金属鉄を電子供与体として利用可能なメタン生成古細菌 (MPA) と硫酸塩還元菌 (SRB) の共存による鉄腐食促進作用

伊藤 公夫*, 若井 暁**, 鶴丸 博人**, 飯野 隆夫**, 森 浩二**, 内山 拓**, 三木 理*, 原山 重明**

* 新日本製鐵株式会社 先端技術研究所 環境基盤研究部
** 独立行政法人製品評価技術基盤機構 (NITE) 生物遺伝資源開発部門

Iron Corrosion by Methane Producing Archaea (MPA) and Sulfate Reducing Bacteria (SRB) Utilizing Metallic Iron as an Electron Donor

Kimio Ito*, Satoshi Wakai**, Hirohito Tsurumaru**, Takao Iino**, Koji Mori**, Taku Uchiyama**, Osamu Miki* and Shigeaki Harayama**

* Environment Research Lab., Advanced Technology Research Laboratories, Nippon Steel Corporation

** Biotechnology Development Center, National Institute of Technology and Evaluation (NITE)

Methane Producing Archaea (MPA), which could utilize metallic iron as an electron donor and CO_2 as an electron acceptor and a carbon source, corroded an iron coupon severely in seawater medium under anaerobic condition ($\text{N}_2(80\%) + \text{CO}_2(20\%)$). Main component of corrosion products by MPA was FeCO_3 . MPA corroded the iron coupon more severely when they coexisted with SRB which could also utilize metallic iron as an electron donor. Corrosion rate of the iron coupon by MPA + SRB was about 2.3 times higher than that by MPA only under anaerobic condition ($\text{N}_2(80\%) + \text{CO}_2(20\%)$). Main component of corrosion products by MPA + SRB was FeCO_3 like that by MPA.

Corrosion rates of the iron coupon by MPA only, or MPA + SRB under anaerobic condition ($\text{N}_2(80\%) + \text{CO}_2(20\%)$) were higher than those under aerobic condition (Air) after the anaerobic corrosion experiments.

Therefore, corrosive effects on iron by MPA + SRB, which can utilize metallic iron as an electron donor, should be considered as cause of microbiologically influenced corrosion in the anaerobic corrosive environments like oil fields, where CO_2 and Cl^- are available.

Key words : methane producing archaea (MPA), sulfate reducing bacteria (SRB), iron, microbiologically influenced corrosion, anaerobe, crude oil, seawater, ferrous carbonate, FeCO_3

1. 緒 言

酸素のない嫌気性環境には、メタン生成古細菌 (Methane Producing Archaea ; MPA) や硫酸塩還元菌 (Sulfate Reducing Bacteria ; SRB) などの嫌気性微生物が棲息している。SRB は中性条件で硫化水素イオン (HS^-) を発生して鉄を腐食し、黒色の硫化鉄 (FeS) を生成することから、古くから鉄腐食原因微生物として知られている。しかし、もう一方の代表的な嫌気性微生物である MPA に関しては、鉄腐食との関係はほとんどわかっていない。MPA が発生するメタン (CH_4) には、SRB が発生する硫化水素イオンのような鉄腐食性がないことから、これまで、MPA は鉄腐食原因微生物とはみなされてこなかった。

我々は前報¹⁾で、嫌気性条件 ($\text{N}_2(80\%) + \text{CO}_2(20\%)$) の海水培地を用いて、金属鉄を電子供与体、 CO_2 を電子受容体かつ炭素源として利用可能な嫌気性微生物の集積培養物を、東北地区油井、江戸川河口底泥、九州地区原

油タンク由来の環境試料から得て、それぞれの集積培養物による鉄腐食への影響を調べて、九州地区原油タンク底板残留スラッジ由来の集積培養物が激しい鉄腐食を起こすことと、主要な腐食生成物が炭酸鉄 (FeCO_3) であることを報告した。また、この九州地区原油タンク底板残留スラッジ由来の集積培養物から、金属鉄を電子供与体として培養可能な鉄腐食性 MPA である *Methanococcus maripaludis* KA1 株を単離することに成功した²⁾。さらに、同じ九州地区原油タンク底板残留スラッジから金属鉄を電子供与体とする条件でも培養可能な SRB の MIC5-15 株を単離することにも成功した。

実際の嫌気性環境では MPA と SRB が単独で存在していることは考えづらく、MPA と SRB は嫌気性環境の複合微生物系で共存している可能性が考えられる。そこで本研究では、*Methanococcus maripaludis* KA1 株と MIC5-15 株を用いて、無菌の場合、MPA、SRB がそれぞれ単独で存在する場合、MPA と SRB が共存する場合の鉄腐食を、腐食試験により比較した。さらに、SRB による鉄腐食では、嫌気性環境で腐食した後、引き続き空気にさらされることによって、激しい鉄腐食が起こることが報告されている^{3), 4)}。ほとんどの場合、嫌気性環境における鉄の微生物腐食は、空気にさらされて人が腐食現場に立ち入ることができるようになった条件で見つかる場合が多い。このため、嫌気性環境での微生物腐食と、その

* 〒293-8511 富津市新富 20-1 (20-1, Shintomi, Futtsu, 293-8511 Japan)

** 〒292-0818 木更津市鎌足 2-5-8 (2-5-8, Kamatari, Kisarazu, 292-0818 Japan)

後の空気にさらされたことによる腐食影響の寄与程度があいまいであった。そこで本研究では、嫌気性環境で2週間腐食試験を行った後、さらに2週間空気にさらした条件に関しても腐食試験を行った。

2. 実験方法

2.1 腐食試験に用いた微生物

2.1.1 金属鉄を電子供与体として利用可能な MPA

本研究では、金属鉄を電子供与体として、CO₂を電子受容体かつ炭素源として利用可能な MPA (*Methanococcus maripaludis* KA1 株)²⁾を用いた。

この MPA は、九州地区の原油タンクの底板に残留したスラッジを試料として、純鉄 (Fe⁰) を電子供与体、CO₂を電子受容体かつ炭素源とする条件で、Uchiyama ら²⁾により単離された MPA である。

2.1.2 金属鉄を電子供与体として利用可能な SRB

本研究では、前記 MPA (*Methanococcus maripaludis* KA1 株)と同様に、九州地区の原油タンクの底板に残留したスラッジから単離した SRB (MIC 5-15 株) (*Desulfovibrio dechloracetivoram* (GenBank Accession Number AF230530) と 16S rRNA 遺伝子の塩基配列が 98.5% 相同)を用いた。この SRB は、純鉄を電子供与体、CO₂を炭素源とする条件で、前記 MPA と同様に培養可能であることを確認した SRB である。

2.2 腐食試験および解析方法

2.2.1 嫌気性条件 (N₂(80%)+CO₂(20%)) での腐食試験

腐食試験液には Widdel ら⁵⁾が報告し、Dinh ら⁶⁾が金属鉄を電子供与体とする条件で嫌気性微生物の単離と腐食試験に用いた海水培地の組成を参考に、Uchiyama ら²⁾が改変して MPA による腐食試験に使用した海水培地を用いた。この海水培地は 100 mM Hepes 緩衝液 (pH 7) を添加することにより pH を 7 に調製してある。容積 70 mL のガラス容器 (ブチルゴム栓付きバイアル瓶 V-50; 日電理硝子) の底に純鉄 (>99.5% Fe) 試験片 (10×10×0.108 mm) を 1 枚おき、N₂(80%)+CO₂(20%) ガスで曝気して嫌気性条件にした上記腐食試験液を 20 mL 加えて純鉄試験片を腐食試験液に浸漬した。ガラス容器内の気相部にも N₂(80%)+CO₂(20%) ガスを充填した状態で、ブチルゴム栓とアルミキャップによりガラス容器を密封した。微生物を接種する場合には、シリンジ針でゴム栓を貫通させることにより、空気にさらすことなく嫌気的に微生物の培養液を 1 mL ずつ添加した。微生物の培養液添加後、緩やかにガラス容器を揺すって、微生物を腐食試験液中に分散させて腐食試験を行った。22℃で2週間静置して腐食試験を行った。無菌の場合を対照区 (Control) として、SRB を単独接種した場合、MPA を単独接種した場合、MPA と SRB を共に接種した場合、MPA を接種して1週間後に SRB を追加接種した場合、それぞれについて腐食試験を実施した。腐食試験を開始してから2週間後、腐食試験片を解析するため、純窒素ガス雰囲気グローブボックス中でガラス容器から試験片を取り出し、乾燥させた。乾燥した試験片を 1/2 に切断し、一方の試料は、断面観察用にクロスセクションポ

リッシャー (SM-09010, 日本電子) 加工し、断面をエネルギー分散型 X 線分析装置付き走査型電子顕微鏡 (SEM-EDS) (JSM7000F, 日本電子) で観察し、C, O, Mg, Si, P, S, Cl, Ca, Fe の元素分布を解析した。

腐食試験終了後の試験片の SEM による断面の観察写真を用いて、腐食生成物を除いた地鉄部分の残存板厚を3カ所測り、その平均値を腐食試験終了時の試験片の残存板厚とした。元の試験片の板厚 (108 μm) と腐食試験終了時の残存板厚の差を求め、1年間当たりの板厚減量を腐食速度 (単位 mm/year) として計算した。残存板厚の測定値のばらつきに起因する腐食速度計算値のばらつきを確認するため、標準偏差も計算した。

切断したもう一方の試験片試料は、X 線回折 (XRD) (RINT1500, リガク) により腐食生成物の解析に用いた。また、腐食試験終了後、試験液の pH を pH 電極により測定した。

2.2.2 嫌気性条件 (N₂(80%)+CO₂(20%)) での腐食に引き続き好気性条件 (空気下) での腐食試験

前記 2.2.1 の嫌気条件 (N₂(80%)+CO₂(20%)) における腐食試験と同じ条件で、同時並行して嫌気性条件での純鉄試験片の腐食試験を行った。2週間経過後、フタを開け、内部の気相を空気に置換し、試験液を緩やかに攪拌して、試験液にも空気を溶存させた。気相部を空気としたまま再びフタをして水の蒸発を防いだ好気性条件で、引き続き 22℃で2週間静置して腐食試験を行った。好気性条件で2週間 (計4週間) 経過後、腐食試験片を空気下で取りだし、試験片を空気下で乾燥後、1/2 に切断して、前記 2.2.1 の方法と同様に、SEM-EDS, XRD による解析を行った。また、嫌気性条件に引き続き好気性条件での腐食試験終了後については、試験液の pH と酸化還元電位 (ORP) を pH 電極と白金電極を用いて測定した。さらに、試験片を除いた腐食試験液を、懸濁物を含めて均質化して採取し、塩酸を用いて鉄分を溶解後、アスコルビン酸を用いて二価鉄に還元して、オルトフェナントロリン法により、試験液の全鉄濃度を測定した。

3. 結果と考察

3.1 嫌気性条件 (N₂(80%)+CO₂(20%)) での腐食試験結果

腐食試験を実施した純鉄試験片断面の SEM による観察結果を Fig. 1(a) から (e) に、SEM-EDS による断面元素分布の解析結果を Fig. 2 から 6 に示す。また、腐食生成物の X 線回折結果を Table 1 に示す。無菌条件 (Control) では、純鉄試験片が腐食している様子は明確には観察できなかった (Fig. 1(a))。SRB 単独で腐食させた場合には、純鉄表面は黒色の平坦な被膜で覆われたが、この被膜の下で腐食は進んでいなかった (Fig. 1(b))。この黒色の被膜は腐食試験液を攪拌することにより容易に剥がれた。SEM-EDS により、この黒色の被膜には Fe, S, C, O が検出された (Fig. 3)。SRB による腐食生成物であることから、この黒色の被膜には硫化鉄が含まれると考えられる。黒色の被膜の構成成分を調べるため、X 線回折による解析も試みたが、黒色の被膜が非常に薄いためか、地鉄の Fe のみしか明確なピークとして検出できなかった。

MPA 単独で腐食させた場合には、純鉄はほぼ均一に

Fig. 1 Cross Section Image of Iron Coupon by SEM.

全面腐食して、表面は灰色の腐食生成物の厚い層で覆われた (Fig. 1(c)). SEM-EDS により、腐食生成物には Fe, O, C, Cl, P, Mg が検出された (Fig. 4). 腐食生成物中の元素の分布には以下の特徴があった。Fe, C, O は腐食

Fig. 2 Cross section image of iron coupon by SEM-EDS (Control).

生成物の地鉄と接する側に層状に検出された。Cl は腐食生成物と地鉄が接する境界部分に検出された。また、Fe, O, P, Mg が腐食生成物の上層に検出された。X 線回折では、MPA 単独で腐食させた場合の腐食生成物の主要な構成成分として炭酸鉄 (FeCO_3) が同定された。したがって、SEM-EDS で腐食生成物の地鉄と接する下層に検出された Fe, C, O は FeCO_3 であると考えられる。 FeCO_3 は炭酸ガス腐食の腐食生成物として知られている。MPA の存在有無によって、 FeCO_3 形成が強く影響を受けることが明らかとなった。また、地鉄と接する部分に Cl が検出されたことから、地鉄表面に塩素イオン (Cl^-) が濃化したことが考えられる。高濃度の Cl^- は鉄の不動態被膜の形成を阻害することが知られており、MPA による鉄腐食では、地鉄と接する部分に Cl^- が濃化することで鉄腐食を促進している可能性が考えられる。なお、腐食生成物の地鉄と接しない上層に検出された Fe, O, P, Mg に関しては、X 線回折によって構成成分を同定することはできなかった。

MPA と SRB が共存した場合には、MPA 単独の場合よりも激しく純鉄を腐食した。腐食形態は MPA 単独の場合と同様にほぼ均一な全面腐食であった (Fig. 1(d)). SEM-EDS により、腐食生成物には、Fe, C, O, S が検出された (Fig. 5). Fe, C, O は、腐食生成物の地鉄と接する部分に検出された。腐食生成物の X 線回折により、 FeCO_3 が検出された (Table 1). したがって、SEM-EDS で検出された Fe, C, O は、 FeCO_3 に由来するものと考えられる。また、S は腐食生成物表面の腐食試験液と接する位置に被膜状に濃化して検出された (Fig. 5). S が腐食試験液と接する表面で被膜状に濃化することは、SRB 単独による腐食の場合にも観察された (Fig. 3).

MPA を接種して腐食試験を開始した後、1 週間後に SRB を接種して計 2 週間腐食試験した場合には、MPA

Fig. 3 Cross section image of iron coupon by SEM-EDS (SRB).

Fig. 4 Cross section image of iron coupon by SEM-EDS (MPA).

Fig. 5 Cross section image of iron coupon by SEM-EDS (MPA + SRB).

と SRB が共存した場合の腐食と MPA 単独による腐食の中間程度の腐食が起こった (Fig. 1(e)). SEM-EDS により、腐食生成物には FeCO_3 と考えられる Fe, C, O を含む層が観察された (Fig. 6). さらに、この FeCO_3 と考えられる腐食生成物層と地鉄の境界部分には Cl^- の濃化が観察された。 FeCO_3 からなる腐食生成物層と地鉄の境界部分に Cl^- が濃化することは、MPA 単独による腐食でも観察されている (Fig. 4)。

腐食生成物として FeCO_3 が生成するメカニズムは、鉄

Fig. 6 Cross section image of iron coupon by SEM-EDS (MPA + SRB (SRB were inoculated one week later.)).

Table 1 Substances detected by XRD.

	Substances detected XRD
Control	Fe
SRB	Fe
MPA	Fe, FeCO_3
MPA+SRB	Fe, FeCO_3

の腐食によるアノード反応で溶出した Fe^{2+} が腐食試験液中の HCO_3^- と以下のように反応して、 FeCO_3 が生成することが考えられる。

また、 Cl^- が地鉄と腐食生成物の境界部分に濃化するメカニズムは以下のように考えられる。鉄のアノード反応部の近傍では、溶出した Fe^{2+} が水和する反応、

あるいは、溶出した Fe^{2+} が HCO_3^- と結合して FeCO_3 になる反応

により局所的に酸性化することが考えられる。塩化物イオン Cl^- は、 SO_4^{2-} など海水に含まれる他の陰イオンと比べて、腐食生成物の欠陥部などをとおして移動しやすいことが考えられるため、アノード反応部近傍で発生する H^+ と電気的中性条件を満たすように、 Cl^- が地鉄と腐食生成物の境界部分に濃化したことが考えられる。

Fig. 1(a) から (e) の SEM 断面観察写真より、腐食生成物を除いた地鉄部分の残存板厚を 3 カ所で測って、1 年間あたりの板厚減量を腐食速度として計算した。結果を Table 2 に示す。嫌気性条件 ($\text{N}_2(80\%) + \text{CO}_2(20\%)$) において、SRB 単独による腐食試験では、表層が黒色の硫化鉄を含むと考えられる薄い被膜で覆われ、腐食は軽微

Table 2 Corrosion Rate of iron under N₂ (80%) + CO₂ (20%) (at 22°C).

	Control	SRB	MPA	MPA+SRB	MPA+SRB (SRB were inoculated one week later)
Corrosion Rate (mm/year)	0.13±0.00	0.05±0.02	0.59±0.03	1.36±0.12	0.66±0.12

Table 3 pH in corrosion test medium.

	Control	SRB	MPA	MPA+SRB	MPA+SRB (SRB were inoculated one week later)
After anaerobic corrosion test (two weeks)	7.1	7.1	7.1	7.3	7.2
After aerobic corrosion test (two weeks) subsequent to anaerobic corrosion test (two weeks)	7.2	7.1	7.1	7.3	7.2

であったが、SEM 断面観察写真をもとに腐食速度は 0.05 mm/year と計算された。これに対して、MPA 単独による腐食速度は 0.59 mm/year であった。さらに、MPA と SRB が共存すると腐食速度は 1.36 mm/year となり、MPA 単独の場合と比較して約 2.3 倍腐食が促進されたことがわかった。また、MPA による腐食試験の開始後、1 週間後に SRB を追加添加した場合の腐食速度は 0.66 mm/year となり、MPA と SRB 共存による腐食と MPA 単独による腐食の中間の腐食速度となった。

嫌気性条件での腐食試験後の試験液の pH を Table 3 の上段に示した。Hepes 緩衝液の効果により、試験液の pH は 7.1 から 7.3 の範囲にあり、腐食試験後の試験液の pH に大きな違いは見られなかった。腐食が激しかった、MPA と SRB が共存する場合は、腐食試験液の pH が 7.3 と若干高めの値となった。

嫌気性環境において鉄腐食に伴うカソード反応

の促進や、鉄を電子供与体、CO₂ を電子受容体かつ炭素源として利用可能な MPA によるメタン生成反応

の促進などがアルカリ化の原因として考えられる。

3.2 嫌気性条件 (N₂(80%)+CO₂(20%)) での腐食に引き続き好気性条件 (空気下) での腐食試験の結果

2 週間嫌気性条件 (N₂(80%) + CO₂(20%)) での腐食試験に引き続き、2 週間好気性条件 (空気下) で腐食試験を行った試験片の断面を SEM 観察した結果を Fig. 7(a) から (e) に示した。無菌の場合、空気中にさらした後、孔食状の局部腐食が観察された (Fig. 7(a) ; 白線で囲んだ部位)。SEM-EDS による解析結果 (Fig. 8) により、空気中にさらした後の腐食生成物には主に Fe と O が検出されることから、オキシ水酸化鉄 (FeOOH) が生成したものと考えられる。

SRB 単独の場合、嫌気性条件 (N₂(80%) + CO₂(20%)) から好気性条件 (空気下) に変えても、腐食促進は観察されなかった。嫌気性条件の腐食試験で観察された硫化鉄と考えられる S を含む腐食生成物表層の被膜 (Fig. 3) は、好気性条件で試験を行った後の腐食生成物では消失

した (Fig. 9)。

MPA 単独の場合、嫌気性条件 (N₂(80%) + CO₂(20%)) では FeCO₃ と考えられる Fe, C, O を多く含む腐食生成物の層が地鉄表面に観察された (Fig. 4) が、好気性条件 (空気下) では、この層の上に P, O, Fe を含む層が観察された (Fig. 10)。空気下では CO₂ の供給が少なくなったため、FeCO₃ に代わって、海水培地に含まれるリン酸イオン PO₄³⁻ と腐食で溶出した Fe²⁺ が結合して、リン酸鉄 (Fe₃(PO₄)₂) が形成された可能性が考えられる。

MPA と SRB が共存する場合、好気性条件 (空気下)

Fig. 7 Cross Section Image of Iron Coupon by SEM (after air exposure for two weeks).

Fig. 8 Cross section image of iron coupon by SEM-EDS (Control) (after air exposure for two weeks).

Fig. 9 Cross section image of iron coupon by SEM-EDS (SRB) (after air exposure for two weeks).

にしても FeCO_3 を主要構成成分とすると考えられる腐食生成物の層が地鉄の表面を覆ったままであった (Fig. 11).

MPA を接種した後、1 週間後に SRB を接種した場合も同様に、好気性条件 (空気下) にしても表層に FeCO_3 を主要構成成分とすると考えられる腐食生成物の層が観察された。この腐食生成物の層と地鉄の境界部には Cl^- の濃化が観察された。 (Fig. 12)

さて、本研究では嫌気性条件 (2 週間) のみと、嫌気

Fig. 10 Cross section image of iron coupon by SEM-EDS (MPA) (after air exposure for two weeks).

Fig. 11 Cross section image of iron coupon by SEM-EDS (MPA + SRB) (after air exposure for two weeks).

性条件 (2 週間) + 好気性条件 (2 週間) (計 4 週間) の 2 種類の腐食試験を同時に開始して並行して実施した。後者の嫌気性条件 (2 週間) + 好気性条件 (2 週間) (計 4 週間) の腐食試験において、嫌気性条件での腐食が、前者の嫌気性条件 (2 週間) のみの腐食試験と同様の腐食速度で進行したものと仮定することにより、本腐食試験の好気性条件 (空気下) での腐食速度を分けて計算することができる。結果を Table 4 に示した。比較のため、Table 2 に示した嫌気性条件における腐食速度と、Table

Fig. 12 Cross section image of iron coupon by SEM-EDS (MPA+SRB (SRB were inoculated one week later.)) (after air exposure for two weeks).

4 に示した嫌気性条件に引き続く好気性条件（空気下）での腐食速度を Fig. 13 に棒グラフで示した。

嫌気性条件（ $N_2(80\%) + CO_2(20\%)$ ）における腐食速度

は、MPA と SRB が共存する場合に最も高い値となった。一方、好気性条件（空気下）での腐食速度は、 $0.12 \sim 0.27 \text{ mm/year}$ ではほぼ同じレベルの値となり、MPA, SRB の存在有無による明確な違いは認められなかった。したがって、嫌気性微生物である MPA と SRB の共存による激しい鉄腐食は、嫌気性条件（ $N_2(80\%) + CO_2(20\%)$ ）で進行しており、その後、空気にさらされることによる腐食影響は小さいことが明らかになった。

また、Table 5 には嫌気性条件（ $N_2(80\%) + CO_2(20\%)$ ）と好気性条件（空気下）での計 4 週間の腐食試験が終了した後の試験液の全鉄濃度を示した。MPA と SRB が共存した場合、MPA 単独の場合、試験液の全鉄濃度はそれぞれ 2380 mg/L , 774 mg/L であったのに対して、無菌の場合、SRB 単独の場合、試験液の全鉄濃度はそれぞれ 83 mg/L , 85 mg/L であった。

腐食試験液中の全鉄は、試験片表面の腐食生成物に移行した鉄分を除けば、腐食により試験片から溶出した鉄分と考えることができる。そこで、Table 5 の試験液の全鉄濃度から試験液（体積 20 mL ）に移行した鉄分の全量を計算して、結果を Table 6 の 2 段めに記した。例えば、MPA と SRB が共存した場合、計 4 週間の腐食試験で 47.6 mg の鉄分が試験片から試験液に移行した計算となる。本試験で用いた純鉄試験片の形状は $10 \times 10 \times 0.108 \text{ mm}$ であり、鉄の密度は 7.86 g/cm^3 のため、試験片の初期重量は 84.9 mg となる。試験片の初期重量から腐食により試験液に移行した鉄分の重量を差し引いた重量が、腐食試験後も試験片に残存している鉄の重量と考えられ

Table 4 Corrosion Rate of iron under air (at 22°C).

	Control	SRB	MPA	MPA+SRB	MPA+SRB (SRB were inoculated one week later)
Corrosion Rate (mm/year)	0.16 ± 0.18	0.23 ± 0.02	0.27 ± 0.02	0.17 ± 0.02	0.12 ± 0.09

Fig. 13 Corrosion rate of iron coupon under anaerobic ($N_2(80\%) + CO_2(20\%)$) and continuous aerobic (air) conditions.

Table 5 Total-Fe in the corrosion test medium after anaerobic and aerobic corrosion test.

	Control	SRB	MPA	MPA+SRB	MPA+SRB (SRB were inoculated one week later)
Total-Fe (mg/L)	83	85	774	2380	1610

Table 6 Total-Fe in the corrosion test medium, Estimated total-Fe remaining in the test coupon, Residual thickness of the test coupon and Residual thickness / initial thickness.

	Control	SRB	MPA	MPA+SRB	MPA+SRB (SRB were inoculated one week later)
Total-Fe in the corrosion test medium (mg)	1.7	1.7	15.5	47.6	32.2
Estimated total-Fe remaining in the test coupon (%)	98	98	82	44	62
Residual thickness of the test coupon (μm)	96.8	97.3	75.3	49.5	77.9
Residual thickness/initial thickness (%)	90	90	70	46	72

Table 7 ORP in corrosion test medium (mV_{SSE}).

	Control	SRB	MPA	MPA+SRB	MPA+SRB (SRB were inoculated one week later)
After aerobic condition	+26	+25	+22	-113	-25

る。この試験片に残存している鉄の重量を試験片の初期重量で割った値 (%) を Table 6 の 3 段めに示した。例えば、MPA と SRB が共存した試験条件では、嫌気性条件と好気性条件合わせて 4 週間の腐食試験終了後に初期重量と比較して 44% の鉄が試験片に残存している計算となる。

一方、均一な全面腐食を仮定した場合、試験片の残存板厚と、試験液に移行せず試験片に残存している鉄の量は比例することになる。そこで、計 4 週間の腐食試験後に SEM 断面観察写真から測定された試験片の残存板厚を Table 6 の 4 段めに示した。この残存板厚の初期板厚 ($108\mu\text{m}$) に対する割合を Table 6 の 5 段めに示した。

例えば、MPA と SRB が共存する場合、Table 6 の 3 段めに示したように、試験液の全鉄濃度の測定結果から、44% の鉄分が試験片に残存しているものと計算された。一方、Table 6 の 5 段めに示したように、試験片板厚の測定結果から、初期板厚に対して 46% の残存板厚が計算された。両方の値はほぼ類似の値となった。他の試験条件では、両者の値は若干異なる値となったが、本研究で示した MPA と SRB の共存による純鉄試験片の腐食促進作用は、均一な全面腐食を仮定した板厚測定に基づく腐食速度の結果と、試験液に溶出した全鉄の濃度測定の結果の両方から裏付けられることが明らかになった。

MPA と SRB が共存する場合の腐食生成物の主要成分は、MPA 単独による腐食生成物と同様に炭酸鉄 (FeCO_3) であったことから、MPA と SRB が共存する場合の鉄腐食で主要な役割を担っているのは、SRB ではなく、MPA と考えられる。また、 Cl^- の濃化が腐食生成物と地鉄の間に観察された。したがって、本研究の MPA による腐食、MPA と SRB の共存による腐食では、 FeCO_3 を形成するのに十分量の CO_2 と、 Cl^- の濃化に必要な Cl^- の存在が、腐食の促進に関与している可能性が考えられる。SRB が共存することで MPA の腐食能力が

増強されるメカニズムは今のところ分かっていない。SRB が発生する HS^- は強力な還元剤であるため、酸化還元電位 (ORP) を低下させる作用がある。低い ORP の環境を好む MPA に適した環境が SRB と共存することで形成された可能性が考えられる。Table 7 は嫌気性条件 ($\text{N}_2(80\%) + \text{CO}_2(20\%)$) での 2 週間の腐食試験の後、2 週間好気性条件 (空気下) で腐食試験した後の試験液の ORP の測定結果であるが、空気にさらした後であるにも関わらず、MPA と SRB が共存した場合には $-113\text{mV}_{\text{SSE}}$ と最も低い ORP 値であった。したがって、SRB と共存することで、MPA 単独の場合と比べて MPA に適した低い ORP の環境が実現されていた可能性が考えられる。

本研究では、金属鉄を電子供与体とする条件で培養可能な MPA と SRB を用いた。これらの微生物がどのように鉄から電子を受け取るか、そのメカニズムは今のところ不明である。本研究で使用した MPA、SRB とともに H_2 を電子供与体とする条件でも培養可能であるため、鉄の腐食に伴うカソード反応 ($2\text{H}_2\text{O} + 2\text{e}^- \rightarrow 2[\text{H}] + 2\text{OH}^- \rightarrow \text{H}_2 + 2\text{OH}^-$) で発生する水素を電子供与体として利用している可能性や、Uchiyama ら²⁾ が推定しているように、直接金属鉄に接触して電子を受け取る可能性なども考えられるが、今のところ詳細は不明である。

また、本研究で用いた MPA と SRB は金属鉄を電子供与体として利用可能な菌体であるため、有機酸など有機物を電子供与体として利用する一般的な微生物と比べると、特殊な菌体を選んで腐食試験を行ったことになる。有機酸など有機物を電子供与体として利用する他の微生物がいる場合に、本研究で用いた MPA と SRB の共存による腐食促進が起こるか否かについては、今後の課題である。

4. 結 論

嫌気性条件 ($N_2(80\%) + CO_2(20\%)$) の海水培地中において、金属鉄を電子供与体として、 CO_2 を電子受容体かつ炭素源として利用可能な MPA は、純鉄試験片の腐食を促進した。主要な腐食生成物は $FeCO_3$ であった。この MPA が、同様に金属鉄を電子供与体として利用可能な SRB と共存することで、MPA 単独の場合よりも腐食速度がさらに約 2.3 倍高い値となった。MPA と SRB が共存する場合の腐食生成物も、MPA 単独による腐食生成物と同様に $FeCO_3$ であった。

嫌気性条件 ($N_2(80\%) + CO_2(20\%)$) と、引き続き好気性条件 (空気下) での腐食速度を比較した結果、MPA と SRB が共存する場合、あるいは MPA 単独の場合の腐食は、主に嫌気性条件 ($N_2(80\%) + CO_2(20\%)$) で進行しており、引き続き空気にならずることによる腐食影響は小さいことが明らかになった。

油井など高濃度の CO_2 と Cl^- が存在するような嫌気性腐食環境においては、本研究で腐食試験に使用したような金属鉄を電子供与体として、 CO_2 を電子受容体や炭素源として利用可能な MPA と SRB が共存している可能性

も想定される。MPA 単独、SRB 単独による腐食のみならず、MPA と SRB の共存による腐食についても十分留意すべきと考えられる。

本研究は NEDO「微生物を利用した石油の環境安全対策に関する調査」の一環として実施した。

参 考 文 献

- 1) K. Ito, T. Uchiyama, T. Iino, K. Mori, S. Wakai, H. Tsurumaru, O. Miki and S. Harayama, *Zairyo-to-Kankyo*, **59**, 298 (2010).
- 2) T. Uchiyama, K. Ito, K. Mori, H. Tsurumaru and S. Harayama, *Appl. Environ. Microbiol.*, **76**, 1783 (2010).
- 3) J. A. Hardy and J. L. Bown, *Corrosion*, **40**, 650 (1984).
- 4) T. R. Jack, M. Wilmot, J. Stockdate, G. Van Boven, R. G. Worthingham and R. L. Sutherby, *Corrosion*, **54**, 246 (1998).
- 5) F. Widdel and F. Bak, Gram-negative mesophilic sulfate-reducing bacteria. In *The prokaryotes*. 2nd vol. IV, Edited by A. Balows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder and K. H. Schleifer. New York, Springer-Verlag. p.3352-p.3378 (1992).
- 6) H. T. Dinh, J. Kuever, M. Musmann, A. W. Hassel, M. Stratmann and F. Widdel, *Nature*, **427**, 829 (2004).

(Manuscript received March 2, 2011;
in final form May 19, 2011)

要 旨

嫌気性条件 ($N_2(80\%) + CO_2(20\%)$) の海水培地において、金属鉄を電子供与体として、 CO_2 を電子受容体かつ炭素源として利用可能な MPA は、純鉄試験片を腐食した。主要な腐食生成物は $FeCO_3$ であった。この MPA が、同様に金属鉄を電子供与体として利用可能な SRB と共存することで、MPA 単独の場合よりも腐食が約 2.3 倍促進されることが明らかになった。MPA と SRB が共存する場合の腐食生成物も、MPA 単独による腐食生成物と同様に $FeCO_3$ であった。

また、嫌気性条件 ($N_2(80\%) + CO_2(20\%)$) での腐食速度と、引き続き好気性条件 (空気下) での腐食速度を比較した結果、MPA 単独、あるいは、MPA と SRB が共存する場合の腐食速度は、嫌気性条件 ($N_2(80\%) + CO_2(20\%)$) の方が高い値となった。

本研究で腐食試験に使用した MPA と SRB は同一の原油タンクのスラッジから単離されたものである。油井など高濃度の CO_2 と Cl^- が存在する実際の嫌気性腐食環境においては、金属鉄を電子供与体として、 CO_2 を電子受容体や炭素源として利用可能な MPA と同じく金属鉄を電子供与体として利用可能な SRB が共存している可能性も想定される。したがって、金属鉄を電子供与体として利用可能な MPA と SRB の共存による微生物腐食に対しても留意すべきと考えられる。

キーワード メタン生成古細菌 (MPA)、硫酸塩還元菌 (SRB)、鉄、微生物腐食、嫌気性微生物、原油、海水、炭酸鉄