カソード電流に及ぼす海洋微生物とバイオフィルムの影響*

鷲頭直樹**, 篠原 正**, 元田 慎一***, 酒井潤一†

** 独立行政法人 物質・材料研究機構

*** 東京海洋大学 海洋工学部

† 早稲田大学 理工学術院

Effect of Marine Microorganisms and Biofilms on Cathodic Current*

Naoki Washizu**, Tadashi Shinohara**, Shin-ichi Motoda*** and Jun'ichi Sakai†

** National Institute for Materials Science

*** Faculty of Marine Technology, Tokyo University of Marine Science and Technology

† Faculty of Science and Engineering, Waseda University

In order to explain the mechanism that works in microbiologically influenced enhancement of corrosion rates, cathodic currents were measured on type 329J4L stainless steel exposed to seawater, and a biological analysis on biofilms was conducted. The cathodic current densities measured at 0.1 V vs. SHE were ranging from 0.3 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ to 3 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$, after the specimen had been held at 0.1 V vs. SHE in natural seawater. On the other hand, the cathodic current densities at 0.1 V vs. SHE after the exposure to natural seawater under an open circuit condition, were higher than 1 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ in the early stage of the measurement. However, they fell to values lower than 0.1 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ in 12 h. The current densities measured at 0.2 V vs. SHE were approximately 2 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ in the initial stages and the final stages of the measurement, after the beforehand exposure to natural seawater at 0.2 V vs. SHE. The current densities measured at 0.2 V vs. SHE after the beforehand exposure to natural seawater under an open circuit condition, were higher than 1 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ in the initial stages of the measurement and lower than 0.1 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ in the final stages. In the case of measurements at 0.3 V vs. SHE, the average values of cathodic current densities were approximately 0.2 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ after the beforehand exposure to natural seawater at 0.3 V vs. SHE, and lower than 0.01 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ after the beforehand exposure to natural seawater in an open circuit state. The cathodic current densities after the exposure to synthetic seawater, were lower than 0.01 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ in the cases of measurement at 0.1 V vs. SHE, 0.2 V vs. SHE and 0.3 V vs. SHE. The data on DNA base arrangement detected by the denaturing gradient gel electrophoresis test in a biofilm formed at 0.2 V vs. SHE in natural seawater, was different from the data detected in a biofilm formed under an open circuit condition. It is, therefore, concluded that some specific types of microorganisms selectively attach to steel surfaces under cathodic conditions, and that such microorganisms are the cause of large cathodic currents resulting in high corrosion rates.

Key words : corrosion rate, type 329J4L, natural seawater, cathodic condition, open circuit condition, DNA base arrangement

1. 緒 言

自然環境中に存在する微生物の活動は、周囲の環境に影響を及ぼすことを通じて、環境中におかれた材料の劣化原因となり得る。微生物が関与するこのような材料劣化は、金属材料の場合を中心に微生物腐食と呼ばれている¹⁾。微生物腐食は土壌中、淡水中、海水中、下水中さらには油井においても発生することが知られている²⁾。これらの環境のうち海水は比較的高濃度の塩化物イオンを含んでいるため、ステンレス鋼に代表される不動態皮膜によって耐食性を発現する金属材料に局部腐食を発生させる要因を持つ。また、人工海水中においては健全性が保たれる耐海水性ステンレス鋼であっても自然海水中では耐食性が必ずしも十分でない場合があり、その原因は自然海水中に生息する微生物にあると考えられてい

る³⁾⁻⁵⁾。

自然海水中におけるステンレス鋼の微生物腐食発生機構に関しては、海洋微生物が鋼表面にバイオフィルムを形成することによって自然浸漬電位が貴化し、その値が局部腐食臨界電位を超えることで局部腐食が誘起されると考えられている⁶⁾⁻¹⁰⁾。実用の場においては構造上の理由および自然海域からの貝類付着により自由表面が維持されることは稀であるため、通常はすきま腐食が問題となる。また、自然浸漬電位が貴化する機構に関する検討も行われてきており、カソード反応が促進されることが電位貴化の要因になると考えられている¹¹⁾。さらに、カソード反応を促進する化学種を特定する研究もなされている。例としては、Mnを含む化学種によるとする報告¹²⁾⁻¹⁴⁾、 H_2O_2 の関与を提唱するもの^{15), 16)}などがあげられる。以上のように、自然浸漬電位の貴化を経て微生物腐食が発生する過程については、不明な点も残されているものの、かなりの部分が明らかとなったといえる。

微生物は腐食誘起に作用するのみならず、ひとたび発生した腐食を高い速度で進行させる場合がある^{17), 18)}。通常、ステンレス鋼を実用に供する場合は腐食が発生しないことを前提とするが、仮に局部腐食が発生した場合に備えて腐食速度を予測することは工学的に有用である。微生物による腐食の加速機構を解明することは腐食速度

* 第52回材料と環境討論会（札幌，2005年）で発表

** 〒305-0047 つくば市千現 1-2-1 (1-2-1, Sengen, Tsukuba, 305-0047 Japan)

*** 〒135-8533 東京都江東区越中島 2-1-6 (2-1-6, Etchujima, Koto-ku, Tokyo, 135-8533 Japan)

† 〒169-8555 東京都新宿区大久保 3-4-1 (3-4-1, Okubo, Shinjuku-ku, Tokyo, 169-8555 Japan)

を予測するうえで必要であるが、これに関する研究報告は微生物腐食の発生機構を検討した報告例に比較すると多いとはいえない。その一方で Akashi¹¹⁾ や Mollica ら¹⁹⁾ は、自然海水中に暴露することによってステンレス鋼表面で発生するカソード電流が増大すると報告しており、この点から腐食速度の上昇機構を整理できる可能性がある。すなわち、カソード反応が律速となるような電位域においてもカソード電流密度が高く保たれることが判明すれば、カソード電流の増大が腐食速度の上昇に寄与するといえる。そこで本報では、好气的条件下の海水中におかれたステンレス鋼の場合を例にとり、鋼表面に付着した海洋微生物とバイオフィームが及ぼすカソード電流への影響に関して詳細に検討する。また、局部腐食が発生すると鋼表面の大部分がカソード部となり腐食発生前に比較して環境条件が変化するので、この相違が微生物に対して影響を与えることもあり得る。とくにこの可能性を考慮し、自然浸漬電位よりも卑な電位に保持した鋼表面に微生物が付着した場合、微生物およびカソード電流に現れる自然浸漬の場合との間の差異に着眼点をおく。

2. 実験方法

2.1 試験片

耐海水ステンレス鋼として広く使用されている鋼種としては Type316L 鋼があげられるが、同鋼種を自然海水に暴露した場合、鋼表面における海水由来の付着物下ですきま腐食が発生する場合があった。腐食が発生すると以下の電気化学試験に支障をきたすので、これを避ける目的から試験片材料はより耐食性の高い Type329J4L 鋼とした。その化学成分を Table 1 に示す。これを 100 mm×70 mm×4 mm の板状に切り出し、表面を #600 まで湿式研磨したものを試験片とした。

2.2 前処理としての海水暴露

前節の試験片を Fig. 1 に示すように、大気開放した水槽内の自然海水あるいは人工海水に一定時間暴露した。自然海水への暴露は、東京海洋大学清水臨海実験実習所（静岡県静岡市）において、駿河湾内に位置する折戸湾内の海岸近くより採取した自然海水を使用して行った。その概要を Fig. 2 に示す。常に海面からの深さが一定となるよう設置したポンプによって自然海水を取水し上水槽に汲み上げ、その一部を屋内に設置した Fig. 1(a) に概要を示す試験片暴露用の水槽に導入した。このようにして常に新鮮な導入水と入れ替わる水槽内の海水に試験片を暴露し、試験片表面にバイオフィームを形成させた。また、連続的に海水を導入したときと、一時的に導入を停止して水槽内の海水を静置した場合との間で、試験片の自然浸漬電位および定電位保持時の電流に差異がないことを確認した。

Table 1 Chemical composition of type 329J4L stainless steel used for tests (mass%).

C	Si	Mn	P	S	Ni	Cr	Mo	N
0.025	0.39	0.81	0.023	0.001	7.16	25.16	3.11	0.15

Fig. 1 Schematic diagram of exposure test before current measurement in natural seawater (a), and synthetic seawater (b).

Fig. 2 Schematic diagram of water flow system introducing natural seawater into experimental vessel.

一方、試験片表面にバイオフィームが形成されない条件との比較を行うために、一部の試験片は自然海水には暴露せず人工海水のみに暴露した。Fig. 1(b) に概要を示したように、静置した市販の人工海水（八洲薬品、金属腐食試験用アクアマリン、pH8.2 に調整）に試験片を浸漬した。

暴露中における試験片の電気化学的条件は、開回路条件に相当する自然浸漬と特定の電位に保持しての浸漬とした。電位の制御および次節のカソード電流測定には、市販のポテンショスタット、参照極として飽和カロメル電極、対極として白金電極をそれぞれ用いた。暴露条件の詳細を Table 2 にまとめて示す。また、標準水素電極基準の電位値と飽和カロメル電極基準の電位値との換算は、文献²⁰⁾ に従って行った。

2.3 カソード電流の測定

前項に示した方法で海水に暴露した試験片を定電位に 48 h 保持し、その間の海水側から試験片へ

Table 2 Experimental conditions of exposure to seawater and current measurements.

Condition symbol	Exposure conditions before current measurement			Current measurement conditions	
	Potential	Duration	Seawater	Seawater	Potential
01A	0.1 V vs. SHE	Aug. 2005 - 9days	Natural	Natural	0.1 V vs. SHE
01B	Open circuit	Aug. 2005 - 11days		Synthetic	
01C	0.1 V vs. SHE				
01D	Open circuit	Sep. 2006 - 11days	Synthetic		
02A	0.2 V vs. SHE	Nov. 2006 - 22days	Natural	Natural	0.2 V vs. SHE
02B	Open circuit	Nov. 2006 - 24days		Synthetic	
02D			(Biological tests only)		
02E			Natural		
03A	0.3 V vs. SHE	Sep. 2006 - 34days	Natural	Natural	0.3 V vs. SHE
03B	Open circuit	Sep. 2006 - 36days		Synthetic	
03C	0.3 V vs. SHE				
03D	Open circuit				

流入するカソード電流の値を測定した。電流測定の条件を前処理暴露の条件とあわせて Table 2 に示した。条件 01C は条件 01A での暴露および電流測定終了後に試験片を人工海水中に移し、等しい電位で引き続き電流を測定したものである。同様に条件 03C は条件 03A で暴露および測定の終了後に、試験片を人工海水中に移して再度の測定を行ったときの条件である。ただし、条件 02A については電流測定後に次節で述べる微生物解析のために表面に付着したバイオフィームを採取したため、人工海水中に移しての電流測定は行わなかった。また、測定時における海水の温度ならびに海水中的溶存酸素濃度を溶存酸素計 (METTLER TOLEDO 社, MO128) を用いて測定した。

2.4 付着微生物の解析

条件 02A における電流測定後の試験片は、22 日間の測定前暴露と 48 h の測定中暴露のあわせて 24 日間にわたって 0.2 V vs. SHE の電位に保持されて自然海水と接していた。これと同期間、同じ水槽内において試験片を自然浸漬した場合を、Table 2 に示したように条件 02E とした。これら両条件下で暴露した試験片について、表面に付着していたバイオフィームを採取し、付着微生物に対して解析を行った。条件 02E の試験片に対しては自然浸漬電位の測定以外の電気化学的操作を行わず、全暴露期間にわたって自然浸漬とした。この理由は、たとえ短時間であってもカソード条件下あるいはアノード条件下におかれることが、バイオフィームおよびその内部の微生物に影響を及ぼす恐れがあったためである。したがって、条件 02E に関しては電流測定を行っていない。

2.4.1 細菌の計数

試験片表面に付着していたバイオフィームをすべて採取し、滅菌済み人工海水 50 cm³ に懸濁させた (以下バイオフィーム溶液と呼ぶ)。このうちの一定量を孔径 0.2 μm のフィルターでろ過し、フィルター上に存在した細菌を、計数用マイクロメーターを装着した蛍光顕微鏡を用いて計数した。このとき、代謝活性のある細胞を選択的に染色する性質を持つ 6-carboxyfluorescein diacetate で染

色された細菌の数を生細菌数、細胞中の核酸に結合する 4', 6-diamidino-2-phenylindole で染色された細菌の数を全細菌数とした²¹⁾。

2.4.2 微生物相の遺伝子解析

自然環境中にしばしば存在する、培養不可能な微生物の検出にも対応できる遺伝子解析法によって、バイオフィーム内の微生物を分析した。とくに 16S rRNA 遺伝子の V3 領域は生物種間で配列が大きく異なるため、遺伝子解析の主要な対象とされている。そこで本実験でもこれを対象とした 16S rRNA 系統解析法を採用した。バイオフィーム溶液から抽出した DNA に含まれる 16S rRNA 遺伝子の V3 領域をポリメラーゼ連鎖反応 (polymerase chain reaction) によって増幅し、変性密度勾配ゲル電気泳動法 (denaturing gradient gel electrophoresis, 以下では DGGE と呼ぶ) を用いて微生物群集の遺伝子情報を分析した²²⁾。電気泳動像に現れた DNA バンドの数および位置から、微生物相を構成する種に相違があるか否かを判定した。

3. 結果および考察

3.1 自然浸漬電位

Table 3 に自然浸漬条件下で前処理暴露を行った場合の、前処理暴露終了時の自然浸漬電位を示す。自然海水

Table 3 Open circuit potentials after exposure tests.

Sample name	Exposure conditions		Potential (V vs. SHE)
	Seawater	Duration	
01B	Natural	11days	0.56
01D	Synthetic	11days	0.23
02B	Natural	24days	0.61
02D	Synthetic	24days	0.23
02E	Natural	24days	0.64
03B	Natural	36days	0.62
03D	Synthetic	36days	0.24

中で暴露したときの電位は 0.6 V vs. SHE 前後の値をとり、人工海水中で暴露した場合に比較していずれも 0.3 V を超える幅で貴化が認められた。この結果は、本試験環境下では自然海水由来の微生物による腐食誘起作用が十分に働いたことを示しており、現実には微生物腐食が起こり得る条件に至っていたといえる。また、自然海水に暴露したときの自然浸漬電位は、次節以下で設定電位として扱う 0.1, 0.2 および 0.3 V vs. SHE のいずれよりも貴であった。したがって、自然海水中で前処理暴露を行った試験片をこれらの電位に設定した場合、いずれもカソード条件となることが示唆される。

また、暴露後の試験片に腐食は一切認められなかった。

3.2 0.1 V vs. SHE におけるカソード電流

条件 01A, すなわち電位を 0.1 V vs. SHE に設定した状態で 9 日間自然海水に暴露した試験片を、同じ水槽内において引き続き 0.1 V vs. SHE の電位に保持したときのカソード電流密度を Fig. 3 に示す。ここには条件 01B, すなわち条件 01A と同じ水槽内で同時に自然浸漬を開始し、11 日間にわたって暴露した試験片を、0.1 V vs. SHE の電位に設定したときのカソード電流密度もあわせて示す。測定の初期段階においては条件 01B のカソード電流密度が条件 01A のそれに比較して高い値をとった。しかしながら、時間の経過とともに条件 01B の電流密度は急激に低下し、約 20 h 後に初期の値より 1 桁以上低い値でほぼ安定した。一方、条件 01A の電流密度は緩やかな上昇傾向を続け、測定開始から約 2 h 後に条件 01B の値と高低関係が逆転した。

Fig. 4 に条件 01C, すなわち前記の条件 01A の電流測定後に試験片を人工海水中に移して同じく 0.1 V vs. SHE でカソード電流を測定した結果を示す。ここには条件 01D, すなわち前処理暴露の段階から人工海水中で自然浸漬した試験片に対して測定されたカソード電流密度もあわせて示す。まず条件 01C のカソード電流密度であるが、測定開始直後は条件 01A における測定終了時の値よりも低い値であったが、測定中にその値は上昇し最終的には条件 01A における到達値を超えるに至った。この結

果は、一旦バイオフィームが形成されると人工海水中すなわち無生物環境へと条件が転換しても、バイオフィーム内の微生物は生息を続け腐食を促進し得ることを示唆している。終始人工海水に暴露した条件 01D の試験片に対して測定されたカソード電流密度は、測定初期に低下傾向をとったがその後はほぼ安定した。以上の 01A, 01B, 01C および 01D のすべての条件においてカソード方向に電流が流れたので、0.1 V vs. SHE の電位で試験片はカソード条件下にあったといえる。

腐食による材料劣化は多くの場合に数ヵ月から数年の期間にわたる問題である。したがって、腐食速度を扱う場合においても長時間の平均的な速度が重要な意味を持ち、たとえ腐食速度が一時的に上昇したとしてもそれが短時間で低下するならば深刻な問題とはなりにくい。同様に腐食の加速要因としてカソード反応の促進を検討する場合、長時間にわたる平均的なカソード電流を対象とする必要がある。とくに条件 01B の場合に電流測定開始から 10 h 以内で大幅な電流値の変動が観測された結果を考慮して、48 h 定電位保持後の値を安定したカソード電流値として扱い以下で考察する。

条件 01A, 01B, 01C および 01D における測定終了時のカソード電流密度の比は、約 520 : 18 : 840 : 1 であった。ここで、条件 01B, 01C および 01D の測定値は測定終了時において安定していたので、これらは長時間の測定を行ったと仮定した場合の平均値に近いと考えられる。ただし条件 01A については測定終了時においても上昇傾向にあったので長時間の平均値はさらに高い値を示すと予想されるが、以下では便宜的に測定終了時の値で統一して扱う。条件 01D すなわち人工海水にのみ暴露し生物が関与しない条件下におけるカソード電流密度を基準とした場合の、条件 01B の測定終了時におけるカソード電流密度は約 18 倍であった。この事実はバイオフィームがカソード電流を増大させることを意味するが、腐食を著しく加速するに十分な増大幅であるとするには疑問が残る。これに対し、あらかじめ 0.1 V vs. SHE の電位に保持した状態でバイオフィームが形成された条件 01A でのカソード電流密度は、条件 01D における値の約 520 倍、条件 01B の値に比較しても約 29 倍と大幅に高い値にまで

Fig. 3 Variation in cathodic current density measured at 0.1 V vs. SHE in natural seawater after 9 days' exposure to natural seawater at 0.1 V vs. SHE (01A), and after 11 days' exposure to natural seawater in open circuit state (01B).

Fig. 4 Variation in cathodic current density measured at 0.1 V vs. SHE in synthetic seawater after 11 days' exposure to natural seawater at 0.1 V vs. SHE (01C), and after 11 days' exposure to synthetic seawater in open circuit state (01D).

達した。これらの結果は、微生物が形成したバイオフィームは総じてカソード電流を増大させる作用を持つが、カソード条件下でバイオフィームが成長した場合に電流の増大が顕著になることを示唆している。

以上より、好氣的条件下の自然海水中においてステンレス鋼に発生する局部腐食の微生物による誘起および加速は、次のような段階を経て生ずると推測できる。まず自然海水に接することによって鋼表面にバイオフィームが微生物によって形成され、微生物の代謝によってバイオフィーム内に蓄積された H_2O_2 などの酸化性化学種の作用で電位が貴化する¹⁶⁾。電位が局部腐食臨界電位の値以上に貴な値に達した結果局部腐食が発生し、それにもなうアノード反応の進行によって腐食電位は急激に卑化する⁴⁾。この段階で鋼表面は局部アノードと、それ以外の広いカソード部に分離する。このようにして出現したカソード部でバイオフィームが成長することによって、前述の結果と同様にカソード電流が著しく増大するものと仮定できる。ただし、通常は自然海水に接したと同時に接水面全体にバイオフィームが形成され始めるので、局部腐食発生時にはすでにバイオフィームが全面に存在していると考えられる。したがって、現実には腐食発生前から存在したバイオフィームが、局部腐食発生によってその大部分がカソード条件下におかれることで、電気化学的性質に変化を生じたと考えるのが妥当である。ここで条件 01B の実験結果として前述したように、自然浸漬でバイオフィームを形成させ、その後に電位 0.1 V vs. SHE のカソード条件とした状態で測定したカソード電流は、少なくとも 48 h は上昇傾向に転じなかった。すなわち、局部腐食発生にともなうバイオフィームの電気化学的な性質変化およびカソード電流の増大が起こるには、48 h を超える時間を要するといえる。どの程度の日数でバイオフィームの電気化学的性質が変化し、その結果カソード電流が増大へ転ずるのかに関しては、条件 01B と同条件でかつ測定時間を延長した試験を行うことによって今後検討する。

3.3 0.2 および 0.3 V vs. SHE でのカソード電流

自然浸漬電位よりも卑な電位、すなわちカソード条件下におかれることによって付着微生物およびバイオフィームの電気化学的な性質が変化し、これがカソード電流の著しい増大をもたらすことを前節において述べた。一方、アノード反応は一般に電位が貴なほど速度が高く、実際の腐食はアノード電流とカソード電流の絶対値が等しくなる電位で進行する。また、自然海水中における Type316L 鋼の事例では、すきま腐食進行時の電位が 0.2 ~ 0.3 V vs. SHE で推移したことが報告されている⁴⁾。これらの点を考慮して本節では保持電位を 0.2 あるいは 0.3 V vs. SHE としたときの試験結果について述べる。

Fig. 5 に 0.2 V vs. SHE の電位に保持して自然海水に 22 日間暴露した試験片 (条件 02A)、および自然浸漬で自然海水に 24 日間暴露した試験片 (条件 02B) を、自然海水中で 0.2 V vs. SHE に電位設定したときのカソード電流密度を示す。条件 02A の電流密度は測定中に大きな変動が見られたが、測定の開始時と終了時における値はほぼ等しかった。荒天が原因で取水を行う海域が荒れた場合に、一時的なカソード電流の減小が、本測定以外でもしばし

Fig. 5 Variation in cathodic current density measured at 0.2 V vs. SHE in natural seawater after 22 days' exposure to natural seawater at 0.2 V vs. SHE (02A), and after 24 days' exposure to natural seawater in open circuit state (02B).

ば認められた。天候の回復によって電流値は常に荒天前の値にまで増大したので、試験片表面のバイオフィームおよび微生物の状態に変化が生じたものではないと推測される。本測定においては開始時および終了時は好天、測定中はときおり荒天であったため、電流密度の変動は一時的な水質変化などの外的要因によるものであったと考えられる。よって本測定結果を採用しても問題はないと判断した。一方、条件 02B のカソード電流密度は初期においては条件 02A の値よりも高いが、急速に減衰し条件 02A の測定値を下回るに至る。この傾向は、前節 Fig. 3 に示した条件 01A と 01B におけるカソード電流密度の経時変化の傾向と一致する。測定終了時における条件 02A と 02B のカソード電流密度の比は約 77 : 1 であり、条件 01A と 01B における比である約 29 : 1 と同様に大きなものとなった。

Fig. 6 に自然浸漬条件下で人工海水に 24 日間暴露した試験片を、同じ人工海水中で 0.2 V vs. SHE の電位に保持したときの電流密度を示す (条件 02D)。本条件では測定中にカソード方向からアノード方向へと電流の符号が逆転したため、図中の縦軸を対数表示ではなく線形表示とした。以上より、0.2 V vs. SHE の電位においても微生物

Fig. 6 Variation in cathodic current density measured at 0.2 V vs. SHE in synthetic seawater after 24 days' exposure to synthetic seawater in open circuit state (02D).

Fig. 7 Variation in cathodic current density measured at 0.3 V vs. SHE in natural seawater after 34 days' exposure to natural seawater at 0.3 V vs. SHE (03A), and after 36 days' exposure to natural seawater in open circuit state (03B).

Fig. 8 Variation in cathodic current density measured at 0.3 V vs. SHE in synthetic seawater after 36 days' exposure to natural seawater at 0.3 V vs. SHE (03C).

およびバイオフィームによってカソード電流は増大し、その増大率は自然浸漬電位よりも卑な電位条件下でバイオフィームが成長した場合に顕著となることがわかった。

同様の操作を 0.3 V vs. SHE の電位で行った結果を Fig. 7 に示す。カソード電流密度の経時変化は、前述した 0.1 および 0.2 V vs. SHE に測定電位を設定した場合と等しい傾向を示した。ただし、値は電位 0.1 および 0.2 V vs. SHE のときに比較するとほぼ 1 桁低い値であった。Fig. 8 に条件 03C すなわち条件 03A の測定終了後に試験片を人工海水中に移して、引き続き電位を 0.3 V vs. SHE に設定したときのカソード電流密度を示す。条件 03A の測定終了時における電流密度よりも高い値で安定しており、前述の条件 01C の場合と同様の傾向を示した。この結果は、設定電位が 0.3 V vs. SHE の場合にも、バイオフィーム内に存在する微生物は人工海水中で生息を続けることを示唆している。なお、人工海水のみに暴露した条件 03D では、測定された電流が終始アノード方向であったため結果の表示を省略した。

以上、0.1, 0.2 および 0.3 V vs. SHE の各設定電位における測定終了時のカソード電流密度と電位との関係を

Fig. 9 Relationship between potential and final value of cathodic current density after exposure to natural seawater under cathodic conditions (■, □), natural seawater under open circuit conditions (●), and synthetic seawater (△).

Table 4 Average numbers of bacteria in biofilms on 1 cm^2 surface of specimens.

Sample	Total bacteria	Viable bacteria
02A	3.2×10^7	1.5×10^6
02E	4.3×10^7	9.7×10^6

Fig. 9 にまとめて示す。あらかじめ電流測定時の電位に保持して前処理暴露を行った場合 (条件 01A, 02A および 03A)、自然浸漬で前処理暴露を行った場合 (条件 01B, 02B および 03B) および条件 01A ならびに 03A の測定後に人工海水中に移した場合 (条件 01C ならびに 03C) のいずれも右下がりの曲線を描いた。また、カソード条件下でバイオフィームが形成されることによって、測定終了時のカソード電流はいずれの電位においても増大する傾向が明瞭に表れている。現状では測定点数は少ないが、今後同様の試験を種々の電位に設定して数多く行うことによって、電位とバイオフィーム下でのカソード電流密度との関係を決定できると考えられる。これが可能となれば、局部腐食が発生した場合の速度予測に利用できると思われる。

3.4 付着微生物の解析結果

Table 4 に条件 02A で電流測定後の試験片ならびに条件 02E 試験片それぞれに付着していた全細菌数と生細菌数を、試験片表面 1 cm^2 当たりの付着数で示す。条件 02A 試験片は 0.2 V vs. SHE の電位に保持して自然海水中に 24 日間暴露されており、条件 02E 試験片は自然浸漬で同じく 24 日間にわたって自然海水に暴露されたものである。したがって、Table 2 にも示したように条件 02E は条件 02B における電流測定直前の状態と、暴露の時期、時間および条件が全く同一であった。また Table 3 で示したとおり、自然浸漬電位の値も条件 02B が 0.61 V vs. SHE で条件 02E が 0.64 V vs. SHE と若干条件 02E における値がより貴ではあるが、いずれもバイオフィームによる電位貴化作用が明確に現れていた。よって、条件 02E は 02B の電流測定直前の状態とほぼ等しかったと考えら

Fig. 10 DGGE electrophoretic patterns of DNA extracted from biofilm formed at 0.2 V vs. SHE (02A), and biofilm formed in open circuit state (02E). Concentration of denaturing agent (C_{DA}) was ranging from 30% to 60%.

れ、仮に条件 02E に対して電流測定試験を行えば条件 02B の場合と同様の結果が得られたと予想される。Table 4 で示したように全細菌数に関しては、有意な差とはいえないが条件 02A が 02E よりも少なかった。一方、生細菌数に関しては条件 02E が 02A の 6 倍以上と明確な差が現れた。この結果は、電流測定試験において条件 02A が高いカソード電流密度を維持した原因を、表面に付着および生息していた微生物の多さに求めることができないことを意味する。これよりカソード電流の増大は微生物の総数が増すことによって生じたのではなく、カソード反応に寄与する特定の微生物が条件 02A の場合にのみ試験片表面に存在した、もしくは著しく多かったものと推測される。これを確認する目的で行った遺伝子解析の結果を以下で述べる。

Fig. 10 に DGGE によって得られた電気泳動像を示す。像に現れたパターンは、条件 02A と 02E との間で明らかに異なった。明瞭に現れた DNA バンドに記号を付したが、各バンドは特定の塩基配列をもつ DNA 断片の存在を表している。条件 02A には a~g までの 7 バンドが、条件 02E には 1~6 の 6 バンドがそれぞれ検出された。また、条件 02A の a, b および c の各バンドが現れた領域では条件 02E に明確なバンドは認められなかった。同様に条件 02E のバンド 6 が確認された領域には条件 02A のバンドは見られなかった。これらの結果は、各条件に限定される遺伝子情報が存在したことを示しており、遺伝子レベルで付着微生物群の構成に相違が現れたことを示唆している。以上より、カソード条件下で微生物の付着およびバイオフィームの形成がなされた場合、自然浸漬の場合には存在しない微生物が鋼表面に付着すると考えられる。また、前節までに述べたカソード電流の測定結果を合わせて考慮すると、このようなカソード条件下特有の付着微生物はカソード電流を増大させる作用を持つものであると結論づけられる。すなわち、カソード反応が進行している場では、カソード反応を促進する微生物が優先種の一部もしくは全部を占めるといえる。

4. 結 論

微生物による腐食速度の上昇機構を解明する目的で、好気的条件下の海水に接した Type 329J4L 鋼を例にとって、カソード電流の挙動ならびに付着微生物の状態を調べた。その結果、海洋微生物が鋼表面に形成したバイオフィーム下でのカソード電流に関して以下の知見を得た。

(1) 0.1, 0.2 および 0.3 V vs. SHE の各電位に保持した状態で自然海水に暴露後、保持電位に等しい電位で測定されるカソード電流密度は、それぞれ約 3, 2 および 0.2 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ である。これらは人工海水に暴露したときのカソード電流密度の 500 倍以上の値である。

(2) 自然浸漬状態で自然海水に暴露後、0.1, 0.2 および 0.3 V vs. SHE の各電位で測定されるカソード電流密度は、いずれも時間経過にともない下降傾向を示す。その結果、48 h 後にはあらかじめ測定電位に保持して暴露を行った場合における値の 1/20 以下にまで低下する。

(3) 自然浸漬条件下とカソード条件下とでは、バイオフィームを形成する微生物群の構成が遺伝子学的に異なる。

参 考 文 献

- 1) H. Sasaki, *Zairyo-to-Kankyo*, **46**, 475 (1997).
- 2) JSCE, "Introduction to Microbiologically Influenced Corrosion (Jpn.)", Maruzen, p.15 (2004).
- 3) T. Ujio, *Zairyo-to-Kankyo*, **41**, 329 (1992).
- 4) H. Amaya and H. Miyuki, *Zairyo-to-Kankyo*, **44**, 94 (1995).
- 5) S. C. Dexter and G. Y. Gao, *Corrosion*, **44**, 717 (1988).
- 6) M. Akashi, Y. Imamura, T. Kawamoto and Y. Shinozaki, *Boshoku-Gijutsu* (Presently *Zairyo-to-Kankyo*), **24**, 31 (1975).
- 7) S. Motoda, Y. Suzuki, T. Shinohara and S. Tsujikawa, *Corros. Sci.*, **31**, 515 (1990).
- 8) Y. Ishihara, S. Motoda, Y. Suzuki and S. Tsujikawa, *Zairyo-to-Kankyo*, **44**, 355 (1995).
- 9) S. C. Dexter and J. P. LaFontaine, *Corrosion*, **54**, 851 (1998).
- 10) N. Washizu and H. Masuda, *Zairyo-to-Kankyo*, **49**, 362 (2000).
- 11) M. Akashi, *Boshoku-Gijutsu* (Presently *Zairyo-to-Kankyo*), **32**, 239 (1983).
- 12) W. H. Dickinson, *Applied and Environmental Microbiology*, **63**, 2502 (1997).
- 13) K. Xu, S. C. Dexter and G. W. Luther III, *Corrosion*, **54**, 814 (1998).
- 14) B. H. Olesen, R. Avci and Z. Lewandowski, *CORROSION/98*, Paper No.275, NACE, Houston (1998).
- 15) H. Amaya and H. Miyuki, *J.Jpn.Inst.Met.*, **58**, 775 (1994).
- 16) N. Washizu, H. Masuda and T. Kodama, *Zairyo-to-Kankyo*, **50**, 330 (2001).
- 17) P. J. B. Scott and M. Davies, *Mater. Perform.*, **28**, 5, 57, (1989).
- 18) JSCE, "Introduction to Microbiologically Influenced Corrosion (Jpn.)", Maruzen, p.12 (2004).
- 19) A. Mollica, A. Trevis, E. Traverso, G. Ventura, G. De Carolis and R. Dellepiane, *Corrosion*, **45**, 48 (1989).
- 20) G. Ito, "Fushokukagaku to boshokugijutu" (腐食科学と防食技術), Korona-sha, p.47 (1979).
- 21) JSCE, "Introduction to Microbiologically Influenced Corrosion (Jpn.)", Maruzen, p.207 (2004).
- 22) JSCE, "Introduction to Microbiologically Influenced Corrosion (Jpn.)", Maruzen, p.212 (2004).

(Manuscript received May 7, 2007;
in final form June 26, 2007)

要 旨

微生物が関与する腐食速度の上昇機構を解明する目的で、海水に暴露した Type 329J4L ステンレス鋼に対するカソード電流の測定ならびにバイオフィルムの生物学的解析を行った。自然海水中で試験片をあらかじめ 0.1 V vs. SHE に保持した後に、0.1 V vs. SHE で測定したカソード電流密度は $0.3 \sim 3 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ で推移した。一方、自然浸漬条件下で自然海水に暴露した後の 0.1 V vs. SHE におけるカソード電流密度は、測定の初期段階では $1 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ 以上であったが、12 h 以内に $0.1 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ 以下の値にまで低下した。0.2 V vs. SHE での自然海水への前処理暴露後に 0.2 V vs. SHE で測定したカソード電流密度は、測定の初期段階および最終段階のいずれにおいても約 $2 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ であった。自然浸漬条件下で自然海水へ前処理暴露後、0.2 V vs. SHE で測定したカソード電流密度は、測定の初期段階においては $1 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ 以上、測定最終段階では $0.1 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ 以下であった。0.3 V vs. SHE で測定を行った場合のカソード電流密度の平均値は、0.3 V vs. SHE での自然海水への前処理暴露後においては約 $0.2 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ 、自然浸漬状態での自然海水への前処理暴露後においては $0.01 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ 以下であった。人工海水に暴露後のカソード電流密度は、0.1, 0.2 および 0.3 V vs. SHE のいずれの電位で測定した場合でも $0.01 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ 以下であった。自然海水中において 0.2 V vs. SHE の電位条件下で形成されたバイオフィルムに対して、変性密度勾配ゲル電気泳動法試験で検出された DNA 塩基配列データは、自然浸漬条件下で形成されたバイオフィルムに検出されたデータと異なった。以上より、カソード条件下では特定の微生物が選択的に鋼表面に付着し、このような微生物がカソード電流を増大させた結果として腐食速度が上昇すると結論づけられる。

キーワード 腐食速度, Type 329J4L 鋼, 自然海水, カソード条件, 自然浸漬条件, DNA 塩基配列