表面を有する金属を調製する工程；
前記外表面上に、前記外表面の腐蝕を低減する保護バイオ膜を適用する工程；
を含む腐蝕の低減方法であって、前記保護バイオ膜がポリアニオン性化学組成物を分泌する細菌であることを特徴とする方法。
【請求項２５】
前記調製工程が、アルミニウム、アルミニウム合金、銅、銅合金、チタン、チタン合金、ニッケルおよびニッケル合金からなる群から選ばれる金属を調製する工程を含む、請求項２４記載の方法。
【請求項２６】
前記調製工程が、鋼である金属を調製する工程を含む、請求項２４記載の方法。
【請求項２７】
前記調製工程が、軟鋼－１０１０である金属を調製する工程を含む、請求項２６記載の方法。
【請求項２８】
前記適用工程が、好気性生物である細菌を適用する工程を含む、請求項２４記載の方法。
【請求項２９】
前記適用工程が、大腸菌である細菌を適用する工程を含む、請求項２８記載の方法。
【請求項３０】
前記適用工程が、ポリアニオン性化学組成物を分泌するように遺伝子操作された細菌を適用する工程を含む、請求項２４記載の方法。
【請求項３１】
前記適用工程が、ポリホスフェートであるポリアニオン性化学組成物を適用する工程を含む、請求項２４記載の方法。
【請求項３２】
前記適用工程が、約１０μｍ～約２０μｍの厚さである保護バイオ膜を適用する工程を含む、請求項２４記載の方法。
【請求項３３】
前記調製工程が、液体中に浸漬された金属を調製する工程を含む、請求項２４記載の方法。
【請求項３４】
前記調製工程が、人工海水またはルリア－バータニ媒体中に浸漬された金属を調製する工程を含む請求項２４記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【０００１】
（技術分野）
本発明は、金属腐蝕の防止および／または低減に関する。さらに詳細には、本発明は、保

護バイオ膜を含む金属、および保護バイオ膜による金属腐蝕の防止および／または低減方法を提供する。

【０００２】

（背景技術）

金属類、コンクリートおよびモルタルのような材料に対する腐蝕損害は、現代の経済性おいてかなりの出費である。例えば、腐蝕損害の年間コストは、国民総生産のかなりの画分となると推定されている。腐蝕感受性材料、とりわけ金属類を腐蝕損害から保護する優れた方法により、これらのコストを有意に節減することができる。

カルボキシレート類（例えば、（C_6～C_{10}）の直鎖脂肪族モノカルボン酸類、（C_3～C_{14}）ジカルボン酸類、ポリマレイン酸およびポリアクリル酸）、ポリペプチド類およびポリホスフェートのような広範囲のアニオン性有機および無機化合物は、鋼、銅およびアルミニウムのような金属の腐蝕を抑制する（Ｓｅｋｉｎｅら，　Ｅｌｅｃｔｒｏｃｈｅｍ．　Ｓｏｃ．，　Ｖｏｌ．　１３９，　１１：３１６７－３１７３頁，　１９９２年、これはここで参考として取り入れる；Ｈｅｆｔｅｒら，　Ｃｏｒｒｏｓｉｏｎ．　５３，　８：６５７－６６７頁，　１９９７年、これはここで参考として取り入れる；Ｗｒａｎｇｌｅｎ，　”Ａｎ　Ｉｎｔｒｏｄｕｃｔｉｏｎ　ｔｏ　ｔｈｅ　Ｃｏｒｒｏｓｉｏｎ　ａｎｄ　Ｐｒｏｔｅｃｔｉｏｎ　ｏｆ　Ｍｅｔａｌｓ”，　Ｈａｌｓｔｅｄ　Ｐｒｅｓｓ，　Ｎｅｗ　Ｙｏｒｋ，　ＮＹ，　１９７２年）。従って、これらの抑制剤を金属類に適用することは、腐蝕損害を低減する１つの方法である。

腐蝕損害を低減する他の方法は、金属類のような腐蝕感受性材料上でのバイオ膜の増殖を防止することである。バイオ膜は、好気性細菌類からなり、自然環境において金属表面上に容易に発生し、これら表面の腐蝕速度を増大させることに関与している。代謝的に活性な細菌類は、表面に対する増強された侵蝕性向を示し、十分な栄養素の下に、外多糖類（ｅｘｏｐｏｌｙｓａｃｃａｈａｒｉｄｅ）を産生して成熟バイオ膜を形成する。従って、バイオ膜は、表面に付着した外多糖類マトリックス内に囲い込まれた微生物集団である。外多糖類は、表面への細菌類の固定を助長し、さらなるバイオ膜の発生に不可欠である。

【０００３】

微生物類は、電気化学反応の速度を増大させ、それによって腐蝕メカニズムを変えることなく、殆どの金属類の腐蝕速度を増大させるものと信じられている（Ｌｉｔｔｌｅら，　Ｉｎｔ．　Ｍａｔ　Ｒｅｖ．，　３６，　６，　１，　１９９１年）。また、腐蝕は、金属表面上での不均一なバイオ膜形成および微小コロニーの発生によっても生じ得、金属表面近くでの酸素濃度勾配および差動通気セル（ｄｉｆｆｅｒｅｎｔｉａｌ　ａｅｒａｔｉｏｎ　ｃｅｌｌｓ）をもたらす。典型的には、金属表面近くに位置する好気性バイオ膜の領域は、細菌の呼吸によって生ずる酸素欠乏のために無酸素状態である。硫酸塩還元性細菌は、これらの嫌気性領域において発生し、広範な金属表面に対して著しい腐食損害を生じ得る。

微生物によって生ずる腐食に対処する通常の方法としては、ｐＨ調整、レドックス電位操作、無機コーティング、陰極性保護および殺生剤がある。塗料またはエポキシ類のような保護コーティングは、一般的に使用されているが、適用および保全に費用がかかる。陰極性保護は、電気防食陽極と接続するかまたは外部電源から耐腐食性陽極に電流を通すことによって金属表面上の陰極反応を刺激する必要がある。電流は、金属表面上の電気化学的電位を低下させ、それによって金属カチオン形成および結果としての腐蝕を防止する。

殺生剤は、恐らく、微生物によって生ずる腐食を低減させる最も普通の方法である。塩素、クロラミン類、および塩素化化合物のような酸化性殺生剤は、多くの場合、淡水系において使用される。塩素および塩素化誘導体は、最もコスト効率性で有効な殺生剤である。しかしながら、塩素および塩素化化合物の活性はｐＨ、光および温度に依存しており、これらのハロゲン誘導体は、通常、バイオ膜増殖を阻害しない。

第４級塩、アミンタイプ化合物およびアンスラキノン類のような非酸化性殺生剤は、安定であり、種々の環境において使用し得る。しかしながら、これらの殺生剤は、費用高であり、重大な環境劣化を生じ得る。

微生物によって生ずる腐食を制御する他の方法は、栄養素操作によってとりわけ有害な微生物の増殖を抑制することである。また、表面への細菌付着を防止するポリマー類を使用して表面をコーティングし、それによってバイオ膜形成を防止するもできる。

【０００４】

驚くべきことに、最近の幾つかの研究においては、好気性細菌が鋼、銅およびアルミニウムのような金属表面上に保護バイオ膜を形成することによって金属腐蝕を抑制することが示唆されている（Ｋ．Ｍ．　Ｉｓｍａｉｌら，　Ｅｌｅｃｔｒｏｃｈｉｍｉｃａ　Ａｃｔａ、印刷中；Ｋ．　Ｍ．　Ｉｓｍａｉｌら、Ｃｏｒｒｏｓｉｏｎへ投稿済み；Ａ．　Ｊａｙａｒａｍａｎら，　Ｊｏｕｒｎａｌ　ｏｆ　Ｉｎｄｕｓｔｒｉａｌ　Ｍｏｃｒｏｂｉｏｌｏｇｙ　１８：３９６－４０１，　１９９７年；Ａ．　Ｊａｙａｒａｍａｎら，　Ｊｏｕｒｎａｌ　ｏｆ　Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌｏｇｙ　８４：４８５－４９２，　１９９７年；Ａ．　Ｊａｙａｒａｍａｎら，　Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌｏｇｙ　＆　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　４７：６２－６８，　１９９７年；Ａ．　Ｊａｙａｒａｍａｎら，　Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌｏｇｙ　＆　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　５２：７８７－７９０，　１９９７年、これらはここで参考として取り入れる）。好気性細菌は、呼吸により、金属を酸化させる酸素を欠乏させ得る（Ａ．　Ｊａｙａｒａｍａｎら，　Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌｏｇｙ　＆　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　４８：１１－１７，　１９９７年、ここで参考として取り入れる）。しかしながら、酸素欠乏は、嫌気性硫酸塩還元性細菌類が金属表面に群落しかなりの腐食損害を生ずる機会も創生し得る。即ち、金属腐蝕を抑制するバイオ膜の使用は、硫酸塩還元性細菌によって生ずる腐食による反対作用も起し得る。最近、上記問題に対する可能性ある解決法において、硫酸塩還元性細菌の増殖を抑制する抗菌性たんぱく質を分泌する遺伝子操作された好気性細菌を使用して、ステンレススチールの全体的腐蝕を抑制するバイオ膜を形成させている（Ａ．　Ｊａｙａｒａｍａｎら，　Ｊｏｕｒｎａｌ　ｏｆ　Ｉｎｄｕｓｔｒｉａｌ　Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌｏｇｙ　ａｎｄ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　２２：１６７－１７５，　１９９９；Ａ．　Ｊａｙａｒａｍａｎら，　Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌｏｇｙ　ａｎｄ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　５２：２６７－２７５，　１９９９、これらはここで参考として取り入れられる）。

鋼、銅またはアルミニウムの腐蝕を低減または防止するバイオ膜の能力は最近示唆されているが、他の金属の腐蝕を防止または低減するバイオ膜の使用は、まだ研究されていない。さらに、ポリアニオン性化学組成物を分泌して金属類の全体的腐蝕を防止する保護バイオ膜を形成する遺伝子操作された細菌の使用も、まだ研究されていない。そのような発明は、バイオ膜類が腐蝕抑制剤および殺生剤よりもはるかに安価であるため、また、これらのバイオ膜が天然に形成され自己永続性であるので、当該技術における著しい進歩である。

【０００５】

（発明の開示）

本発明は、金属表面の腐蝕を防止および／または低減する保護バイオ膜を形成する細菌類を使用することによって上記の要求に対処する。また、本発明は、保護バイオ膜を形成し且つ金属腐蝕の抑制剤であるポリアニオン性化学組成物を分泌する細菌類も提供する。

１つの様相において、本発明は、外表面を有する基体を有する鋼、銅またはアルミニウムではない金属を提供する。保護バイオ膜は、その外表面の腐蝕を低減する外表面上に存在させる。

１つの実施態様においては、上記金属は黄銅ＵＮＳ－Ｃ２６０００である。もう１つの実施態様においては、上記バイオ膜は細菌である。好ましくは、上記細菌は好気性生物であり、より好ましくは、上記細菌はバチルス　スブチリス（Ｂａｃｉｌｌｕｓ　ｓｕｂｔｉｌｉｓ）またはバチルス　リケニホルミス（Ｂａｃｉｌｌｕｓ　ｌｉｃｈｅｎｉｆｏｒｍｉｓ）である。好ましくは、上記バイオ膜は、約１０μｍ～約２０μｍの厚さである。

もう１つの様相においては、本発明は、金属腐蝕の低減方法を提供する。本発明の方法においては、外表面を有する鋼、銅またはアルミニウムではない金属を用意し、腐蝕を低減

する保護バイオ膜を外表面上に適用する。
１つの実施態様においては、上記金属は黄銅ＵＮＳ－Ｃ２６０００である。もう１つの実施態様においては、上記バイオ膜は細菌である。好ましくは、上記細菌は好気性生物であり、より好ましくは、上記細菌はチルス　スブチリスまたはバチルス　リケニホルミスである。好ましくは、上記バイオ膜は、約１０μｍ～約２０μｍの厚さである。１つの実施態様においては、上記金属は、液体中に浸漬される。好ましくは、その液体は、人工海水またはルリア－バータニ（Ｌｕｒｉａ－Ｂｅｒｔａｎｉ）媒体である。
【０００６】
さらにもう１つの様相においては、本発明は、外表面を有する基体である金属を提供する。保護バイオ膜は、ポリアニオン性化学組成物を分泌し、外表面上におかれ、外表面の腐蝕を低減する。
１つの実施態様においては、上記金属は、アルミニウム、アルミニウム合金、銅、銅合金、チタン、チタン合金、ニッケルまたはニッケル合金である。もう１つの実施態様においては、金属は鋼である。好ましい実施態様においては、鋼は軟鋼－１０１０である。
好ましくは、細菌は好気性生物であり、より好ましくは、細菌は大腸菌（Ｅ．　ｃｏｌｉ）である。１つの実施態様においては、この細菌は、遺伝子操作されてポリアニオン性化学組成物を分泌する。もう１つの実施態様においては、このポリアニオン性化学組成物はポリホスフェートである。好ましくは、上記バイオ膜は、約１０μｍ～約２０μｍの厚さである。
最後の様相においては、本発明は、金属腐蝕のもう１つの低減方法を提供する。この方法においては、外表面を有する金属を用意し、腐蝕を低減する保護バイオ膜を外表面上に適用する。この保護バイオ膜は、ポリアニオン性化学組成物を分泌する細菌である。
１つの実施態様においては、上記金属は、アルミニウム、アルミニウム合金、銅、銅合金、チタン、チタン合金、ニッケルまたはニッケル合金である。もう１つの実施態様においては、金属は鋼である。好ましい実施態様においては、鋼は軟鋼－１０１０である。
好ましくは、細菌は好気性生物であり、より好ましくは、細菌は大腸菌である。１つの実施態様においては、この細菌は、遺伝子操作されてポリアニオン性化学組成物を分泌する。もう１つの実施態様においては、このポリアニオン性化学組成物はポリホスフェートである。好ましくは、上記バイオ膜は、約１０μｍ～約２０μｍの厚さである。１つの実施態様においては、上記金属は液体中に浸漬される。好ましくは、その液体は、人工海水またはルリア－バータニ媒体である。
【０００７】
（発明の詳細な説明）
以下、本発明の好ましい実施態様について詳細に説明する。本発明を好ましい実施態様に関連して説明するけれども、本発明をこれらの好ましい実施態様に限定するものではないことを理解されたい。逆に、特許請求の範囲において定義したような本発明の精神および範囲に属し得る変更、修正および均等物は、本発明に包含されるものとする。
本発明の金属１０２を図１に示す。金属１０２は、少なくとも１つの外表面１０４を有する任意の可能性ある形状を有し得る。従って、例えば、基体の選択は、使用または形状によって制約されない。また、金属基体の外表面も使用または形状によって制約されない。一般に、図１に示すように、基体の外表面上に、外表面の腐蝕を低減または防止する保護バイオ膜１０６を存在させる。
好ましい実施態様においては、多糖類コーティング内に取り囲まれた付着性細菌が金属上に保護バイオ膜を形成する。好ましくは、保護バイオ膜は、約１０μｍ～約２０μｍの厚さである。好ましい実施態様においては、保護バイオ膜は好気性細菌から形成される。
好ましくは、保護バイオ膜の厚さは、共焦点走査レーザー顕微鏡のような当該技術において既知の方法によって測定し得る（Ａ．　Ｊａｙａｒａｍａｎら，　Ｊ．　Ａｐｐｌ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．，　８４：　４８５，　１９９８年；Ａ．　Ｊａｙａｒａｍａｎら，　Ｊ．　Ｉｎｄｕｓｔｒｉａｌ　Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌｏｇｙ　＆　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　２２：１６７，　１９９９年；１９９９年3月３１日に出願された米国特許出

願第０９／２８２，２７７号）。バイオ膜から得られた共焦点走査レーザー顕微鏡データの画像処理と解析も、当該技術における既知の方法によって行い得る（Ａ．　Ｊａｙａｒａｍａｎら，　Ｊ．　Ａｐｐｌ．　Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．，　８４：　４８５，　１９９８年；Ａ．　Ｊａｙａｒａｍａｎら，　Ｊ．　Ｉｎｄ．　Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．　＆　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．　２２：１６７，　１９９９年；１９９９年3月３１日に出願された米国特許出願第０９／２８２，２７７号）。

【０００８】

一般に、１つの好ましい実施態様においては、細菌が保護バイオ膜を形成する場合、金属は、銅、アルミニウムまたは鋼以外の任意の金属である。好ましくは、金属は、鉄、アルミニウム合金、チタン、チタン合金、銅合金、ニッケル、ニッケル合金またはこれらの混合物である。より好ましくは、金属は、黄銅ＵＮＳ－Ｃ２６０００であり、この標示は、この標示のための工業的基準を満たす特定等級の黄銅を称する。

好ましくは、細菌が保護バイオ膜を形成し且つまたアニオン性化学組成物をも分泌する場合には、金属は、アルミニウム、アルミニウム合金、チタン、チタン合金、銅、銅合金、ニッケル、ニッケル合金、軟鋼、ステンレススチールまたはこれらの混合物である。好ましくは、金属は鋼であり、より好ましくは、軟鋼－１０１０であり、この標示は、この標示のための工業的基準を満たす特定等級の鋼を称する。

一般に、細菌は、金属基体の外表面の腐蝕を低減または防止する金属環境に適合し得えなければならない。例えば、海水中での腐蝕からの金属保護を必要とする場合、細菌は、海水と適合性でなければならない。逆に、淡水中での腐蝕からの金属保護を必要とする場合、細菌は、淡水と適合性でなければならない。

好ましくは、金属は、液体中に浸漬される。より好ましくは、その液体は、バターネン９（Ｖａｔａａｎｅｎ　ｎｉｎｅ）塩溶液（好ましくは、約ｐＨ　７．５）またはルリア－バータニ媒体（好ましくは、約ｐＨ　６．５）である。

【０００９】

選択する細菌類は、金属表面上でバイオ膜を形成し得なければならない。個々の細菌の種々の環境におけるバイオ膜形成能力を測定する方法は、当該技術において既知である（Ｊａｙａｒａｍａｎら，　Ｊ．　Ａｐｐｌ．　Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．，　４８：　１１－１７，　１９９７年）。好ましくは、バチルス（Ｂａｃｉｌｌｕｓ）属、シュードモナス（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）属、セラティア（Ｓｅｒｒｔｉａ）属またはエシェリヒア（Ｅｓｈｅｒｉｃｈｉａ）属からの細菌を使用して金属類上にバイオ膜を形成させる。より好ましくは、バチルス属からの細菌を使用して金属上にバイオ膜を形成させる。最も好ましくは、バチルス　スブチリスおよびバチルス　リケニホルミスを使用して金属の外表面上にバイオ膜を形成させる。もう１つの好ましい実施態様においては、大腸菌を使用して金属の外表面上にバイオ膜を形成させる。

さらに、バイオ膜を形成させるのに使用する細菌類は、金属の環境条件の温度およびｐＨ条件下において増殖しなければならない。殆どの細菌種の温度、ｐＨ、他の環境条件および許容性は、熟練技術者であれば、当該技術における既知の情報を使用して、一般的に確認し得ることである。即ち、当業者であれば、特定の細菌が金属環境において増殖するかどうかを確認することは可能なことである。

細菌類は、細菌類が表面に接触し得る任意の手段によって、基体の外表面に適用し得る。従って、例えば、細菌類は、基体の外表面に、細菌類または細菌類を含有する混合物を腐食感受性材料の外表面上に接触させ、スプレーし、ブラシ掛けし、ホース掛けし、或いはドリッピングすることによって適用することができる。細菌類は、存在するバイオ膜内に空間を生ずるためのスクラッピングによってまたは表面のスクラッピングなしでも表面上に適用することができる。

【００１０】

バイオ膜は、金属の外表面を腐蝕から保護すべきである。金属表面の腐蝕を検出ための当業者にとって周知の好ましい方法は、電気化学インピーダンス分光測定法である。電気化学インピーダンス分光測定法は、細菌誘発型腐食の実験室研究において、さらに野外にお

ける腐蝕モニタリングにおいて使用されている（Ａ．　Ｊａｙａｒａｍａｎら，　Ｊ．Ａｐｐｌ．　Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．，　４８：　１１－１７，　１９９７年）。電気化学インピーダンス分光測定法は、連続媒体実験において腐蝕を測定するのに理想的な非侵略的な方法である。従って、当業者であれば、電気化学インピーダンス分光測定のような方法を使用して、バイオ膜が金属外表面を特定の環境における腐蝕から保護しているかどうかを容易に測定できるだろう。

バイオ膜の耐腐食効果は、腐蝕を低減させる化学組成物（好ましくは。ポリアニオン性化学組成物）を分泌する細菌を使用してバイオ膜を形成させることによって増強させることができる。細菌類は、腐蝕を低減する化学組成物を本来的に分泌し得るか、或いは遺伝子操作して腐蝕を低減する化学組成物を分泌するようにすることができる。

例えば、アミノ酸類は、有効な腐蝕抑制剤として当該技術において周知である。最近、ポリグルタミン酸塩、ポリグリシン、ポリアスパラギン酸塩またはこれらアミノ酸類の組合せのようなポリペプチド類が金属類の腐蝕の低減において有効であることが示されてきている。従って、ポリグルタミン酸塩、ポリグリシン、ポリアスパラギン酸塩またはこれらアミノ酸類の混合物のような化学組成物を分泌する好気性バイオ膜は、腐蝕低減において有効であり得る。

【００１１】

ポリアニオン類も有効な腐蝕抑制剤として当該技術において周知である。従って、ポリアニオン性化学組成物を分泌する好気性バイオ膜は、腐蝕を低減するのに有効である。好ましい実施態様においては、ポリホスフェートのようなポリアニオン性化学組成物を分泌するように遺伝子操作した細菌を使用して金属類上にバイオ膜を形成させる。

パラバクチン（ｐａｒａｂａｃｔｉｎ；パラコッカス　デニトリフィカンス（Ｐａｒａｃｏｃｃｕｓ　ｄｅｎｉｔｒｉｆｉｃａｎｓ）から単離）およびエンテロバクチン（ｅｎｔｅｒｏｂａｃｔｉｎ；大腸菌から単離）のようなシデルホア（ｓｉｄｅｒｐｈｏｒｅ）類は、細菌類によって産生分泌されて輸送のための第２鉄イオンを可溶化する比較的低分子量のキレート化剤であり、鉄の腐蝕を抑制する。従って、シデルホア類も鉄の腐蝕を低減し得る。

シデルホア遺伝子は、強力な構成プロモーターの制御下に置換されて細菌内で過発現し、上記のキレート化剤を正常に分泌し得る。また、細菌類を、シデルホアを含む化学組成物を分泌するように遺伝子操作することもできる。その後、これらの細菌類を使用して、金属類を腐蝕から保護するバイオ膜を形成させることができる。

本発明において使用する細菌類は、１種以上の耐腐食剤を分泌し得る。２種以上の耐腐食剤を分泌する細菌類の使用は、２種の耐腐食剤が金属腐蝕を相乗的に低減する場合に有利であり得る。例えば、細菌類を、ポリアスパラギン酸塩、ポリグルタミン酸塩、これら２種のペプチド類からなるポリペプチド類、パラバクチン、エンテロバクチン、他のシデルホア類、ポリホスフェートのようなポリアニオン類またはこれらの混合物のような複数の耐腐食剤を産生するように遺伝子操作することができる。

【００１２】

細菌類は、遺伝子発現技術における周知の方法を使用する組換えＤＮＡ技術によって、ポリグルタミン酸塩もしくはポリアスパラギン酸塩のようなポリペプチド類、シデルホア類またはポリアニオン類を分泌するように遺伝子操作し得る。これらの方法としては、例えば、インビトロ組換えＤＮＡ法、合成法およびインビボ遺伝子組換え法がある。腐蝕防止性のポリペプチド類、シデルホア類またはポリアニオン成分の発現系のＤＮＡおよびＲＮＡコード化ヌクレオチド配列を、例えば、商業的に入手し得る合成剤を使用して、化学的に合成することもできる。

種々の宿主発現ベクター系を使用して腐蝕防止性のポリペプチド類、シデルホア類またはポリアニオン類を発現させることができる。本発明の目的において使用し得る発現系としては、限定するものではないが、腐蝕防止性のポリペプチド類、シデルホア類またはポリアニオン成分の発現系をコード化するヌクレオチド配列を含有する組換えバクテリオファージＤＮＡ、プラスミドＤＮＡまたはコスミドＤＮＡ発現ベクターによって形質転換させ

た大腸菌またはＢ．スブチリスのような細菌類がある。
腐蝕防止性のポリペプチド類、シデルホア類またはポリアニオン成分の発現系を含有する化学組成物を、バイオテクノロジー技術における熟練者とって既知の発現系を使用して、原核細胞内に発現させることもできる。本発明の実施において有用であり得る発現系は、米国特許第５，７９５，７４５号、第５，７１４，３４６号、第５，６３７，４９５号、第５，４９６，７１３号、第５，３３４，５３１号、第４，６３４，６７７号、第４，６０４，３５９号、第４，６０１，９８０号に記載されている。
即ち、非相同性ＤＮＡを含むＤＮＡを細菌細胞内に導入し、得られる遺伝子生成物を発現させる多くの方法が、当該技術において既知である。細菌類を形質転換させて腐蝕防止性のポリペプチド、シデルホアまたはポリアニオンの化学組成物を発現させる方法は、本発明の実施においては重要ではない。好ましい実施態様においては、ポリホスフェートキナーゼ遺伝子およびリン酸塩特異性輸送系を含有するプラスミドを使用して、大腸菌を形質転換させる。その後、得られた移入体は、ポリホスフェートを分泌する。
【００１３】
実施例
以下の実施例は、本発明の特徴を単に例示する目的で提示するものであり、本発明の範囲を如何なる形においても限定するものではない。
実施例１
カートリッジ黄銅（ＵＮＳ－Ｃ２６０００、７０％ＣＵ／３０％Ｚｎ）プレート（１０ｃｍ×１０　ｃｍ四方、２　ｍｍ厚）をシート材から切取り、２４０グリット紙（Ｂｕｅｈｌｅｒ社、イリノイ州レークブルッフ）で研磨した。人口海水は、バターネン９種塩溶液（ＶＮＳＳ、ｐＨ　７．５）であった（Ｇ．　Ｈｅｒｎａｎｄｅｚら，　Ｃｏｒｒｏｓｉｏｎ　Ｓｃｉｅｎｃｅ，　５０，　６０３，　１９９４年）。ルリアーバータニ（ＬＢ、ｐＨ　６．５）媒体は、１リットル当り１０　ｇのトリプトン、５　ｇの酵母抽出物、および１０　ｇのＮａＣｌから調製した富増殖培地であった（Ｔ．　Ｍａｎｉａｔｉｓら，　”Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｃｌｏｎｉｎｇ：　Ａ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｍａｎｕａｌ．”　Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ，　１９８２年）。カルガリー大学のＳｕｉ－Ｌａｍ　Ｗｏｎｇ博士から入手したバチルス　スブチリスＷＢ６００は、プロテアーゼ欠乏株である（カナマイシン耐性誘導体を本実施例においては使用した）　（Ｘ．－Ｃ．　Ｗｕ，ら，　Ｊ．　Ｂａｃｔｅｒｉｏｌ．　１７３．，　４９５２，　１９９１年）。バチルス　リケニホルミス９９４５ａは、Ａｍｅｒｉｃａｎ　Ｔｙｐｅ　Ｃｕｌｔｕｒｅ　Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎから入手した。黄銅ＵＮＳ－Ｃ２６０００上のバイオ膜は、ガラス／テフロン（登録商標）円筒状連続反応器内で、約３０℃のＬＢまたはＶＮＳＳ中で、約０．２　ｍＬ／ｍｉｎの液体栄養素流量によって発生させた（Ａ．　Ｊａｙａｒａｍａｎ，ら，　Ａｐｐｌ．　Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．，　４８，　１１，　１９９７年）。空気流は頭部空間に向けて約２００　ｍＬ／ｍｉｎであり、反応器の処理容積は約１００　ｍＬまたは１５０　ｍＬであり、試験電極の露出表面積は約２８．３　ｃｍ^{2}であった。各連続反応器（無菌および接種）を約１００　μｇ／ｍＬのカナマイシンの存在下に操作して無菌性を確立させた（Ｂ．リケニホルミスを除く）。濁り１６時間培養物からの１％（容積／容積）細菌接種物を各連続試験において使用した。
【００１４】
実施例２
チタン対向電極（１１．３　ｃｍ^{2}表面積）とオートクレーブ処理可能なＡｇ／ＡｇＣｌ参照電極（Ｉｎｇｏｌｄ　Ｓｉｌｖｅｒ　Ｓｃａｖｅｎｇｅｒ　ＤＰＡＳモデル１０５０５３３３４；Ｍｅｔｌｅｒ－Ｔｏｌｅｄｏ　Ｐｒｏｃｅｓｓ　Ａｎａｌｙｔｉｃａｌ社、マサチューセッツ州ウィルミントン）を使用して、実施例１で述べたようにして調製した黄銅ＵＮＳ－Ｃ２６０００上のバイオ膜の電気インピーダンス分光測定を行った。
電気化学インピーダンスデータは、Ｇａｔｅｗａｙ　Ｐｅｎｔｉｕｍ　ＧＰ６　３００　ＭＨＺコンピュータ（サウスタコダ州ノースシオックスシティー）にインターフェイスさせたＴＨＡＬＥＳ　Ｉｍｐｅｄａｎｃｅ　Ｍｅａｓｕｒｅｍｅｎｔ　ａｎｄ　Ｅｑｕｉｖ

ａｌｅｎｔ Ｃｉｒｃｕｉｔ Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ／ Ｓｉｍｕｌａｔｉｏｎ／Ｆｉｔｔｉｎｇソフトウェアによって操作する１６チャネル電池マルチプレクサを備えたＩＭ６ Ｅｌｅｃｔｒｏｃｈｅｍｉｃａｌ Ｉｍｐｅｄａｎｃｅ Ａｎａｌｙｚｅｒ（Ｂｉｏａｎａｌｙｔｉｃａｌ Ｓｙｓｔｅｍｓ －Ｚａｈｎｅｒ社、インディアナ州ウェストラファイエット）を使用して、２０ ｋＨｚ～１．３ ｍＨｚの周波数範囲の開路電位E_{corr}で得た。

各試験は、ＶＮＳＳおよびＬＢ媒体中の黄銅ＵＮＳ－Ｃ２６０００において実施し、表１に列挙している。幾つかの試験は重複して行っている。

【００１５】

表１

試験#	媒体	pH	株	分泌抑制剤
174	VNSS	7.5	無菌	
239	VNSS	7.5	無菌	
238	VNSS	7.5	B.スブチリスWB600	
176	VNSS	7.5	B.スブチリスWB600/ pBE92-ポリアスパルテート	ポリアスパルテート
175	VNSS	7.5	B.リケニホルミス	γ-ポリグルタメート
166	LB	6.5	無菌	
130	LB	6.5	B.スブチリスWB600	
131	LB	6.5	B.スブチリスWB600/ pBE92-ポリアスパルテート	ポリアスパルテート
168	LB	6.5	B.スブチリスWB600/ pBE92-ポリアスパルテート	ポリアスパルテート
132	LB	6.5	B.リケニホルミス	γ-ポリグルタメート
167	LB	6.5	B.リケニホルミス	γ-ポリグルタメート

無菌ＶＮＳＳ（ｐＨ ７．５）において得られたボーデ（Ｂｏｄｅ）プロットを図２に示し、図３はＢ．スブチリスの存在する相応するボーデプロットを示している。図２と図３とのインピーダンススペクトルの比較は、バイオ膜の存在が腐蝕保護を与えていることを定性的に示唆している。図４は、ＶＮＳＳ中で１日、３日および１０日間暴露後の黄銅において得られたインピーダンススペクトルを示し、図５および６は、それぞれ、Ｂ．スブチリスＷＢ６００／ ｐＢＥ９２－ポリアスパルテート（ポリアスパルテートを産生する）およびＢ．リケニホルミス（γ－ポリグルタメートを産生する）の存在下で得られたインピーダンススペクトルを示している。

【００１６】

極めて腐食性のＶＮＳＳにおいては、インピーダンスデータは低く、数時間の一定状態が図４において示されるように観察された。しかしながら、バイオ膜の存在においては、イ

ンピーダンスの大きな上昇が、図５および６において分るように、主として容量挙動を伴って観察された。腐蝕速度に比例する正規化逆分極抵抗１／R_pの時間依存性を図７に示しており、キャパシタンスＣを図８に示している。バイオ膜をコーティングした黄銅における腐食速度は、図７に示すようにおよそ同じであり、黄銅単独よりも低かった。キャパシタンスＣは、試験の初期段階の無菌溶液において僅かに低めであった。しかしながら、暴露終了時において、極めて類似するＣ値が、黄銅をバイオ膜でコーティングする３つの溶液すべてにおいて得られた。

ＶＮＳＳ中で黄銅ＵＮＳ－Ｃ２６０００を保護する各バイオ膜の能力は、腐蝕電位（E_{corr}）が時間と共に上昇することから、黄銅表面の酸素濃度の低下に基づくものではない。即ち、黄銅の高品位化（ｅｎｎｏｂｌｅｍｅｎｔ）は、図９に示しているように、バイオ膜の存在するＶＮＳＳにおいて観察された。１０日後、E_{corr}は、細菌を含まないＶＮＳＳにおいては約１００　ｍＶ低下していた。

ＶＮＳＳに暴露させたサンプルは暗色膜によって覆われ、一方、細菌類を含有するＶＮＳＳに暴露させたサンプルは、変色しないままであり、腐蝕性侵蝕の兆候を示さなかった。H_2SO_4／$Na_2Cr_2O_7$溶液中で腐蝕生成物を除去した後、局在化侵蝕の兆候は、無菌ＶＮＳＳに暴露させたサンプルにおいて見出せなかった。即ち、腐蝕過程は、黄銅の通常受ける脱亜鉛化メカニズムによって進行するものと想定される。

【００１７】

ｐＨ　＝　６．５のＬＢ媒体中で実施した各試験（表１）も同様な結果を生じていた。無菌ＬＢ媒体中において得られたインピーダンススペクトルは、図１０に示すように、R_pによる直列のウォーバーグ（Ｗａｒｂｕｒｇ）インピーダンス（ランドレス回路）によって示される拡散制御法において観察されるインピーダンススペクトルと同様であった。ポリアスパルテート（図１１）またはγ－ポリグルタメート（図１２）を産生するバイオ膜の存在においては、そのインピーダンスは、ＶＮＳＳにおいて得られた結果（図２～６）と同様な本質的な容量挙動を伴ってはるかに高かった。１／R_pとして表す相対腐蝕速度およびキャパシタンスＣの時間依存性は、それぞれ、図１３および図１４に示す。

腐蝕速度は、図１０、１１および１２を比較することによって理解できるように、２種の各バイオ膜が存在する場合（極めて同様な腐蝕速度が観察された）よりも無菌ＬＢ媒体において相当程度に高かった。各バイオ膜が存在するＬＢ媒体において測定したR_p値は、図１３において示すように、ＶＮＳＳにおける同じ条件において観察された値と同様であった。約10^5オーム／cm^2の平均R_p値は、約２μｍ／年の腐蝕速度に相当し、この値は全く低い。キャパシタンス値は、ＬＢ媒体における表１のすべての暴露条件において同様であった（図１４）。重複試験は、図１３および１４において理解できるように、R_pおよびＣそれぞれに匹敵する値を生じていた。図１４の結果は、バイオ膜の形成が未知のメカニズムによって腐食性侵蝕を防止していることを示しているようである。

【００１８】

無菌ＬＢ媒体への暴露後、サンプルは、腐蝕生成物の暗色膜に覆われていた。その膜をH_2SO_4／$Na_2Cr_2O_7$溶液中で除去したとき、局在化した侵蝕の兆候は見出せなかった。細菌による各試験において使用したサンプルは、変色しないままであり、腐食性侵蝕の兆候を何ら示さなかった。高品位化も、これらの系においては、無菌溶液（試験＃１６６）とｙ－ポリグルタメートを産生するＢ．リケニホルミスを含有する溶液（試験＃１３２および１６７）との間の約２００　ｍＶのE_{corr}差によって観察され、その高品位化は、ポリアスパルテートを産生するＢ．スブチリスＷＢ６００／ｐＢＥ９２－ポリアスパルテート（試験＃１３１および１６８）におけるよりも明白なようであった（図１５）。

ＶＮＳＳおよびＬＢ媒体中での黄銅ＵＮＳ－Ｃ２６０００の腐蝕挙動のこの試験において使用した微生物は、腐蝕損害を有意に低減できていた。無菌媒体中で形成された腐蝕生成物の黒色膜は、使用細菌類の存在下においては観察されなかった。観察された腐蝕防護は、負方向へのE_{corr}シフトを発生させているので、黄銅表面での酸素濃度の有意の低下によるものではない。

【００１９】
実施例３
大腸菌ＭＶ１１８４、プラスミドｐＢＣ２９（リン酸塩基のＡＴＰからポリホスフェート鎖への可逆的転移を触媒する大腸菌のｐｐｋポリホスフェートキナーゼ遺伝子を含有する）およびプラスミドｐＥＰＯ２．２（リン酸塩特異性輸送系をコード化する大腸菌のｐｓｔオペロンを含有する）を、日本の広島大学Ｋａｔｏ教授から入手した（Ｋａｔｏら，Ａｐｐｌｉｅｄ ａｎｄ Ｅｎｖｉｒｏｎｍｅｎｔａｌ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌｏｇｙ ５９，１１：３７４４，１９９３年）。大腸菌ＭＶ１１８４（ｐＢＣ２９＋ｐＥＰＯ２．２）を、上記各プラスミドを大腸菌ＭＶ１１８４株中にエレクトロポーレイティングすることによって構築した。この組換え体は、ＩＰＴＧ（Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ社、ペンシルベニア州ピッツバーグ）の存在にポリホスフェートを分泌することができ、２５μｇ／ｍｌのクロランフェニコール（ｐＥＰＯ２．２プラスミド）および５０μｇ／ｍｌのアンピシリン（ｐＢＣ２９プラスミド）に耐性である。大腸菌ＭＶ１１８４は、１０μｇ／ｍｌのテトラサイクリンに耐性である。大腸菌ＭＶ１１８４と大腸菌ＭＶ１１８４（ｐＢＣ２９＋ｐＥＰＯ２．２）の双方を、－８０℃のグリセリンストックから、必要な抗生剤を補充した２５ｍＬのＬＢ媒体を含む２５０ｍＬのシェーカーフラスコ中に接種し、３７℃、２５０ｒｐｍで１夜増殖させた（シリーズ２５シェーカー；Ｎｅｗ Ｂｒｕｎｓｗｉｃｋ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ社、ニュージャージー州エジソン）（Ｍａｎｉａｔｉｓ，ら，”Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ ｍａｎｕａｌ” Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ，ＮＹ，１９８２年）。
【００２０】
実施例４
人口海水（即ち、バターネン９種塩溶液（ＶＮＳＳ））を使用して、軟鋼の腐蝕速度に対する１ｇ／Ｌの精製ポリホスフェート（Ｓｉｇｍａ Ｃｈｅｍｉｃａｌｓ社、ミズーリ州セントルイス）の効果を試験した。１０ｃｍ四方（１．２ｍｍ厚）の軟鋼１０１０（ＵＮＳ Ｇ１０１００）をシート材（Ｙａｒｄｅ Ｍｅｔａｌｓ社、コネチカット州ブリストル）から切取り、２４０グリット研磨紙（Ｂｕｅｈｌｅｒ社、イリノイ州レークブルッフ）で研磨した。金属表面を、連続試験終了時に、水道水流中に保持しゴムストッパーで激しくこすることによって清浄にした。
後期指数期培養物からの１％（容積／容積）接種物をすべての連続培養試験において使用した。連続反応器系は、流動系において電気インピーダンス分光測定によって腐蝕速度をモニターするように設計構築した。８基ほどの多くの反応器を同時にモニターし得る。上記金属サンプルが反応器の底部を形成し（金属サンプルの四隅は反応器の１部ではない）、ガラスシリンダー（５．５ｃｍまたは６．０ｃｍ直径）が反応器系の壁を形成し、１ｃｍ厚のテフロン（登録商標）プレート（１２．６ｃｍ×１２．６ｃｍ）が反応器頂部を形成するようにした。反応器の処理容積は、２００ｍＬ／ｍｉｎ（ＦＭ１０５０シリーズフローメーター；Ｍａｔｈｅｓｏｎ Ｇａｓ Ｃｏｍｐａｎｙ社、カリフォルニア州クカモンガ）の空気流による１００ｍＬまたは１５０ｍＬであった。増殖温度は、反応器の周りに巻いた加熱用テープによって３７℃に維持した。無菌媒体は、１０回転電位差計を有するＭａｓｔｅｒｆｌｅｘ精度標準ドライブ（Ｃｏｌｅ－Ｐａｒｍｅｒ社、イリノイ州ナイレス）を使用して、１２ｍＬ／ｈｒの速度で連続的にポンプ吸引した。各反応器（無菌および接種）は、必要な抗生剤によって操作し、無菌性または上記大腸菌の存在を確立させた。各バイオ膜をバッチ方式で１５～１８時間に亘って発生させ、その後、栄養素を連続添加し、バイオ膜発生を電気化学インピーダンス分光測定によってモニターした。サンプル試験片は、中心のチタン対向電極（３．８ｃｍ直径、金属プレートの上１．５ｃｍの位置）および周辺（金属プレートの上３．０ｃｍ）のオートクレーブ処理可能な参照電極（モデル１０５０５３３４ Ｉｎｇｏｌｄ Ｓｉｌｖｅｒ Ｓｃａｖｅｎｇｅｒ ＤＰＡＳ電極；Ｍｅｔｔｌｅｒ－Ｔｏｌｅｄｏ Ｐｒｏｃｅｓｓ

Ａｎａｌｙｔｉｃａｌ社、マサチューセッツ州ウィルミントン）を有する反応器の底部にあった。すべての試験を少なくとも重複して実施した。

【００２１】

分極抵抗（R_p）および開路電位データ（E_{corr}）は、ＴＨＡＬＥＳソフトウェアで操作するＧａｔｅｗａｙ　ＰＣコンピュータにインターフェイスさせたＢＡＳ－Ｚａｈｎｅｒ　ＩＭ６を使用するａｃインピーダンスデータから得た。測定は、２０　ｋＨｚ～１．３　ｍＨｚの周波数において行った。試験インピーダンススペクトルは、等価回路（ＢＣ）分析を使用して分析した。分極抵抗（R_p）は、腐蝕電流密度i_{coor}（即ち、腐蝕速度）に反比例する（Ｓｔｅｒｎら，Ｊｕｏｒｎａｌ　ｏｆ　Ｅｌｅｃｔｒｏｃｈｅｍｉｃａｌ　Ｓｏｃｉｅｔｙ，１０４：５６，１９５７年）。Ｓｔｅｒｎ－Ｇｅａｒｙ等式は、下記のとおりである：

$$i_{coor} = \beta_A \beta_C / 2.303 (R_p) (\beta_A \beta_C)$$

式中、β_aおよびβ_Cは、それぞれ、陽極性および陰極性のタッフェル（Ｔａｆｅｌ）傾斜である。インピーダンス分光測定法を使用する利点は、バイオ膜によって覆われた金属類の腐蝕速度を、バイオ膜を撹乱させることなく測定できることである。従って、金属腐蝕防止におけるバイオ膜類の絡割を性格に測定することができる。

精製ポリホスフェート（１　ｇ／Ｌ）をＶＮＳＳに添加したところ、無菌ＶＮＳＳに比較して、軟鋼の腐蝕速度（１／R_p）を、ｐｈ　７．５、３０℃で５倍近く低下させることが判明した。ポリホスフェート含有媒体は透明であり、この媒体中の金属も変色物を比較的含んでいなかった；対照的に、ポリホスフェートを含まない媒体は、濁っており（僅かに褐色）、金属は３日間のバッチ操作において錆付いていた。

【００２２】

その後、遺伝子操作細菌から産生させたポリホスフェート（その調製については、実施例３に記載している、大腸菌ＭＶ１１８４／ｐＢＣ２９＋ｐＥＰＯ２．２）の存在下における連続反応器内での軟鋼の腐蝕挙動を試験した。この株がポリホスフェートを産生し分泌するためには、リン酸塩と０．５　ｍＭ濃度のＩＰＴＧを栄養素媒体に添加しなければならない。その後、この細菌は、リン酸塩をポリホスフェートに転化してポリホスフェートを分泌する。従って、０．１～５．０　ｇ／ＬのK_2HPO_4を、１２　ｍＬ／ｈの流量で反応器に連続ポンプ吸引している上記ポリホスフェート産生株およびポリホスフェートを産生しない対照ＭＶ１１８４双方の媒体中に添加した。この方法において、腐蝕低減におけるポリホスフェート形成の利点が、リン酸塩単独の効果よりも高く評価された。

大腸菌ＭＶ１１８４（ｐＢＣ２９＋ｐＥＰＯ２．２）と大腸菌ＭＶ１１８４は共に良好に増殖していた。図１６は、腐蝕電位E_{corr}が、無菌対照に比較したとき、バイオ膜形成（Ｊａｙａｒａｍａｎら，Ａｐｐｌｉｄ　Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌｏｇｙ　ａｎｄ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，４８：１１－１７，１９９７年）の結果として３００～４００　ｍＶ上昇していたことを示す。より価値ある値へのこの有意の変位は、表面膜のより高度の保護挙動を示している。軟鋼のE_{corr}は、５日間の試験の間連続的に上昇していた。

大腸菌ＭＶ１１８４（ｐＢＣ２９＋ｐＥＰＯ２．２）を有する軟鋼において、０．１、１．０および５　ｇ／ＬのK_2HPO_4並びに０．５　ｍＭのＩＰＴＧをｐＨ　７．０および３７℃で含有するＬＢ媒体を連続反応器において使用し、ポリホスフェート産生が最大となるようにした。ポリホスフェートを分泌しない大腸菌ＭＶ１１８４を、バイオ膜形成対照として使用した。ＬＢ媒体中での種々のK_2HPO_4濃度における軟鋼の分極抵抗（R_p）を表２に示す。０．１～５．０　ｇ／ＬのK_2HPO_4を含有するＬＢ媒体中での軟鋼の分極抵抗を１時期一定モデル（ＯＴＣＭ）即ちウォーバーグ（Ｗａｒｂｕｒｇ）モデルによって測定した。５日間試験の最後の３～６日間の平均$R_p \times A$値を表２に示している。

【００２３】

Ａは、３～６日間において平均した金属片（４５．４　cm^2）の露出表面積（Ａ）を掛

けた分極抵抗を示す。R_pは、１時期一定モデルから得る。

表２

培養物	K_2HPO_4、g/l	R_p×A、オーム/cm^2
大腸菌MV1184	0.1	8126
大腸菌MV1184（pBC29 + pEPO2.2）	0.1	5334
大腸菌MV1184	1	18,000
大腸菌MV1184（pBC29 + pEPO2.2）	1	23925
大腸菌MV1184	1	15,200
大腸菌MV1184（pBC29 + pEPO2.2）	1	28,450
大腸菌MV1184	5	25,151
大腸菌MV1184（pBC29 + pEPO2.2）	5	24,879

【００２４】

１ｇ／ＬのK_2HPO_4を含有する大腸菌ＭＶ１１８４／ｐＢＣ２９ ＋ ｐＥＰＯ２．２（ポリホスフェートを産生する）は、軟鋼において、大腸菌ＭＶ１１８４に比較して腐蝕速度を２．３倍低下させているようである。しかしながら、０．１または５ ｇ／ＬのK_2HPO_4を含有するＬＢにおいては、ポリホスフェート産生の利益はなかった。図１７は、ＬＢ中の大腸菌培養物への５日間暴露中の軟鋼において得られた適合パラメーター１／R_p（相対的腐蝕速度）の時間依存性を示す。インピーダンス分析は、大腸菌ＭＶ１１８４（ｐＢＣ２９ ＋ ｐＥＰＯ２．２）および大腸菌ＭＶ１１８４の添加により、無菌ＬＢ媒体に比較して、軟鋼の腐蝕速度が３．８および１．６（５日間試験の最後の４日の平均）低下したことを示していた。従って、ポリホスフェートを産生する遺伝子操作大腸菌ＭＶ１１８４（ｐＢＣ２９ ＋ ｐＥＰＯ２．２）のバイオ膜は、大腸菌ＭＶ１１８４に比較して、軟鋼の腐蝕速度を２．３倍低下させて得ていた（モデル化した結果に基づく）。

ＬＢ中の大腸菌および無菌ＬＢに暴露させた後の軟鋼片の表面外観を検査した。目視検査において、軟鋼の表面は完全に黒色であった（無菌ＬＢ媒体）。しかしながら、バイオ膜が存在していた場合、軟鋼は全く影響を受けていなかった（すべて大腸菌培養物）；従って、金属表面上でのバイオ膜形成は、軟鋼の腐蝕低減をもたらしていた。

【００２５】

最後に、本発明の方法および装置を実施する別の方法も存在することに留意すべきである。例えば、種々の細菌類を使用してバイオ膜を形成させ得るし、これらの細菌類は種々の腐蝕防止性の化学組成物を分泌し得る。バイオ膜は種々の金属類上で増殖し得るし、種々のバイオ膜を人口海水と異なる環境内の金属類上で増殖させ得る。従って、上記の各実施態様は例示であり限定するものではないとみなすべきであり、本発明は、本明細書で開示した詳細に限定すべきではなく、特許請求する範囲およびその均等物内において修正可能である。

【図面の簡単な説明】

【図１】

保護バイオ膜で被覆されている外表面を有する腐蝕感受性基体を示す。

【図２】

ｐＨ　７．５のバターネン９種塩溶液に５．５日間暴露中の黄銅ＵＮＳ－Ｃ２６０００において得られたインピーダンススペクトルを示す。得られたスペクトルをボーデプロットにおいてプロットしている。

【図３】

バチルス　スブチリスＷＢ６００の存在するｐＨ　７．５のバターネン９種塩溶液に５．５日間暴露中の黄銅ＵＮＳ－Ｃ２６０００において得られたインピーダンススペクトルを示す。得られたスペクトルをボーデプロットにおいてプロットしている。

【図４】

ｐＨ　７．５のバターネン９種塩溶液に１０日間暴露中の黄銅ＵＮＳ－Ｃ２６０００において得られたインピーダンススペクトルを示す。得られたスペクトルをボーデプロットにおいてプロットしている。

【図５】

ポリアスパラギン酸塩を産生するバチルス　スブチリスＷＢ６００／ｐＢＥ９２－Ａｓｐの存在するｐＨ　７．５のバターネン９種塩溶液に１０日間暴露中の黄銅ＵＮＳ－Ｃ２６０００において得られたインピーダンススペクトルを示す。得られたスペクトルをボーデプロットにおいてプロットしている。

【図６】

γ－グルタミン酸塩を分泌するバチルス　リケニホルミスの存在するｐＨ　７．５のバターネン９種塩溶液に１０日間暴露中の黄銅ＵＮＳ－Ｃ２６０００において得られたインピーダンススペクトルを示す。得られたスペクトルをボーデプロットにおいてプロットしている。

【図７】

ｐＨ　７．５のバターネン９種塩溶液に多くの種々の条件下で暴露中の黄銅ＵＮＳ－Ｃ２６０００における相対腐蝕速度１／R_pの時間依存性を示す。

【図８】

ｐＨ　７．５のバターネン９種塩溶液に多くの種々の条件下で暴露中の黄銅ＵＮＳ－Ｃ２６０００におけるキャパシタンスＣの時間依存性を示す。

【図９】

ｐＨ　７．５のバターネン９種塩溶液に多くの種々の条件下で暴露中の黄銅ＵＮＳ－Ｃ２６０００におけるE_{corr}の時間依存性を示す。

【図１０】

ｐＨ　６．５のルリアーバータニ媒体に８日間暴露中の黄銅ＵＮＳ－Ｃ２６０００において得られたインピーダンススペクトルを示す。得られたスペクトルをボーデプロットにおいてプロットしている。

【図１１】

ｐＨ　６．５のルリアーバータニ媒体に８日間暴露中の黄銅ＵＮＳ－Ｃ２６０００において得られたインピーダンススペクトルを示す。得られたスペクトルをボーデプロットにおいてプロットしている。

【図１２】

ｐＨ　６．５のルリアーバータニ媒体に８日間暴露中の黄銅ＵＮＳ－Ｃ２６０００において得られたインピーダンススペクトルを示す。得られたスペクトルをボーデプロットにおいてプロットしている。

【図１３】

ｐＨ　６．５のルリアーバータニ媒体に多くの種々の条件下で暴露中の黄銅ＵＮＳ－Ｃ２６０００における相対腐蝕速度１／R_pの時間依存性を示す。

【図１４】

ｐＨ　６．５のルリアーバータニ媒体に多くの種々の条件下で暴露中の黄銅ＵＮＳ－Ｃ２６０００におけるキャパシタンスＣの時間依存性を示す。

【図１５】

ｐＨ　６．５のルリアーバータニ媒体に多くの種々の条件下で暴露中の黄銅ＵＮＳ－Ｃ２

６０００におけるE_{corr}の時間依存性を示す。
【図１６】
ｐＨ　６．５のルリアーバータニ媒体に多くの種々の条件下で暴露中の黄銅ＵＮＳ－Ｃ２６０００におけるE_{corr}の時間依存性を示す。
【図１７】
ｐＨ　６．５のルリアーバータニ媒体に多くの種々の条件下で暴露中の黄銅ＵＮＳ－Ｃ２６０００における相対腐蝕速度１／R_pの時間依存性を示す。

【図１】

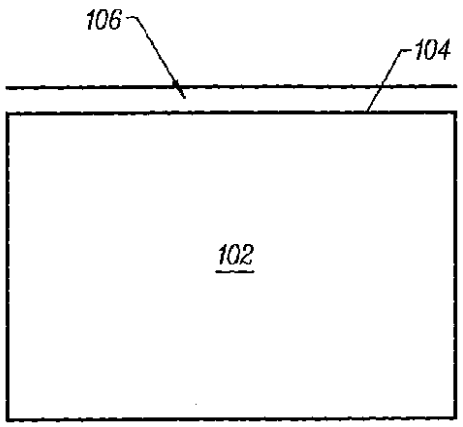
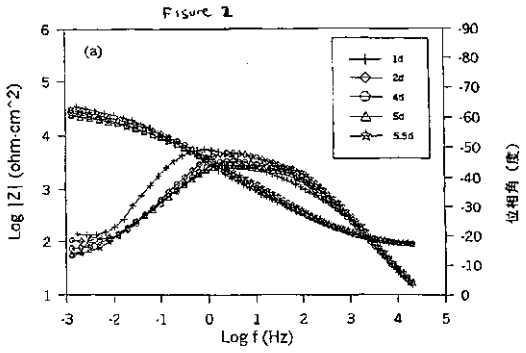
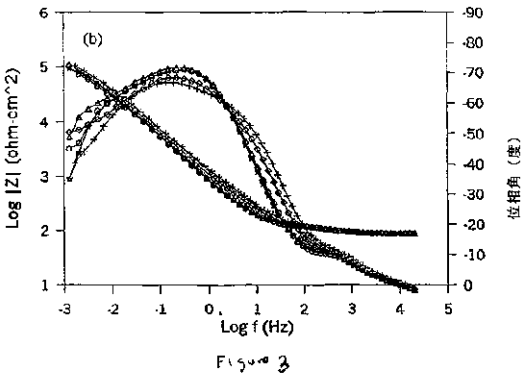


FIG. 1

【図２】



【図３】



【図４】

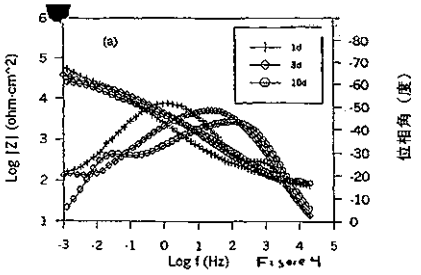


Figure 4

【図５】

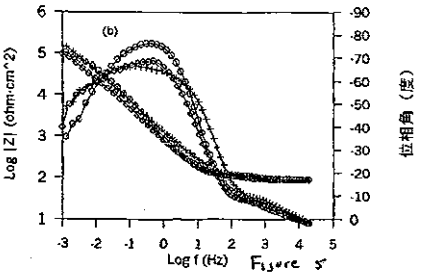


Figure 5

【図６】

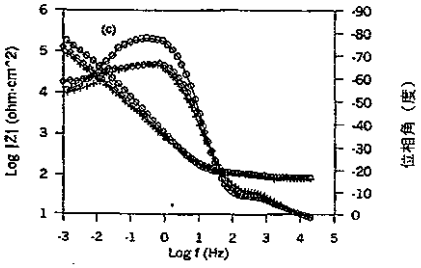


Figure 6

【図７】

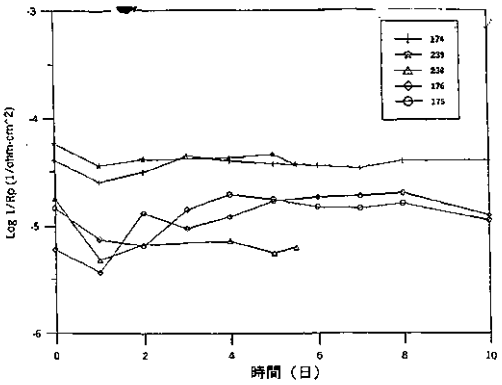


Figure 7

【図８】

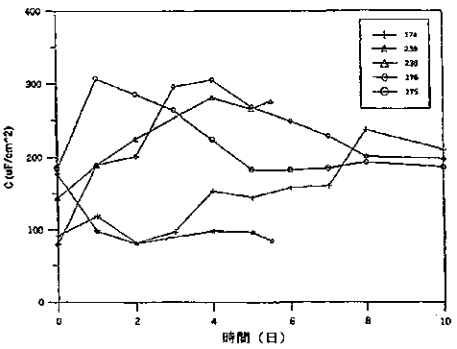


Figure 8

【図９】

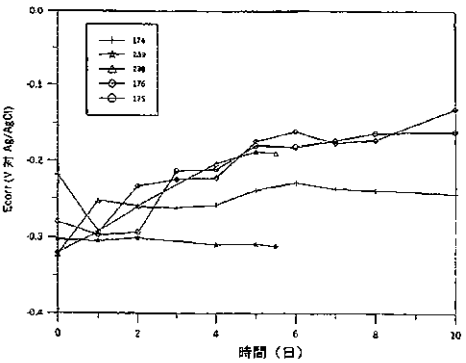


Figure 9

【図１０】

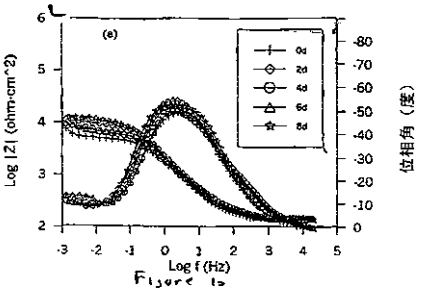


Figure 10

【図１１】

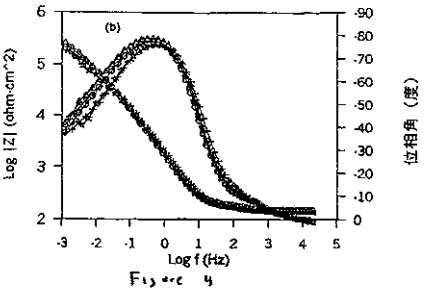


Figure 11

【図１２】

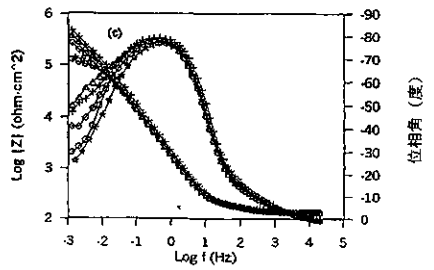


Figure 12

【図１３】

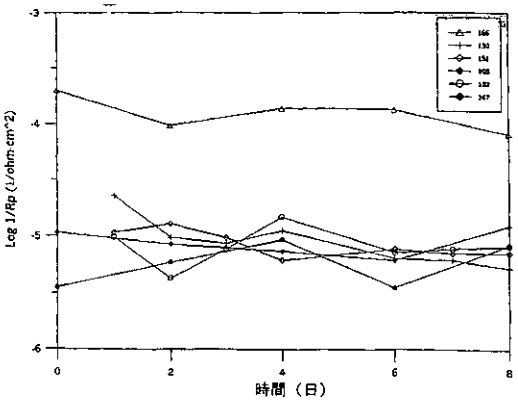


Figure 13

【図１４】

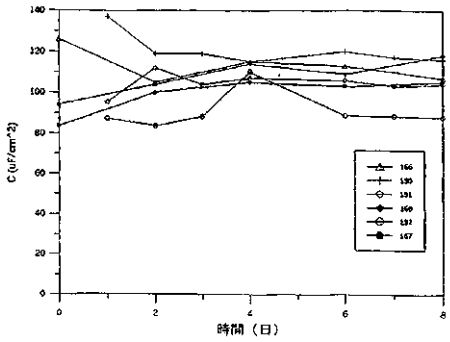


Figure 14

【図１５】

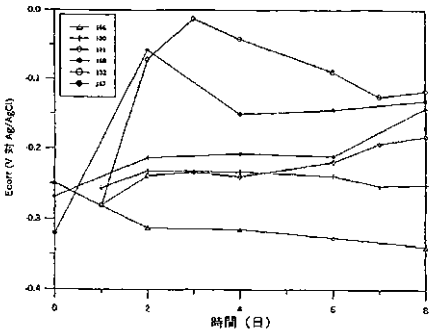


Figure 15

【図１６】

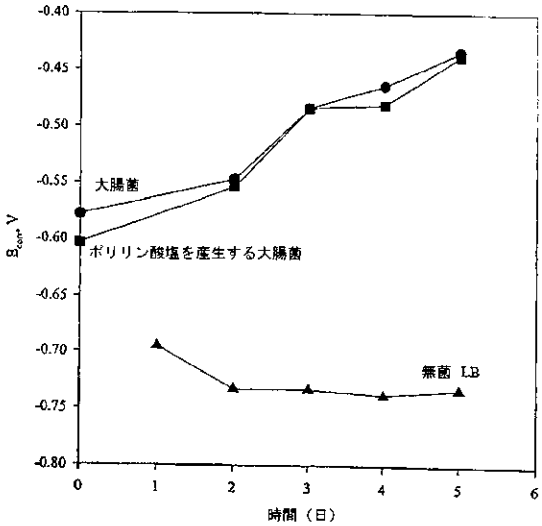


Figure 16

【図１７】

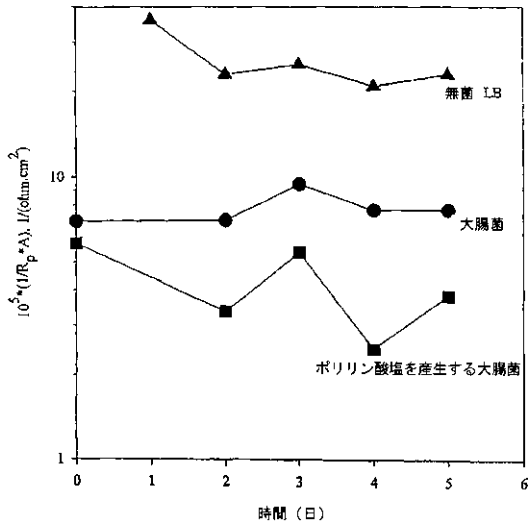


Figure 17

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US01/51103

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC(7) :A01N 63/00, 25/00; A61F 2/00; A61K 47/00
US CL :424/93.1, 93.4, 93.46, 93.462, 93.3, 405, 423, 126
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

U.S. : 424/93.1, 93.4, 93.46, 93.462, 93.3, 405, 423, 126

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

Please See Extra Sheet.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JAYARAMAN et al. Axenic aerobic biofilms inhibit corrosion of SAE 1018 steel through oxygen depletion. Applied Microbiology & Biotechnology, 1997, Vol. 48, pages 11-17, especially page 13.	1-34
Y	JAYARAMAN et al. Inhibiting sulfate-reducing bacteria in bioflilms on steel with antimicrobial peptides generated in situ. Applied Microbiology & Biotechnology, 1999, Vol. 52, pages 267-275, especially page 269.	1-34
Y	JAYARAMAN et al. Axenic aerobic biofilms inhibit corrosion of copper and aluminum. Applied Microbiology & Biotechnology, 1999, Vol. 52, pages 787-790, especially page 789.	1-34

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C. [ ] See patent family annex.

*	Special categories of cited documents:	"T"	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E"	earlier document published on or after the international filing date	"Y"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L"	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&"	document member of the same patent family
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		

Date of the actual completion of the international search 31 MAY 2002	Date of mailing of the international search report 03 JUN 2002
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703) 305-3230	Authorized officer Felicia D. Robata for IRENE MARX Telephone No. (703)-308-0196

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)★

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US01/51103

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JAYARAMAN et al. Corrosion inhibition by aerobic biofilms on SAE 1018 steel. Applied Microbiology & Biotechnology, 1997, Vol. 47, pages 62-68, especially page 64.	1-34
Y	JAYARAMAN et al. Inhibiting sulfate-reducing bacteria in biofilms by expressing the antimicrobial peptides indolicidin and bactenecin. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 1999, Vol. 22, pages 167-175, especially page 173.	1-34
Y	JAYARAMAN et al. Characterization of axenic Pseudomonas fragi and Escherichia coli biofilms that inhibit corrosion of SAE 1018 steel. Journal of Applied Microbiology, 1998, Vol. 84, pages 485-492, especially page 488.	1-34

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US01/51108

B. FIELDS SEARCHED
Electronic data bases consulted (Name of data base and where practicable terms used):

WEST, CAS ONLINE, BIOSIS, WPIDS
search terms:corrosion, biofilm?, protect?, control?, metal, brass, steel, alloy, copper, aluminium, al, cu, aerob?, polyanionic

フロントページの続き

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,PH,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,UZ,VN,YU,ZA,ZW

(74)代理人 100082005
弁理士 熊倉 禎男
(74)代理人 100065189
弁理士 宍戸 嘉一
(74)代理人 100074228
弁理士 今城 俊夫
(74)代理人 100084009
弁理士 小川 信夫
(74)代理人 100082821
弁理士 村社 厚夫
(74)代理人 100086771
弁理士 西島 孝喜
(74)代理人 100084663
弁理士 箱田 篤
(72)発明者 ウッド トーマス ケイ
アメリカ合衆国 コネチカット州 ０６０８４ トーランド ドー ラン １５
(72)発明者 オーネック ドーガン
アメリカ合衆国 コネチカット州 ０６２７８ アッシュフォード ペリー ヒル ロード ５２ ６－ジー
(72)発明者 マンスフェルド フローリアン ビー
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 ９０２９１ マリナ デル レイ ＃３１６ オールド ハーバー レーン １４０１３

Ｆターム(参考) 4B065 AA01X AA15X AA19X AA26X AB01 AC10 AC14 AC15 BA03 BB40 BC50 CA01 CA60
4K062 AA01 AA10 BC01 BC21 BC26 BC30 CA10 EA20 FA08 FA12 FA16 FA20 GA01 GA08 GA10