自然海水中ステンレス鋼の自然電位貴化におよぼす バクテリアの影響

石原 靖子*, 辻川 茂男*

* 東京大学大学院工学系研究科金属工学専攻

Effect of Bacteria Combined with Diatom on Ennoblement of
Electrode Potential for Stainless Steels in Natural Sea Water

Yasuko Ishihara* and Shigeo Tsujikawa*

* *Department of Metallurgy, School of Engineering,
The University of Tokyo*

When stainless steels samples are immersed in natural sea water, an ennoblement of the electrode potential (E_{sp}) up to approximately 400 mV vs. SCE can occur, due to the development of biofilm on the samples. The main organisms in the biofilm include bacteria and diatom. In this paper, it was investigated the relationship between the ennoblement of E_{sp} and bacteria species in the biofilm, and the interaction between bacteria and diatom in the E_{sp} ennoblement. To study effect of various bacteria species in the biofilm on the ennoblement of E_{sp} , type 316 stainless steel samples were immersed in 0.4 μ m filtered natural sea water, where the filtering was expected to restrict bacteria as the only organisms in the water. Under this condition, ennoblement of E_{sp} up to 400 mV vs. SCE could not be attained, and the need of other organisms in biofilm, besides bacteria, to promote ennoblement was shown. The analysis of biofilm, formed in natural sea water, on sample with ennobled E_{sp} , detected the presence of sulfate-reducing bacteria, acidic and neutral sulfur-oxidizing bacteria (A-SOB and N-SOB, respectively). It was also observed that the density of N-SOB was high all through the year. To study effect of SOB on ennoblement of E_{sp} , type 304 stainless steel was immersed in solutions containing *Thiobacillus thioparus* (as N-SOB) and *T. thiooxidans* (as A-SOB). Remarkable E_{sp} ennoblement was induced by N-SOB, but not by A-SOB. However, as the density of attached N-SOB on the ennobled sample was too much higher than the density to be attained under immersion in unfiltered natural sea water, the ennoblement of E_{sp} was concluded not to occur by that single bacteria. When samples were transferred to diatom containing solution, after immersion in natural sea water for a few days, to promote attachment of bacteria on the samples, the E_{sp} of the samples presented high values, similar to the values observed for samples immersed in natural sea water in summer. After immersion in diatom containing solution, the effect of the density of attached bacteria and diatom on E_{sp} was investigated. For E_{sp} ennoblement up to 200 mV vs. SCE, the density of attached bacteria increased up to about 3.5×10^4 pg/cm², with increasing density of diatom. For E_{sp} ennoblement higher than 200 mV vs. SCE, it is suggested that the attachment of diatom on the sample plays a more important role.

Key words: corrosion, stainless steel, ennoblement of electrode potential, biofilm, natural sea water, sulfate reducing bacteria, sulfur-oxidizing bacteria, iron-oxidizing bacteria, diatom

* 〒113-8656 東京都文京区本郷 7-3-1 (7-3-1, Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo, 113-8656 Japan)

1. はじめに

自然海水中に浸漬されたステンレス鋼の表面には海水中に含まれる微生物およびこれらの分解産物からなるバイオフィームが形成され、夏期なら10日程で、自然浸漬電位 (E_{sp}) が約 400 mV vs. SCE まで貴化する¹⁾。試験片に付着した様々な微生物のうち、珪藻をバクテリア類と組み合わせることにより実験室でも大きな E_{sp} 貴化を再現できることや、その貴化量は珪藻付着密度・珪藻種に大きく依存することをこれまでに報告した²⁾。本研究では、 E_{sp} 貴化に対するバクテリアの影響を検討するため、第一に自然海水中におけるバクテリア類単独の貴化効果を調べた。また、試験片に付着しているバクテリア種の調査をおこない、その結果に基づいた特定のバクテリアによる E_{sp} 貴化再現実験をおこない、珪藻とバクテリアの共存効果についても検討した。

2. 実験方法

2.1 試験片

静岡県清水市の東京商船大学清水臨海実験実習所(以下、清水という)における自然海水浸漬および実験室における試験には、前報同様の Type 316 鋼試験片を用いた²⁾。一部の実験室試験には、厚さ 2.0 mm の Type 304 ステンレス鋼板 (304 鋼試験片) を用いた。寸法は、懸濁液浸漬部が 10×10 mm、柄の部分の幅が 3 mm、全長が 30 mm である。いずれも、SiC 紙 #800 まで湿式研磨し、アセトンによる脱脂・水洗ののち、24 時間以上乾燥し、実験に用いた。

2.2 バクテリア類のみを含む自然海水および滅菌海水中における浸漬試験

清水において、ポンプで汲み上げられた海水を、3~30 μm の各種孔径フィルター (TCP 30 SINE, TCYEBSSINE, TCYEHSSINE : 東洋濾紙(株)) を経て、最終的に孔径 0.4 μm のフィルター (611102 : 野村マイクロサイエンス(株)) を通過させることで、生物としてはバクテリア類のみを含むと期待される海水 (以下、0.4 μm ろ過海水) を得た。また、最終フィルターの孔径を ϕ 0.2 μm (611101 : 同) にすることで、生物を含まないと期待される海水 (以下、0.2 μm ろ過海水) も作成した。この過程をまとめたものが Fig. 1 である。以上の海水は、150×150×200 mm のメタクリル樹

Fig.1 Schematic diagram of the system for filtering natural sea water. The number in each square is the pore size of filters in μm .

脂製の水槽に約 1~2 l/min で配水し、オーバーフロー分はそのまま排水する一過性とした。316 鋼試験片は 1998 年 4 月から 1999 年 2 月まで各月内で 6~27 日間浸漬した。

2.3 自然海水浸漬下で試験片に付着したバクテリアの調査

清水において試験片に付着したバクテリア類のうち、 E_{sp} 貴化にかかわると考えられる酸性および中性硫酸化細菌 (それぞれ A-SOB, N-SOB とする), 硫酸塩還元細菌 (SRB), 鉄酸化細菌 (IOB) について調査した。1998 年 4 月より 1999 年 2 月までの各月で 10~14 日間、清水において、前報²⁾ 同様に浸漬した 316 鋼試験片に付着したバイオフィームをカミソリで剥ぎ取り、10 ml の滅菌海水中に懸濁させ、この液に含まれる、それぞれの細菌密度を MPN (most probable number, 最確数) 法³⁾ で定量した。それぞれの培養液組成を Table 1 に示す。

Table 1 Culture mediums for A-SOB, N-SOB, SRB and IOB.

		A-SOB ¹⁶⁾	N-SOB ¹⁶⁾	SRB ¹⁶⁾	IOB(modified)
$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	g		10.0		
$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$	g	10.0			
KH_2PO_4	g	0.2	0.25		
K_2HPO_4	g		0.25	0.2	0.5
KCl	g				0.1
NaCl	g				15
NH_4Cl	g	0.1	0.5		
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	g				3.0
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	g	0.25			0.5
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	g				0.01
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	g		0.001		
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	g			0.2	20
yeast extract	g			1.0	
Bacto pepton	g			2.0	
sodium lactate	g			3.5	
L(+)-ascorbic acid sodium salt	g			0.2	
Bacto agar	g			30	
sterilized sea water	ml	1000	1000	1000	
distilled water	ml				1000
pH		5.6	7.0	7.5	3.0

2.4 バクテリア懸濁液における浸漬試験

2.4.1 特定バクテリアの入手と培養

Thiobacillus thioautotrophicus (IAM No. 12113) と *Thiobacillus thiooxidans* (JCM No. 3866) はそれぞれ、東京大学分子細胞生物学研究所細胞・機能高分子センター IAM カルチャーコレクションと理化学研究所微生物系統保存施設より購入した。これらのバクテリアを 2.4.3 に述べる方法にてアクリジン・オレンジで染色したのち、蛍光顕微鏡観察した写真を Fig. 2 に示す。両バクテリアとも 25°C で一定密度に達するまで培養し、実験に用いた。培養液組成を Table 2 に示す。

2.4.2 浸漬試験

バクテリア懸濁液 100 ml を 200 ml ビーカーに入れ、この中に 304 鋼試験片を浸漬し、シリコン栓でふたをする。ふたには $\phi 15$ mm の孔をあけ、この開孔部を通気性に優れ、空中浮遊菌をとりこまない $0.5 \mu\text{m}$ のメンブレンフィルター（ミリラップ：日本ミリポア社）で覆ってある。ビーカー底に沈めた攪拌子をマグネチックスターラーで回転させ、液を攪拌することで、通気とバ

a. *Thiobacillus thiooxidans* b. *Thiobacillus thioautotrophicus*

4 μm

Fig.2 Acridine orange stained cells of *Thiobacillus thiooxidans* (a) and *T. thioautotrophicus* (b).

Table 2 Culture mediums for *Thiobacillus thiooxidans* and *T. thioautotrophicus*.

		<i>Thiobacillus thiooxidans</i>	<i>Thiobacillus thioautotrophicus</i>
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	g		1.2
KH_2PO_4	g	3.0	1.8
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	g	0.5	0.1
$(\text{NH}_4)_2 \cdot \text{SO}_4$	g	0.2	0.1
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	mg	250.0	0.03
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	mg	10.0	
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	g		0.02
$\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	g		0.02
sulfur*	g	10.0	
$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$	g		10.0
distilled water	ml	1000	1000
pH		3.0	7.0

* Sulfur is sterilized separately. (121°C, 15min)

クテリアの浮遊状態を保った。液温は 25°C に保った。

2.4.3 バクテリア密度の定量

1) 懸濁液中のバクテリア密度

バクテリア懸濁液を 2.7 ml 採取し、 $0.2 \mu\text{m}$ メンブレンフィルターでろ過した 0.1% アクリジンオレンジ溶液を 0.3 ml 加え、1~2 分染色する。この液をシリンジに取り、孔径 $0.2 \mu\text{m} \cdot \phi 25$ mm のニュクリポア・ブラック・メンブレンフィルター（110656：野村マイクロサイエンス（株））を通すことで、バクテリアをフィルター上に集める。これを、ろ過面を上にしたままスライドガラスにのせ、カバーガラスをかけて、 $\times 1,000$ で蛍光顕微鏡観察（ β 励起）する。バクテリアは暗視野の中で橙色に光って観察される。ここで、 $80 \times 80 \mu\text{m}$ (10×10 方形) の接眼マイクロメーターを用いて、総計数値が 200 に達するまで、少なくとも 5 回視野を変えて測定する。そして次式によりバクテリア密度を算出する。

$$\text{密度(細胞数/ml)} = ab / (cd)$$

ここに、a：1 方形中のバクテリア細胞数、b：フィルターろ過面積 (μm^2)、c：ろ過した溶液量 (ml)、d：方形面積 (μm^2)。

2) バクテリア懸濁液中で試験片に付着したバクテリア密度

304 鋼試験片に付着したバイオフィルムをカミソリではぎ取り、2.5 ml の滅菌海水に希釈したものを原液とする。これをエンドトキシンフリー蒸留水（5A：生化学工業（株））で適当に希釈し、市販のキット（エンドスぺシー ES-6 セットおよび Et-2 セット：生化学工業（株））を用いて、リポ多糖（LPS）を定量した。海洋細菌の大部分はグラム陰性菌であることが知られているが、LPS はグラム陰性菌に固有に含まれる⁴⁾。このような LPS 値を海洋細菌量として採用した。

2.4.4 バクテリア懸濁液中の SO_4^{2-} の定量

懸濁液を蒸留水で適当に希釈し、高速液体クロマトグラフィー（D-7000 HPLC：（株）日立製作所）にて定量した。

2.5 バクテリア類および珪藻による電位貴化再現試験

前報²⁾と同様に、Stage I として 316 鋼試験片の到達電位 ($E_{\text{sp},1}$) が 19~73 mV vs. SCE になるまで、自然海水中に浸漬した。付着微生物は、ほとんどバクテリア類のみと期待される。次の Stage II では、この試験片を実験室に持ち帰り、種々の密度まで培養をすすめた珪藻 *Nitzschia* sp.B 懸濁液に浸漬した。この珪藻は清水において、 E_{sp} が貴化しやすい夏の優先種である²⁾。Stage II 終了後、試験片に付着した珪藻密度は前報²⁾と同様に、またバクテリア密度は 2.4.3 の 2) に示した LPS により定量した。

3. 実験結果と考察

3.1 バクテリア類単独の E_{sp} 貴化効果

自然海水中におけるバクテリア類単独の E_{sp} 貴化効果を調べるため、バクテリア類以外の生物を除いた $0.4 \mu\text{m}$ ろ過海水に試験片を浸漬し、 E_{sp} の経時変化を測定した。その結果を、同時期に測定した非ろ過自然海水および、一般的に滅菌海水とされている $0.2 \mu\text{m}$ ろ過海水中のデータと併せて Fig. 3 に示す。 $0.4 \mu\text{m}$ ろ過海水では、 $0.2 \mu\text{m}$ ろ過海水と比較すると若干貴化がみられるものの、自然海水と比較すると貴化程度は小さい。Fig. 3 の実験終了時における、試験片付着バクテリア量と E_{sp} との関係を調べた結果を Fig. 4 に示す。 $0.2 \mu\text{m}$ ろ過海水では、バクテリアはほとんど付着しておらず、 E_{sp} 貴化も認められない。一方、 $0.4 \mu\text{m}$ ろ過海水と自然海水とのいずれにおいても、付着量が多くなるほど E_{sp} も貴化しているが、同程度の付着量であれば、

Fig. 3 Time variation of E_{sp} for Type 316 steel in natural (unfiltered) sea water, 0.4 and $0.2 \mu\text{m}$ filtered sea water.

Fig. 4 Relationship between E_{sp} and density of attached bacteria on Type 316 steel in natural (unfiltered) and filtered sea water.

自然海水中において、より大きな E_{sp} 貴化がみられた。

以上は1998年の4～5月の結果であるが、年間を通して、自然海水および $0.4 \mu\text{m}$ ろ過海水浸漬下で調査した E_{sp} とバクテリア付着量との関係を Fig. 5 に示す。それぞれの海水中では、いずれの月でも、バクテリア付着量が多いほど E_{sp} はより大きく貴化しており、かつ冬期より夏期に貴化の程度は大きい。この現象は、自然海水に浸漬された試験片でみられる、冬期よりも夏期に貴化しやすい¹⁾ という季節変動とよく対応している。しかし、 $0.4 \mu\text{m}$ ろ過海水中では、夏期2週間浸漬しても E_{sp} は約 200 mV vs. SCE にとどまった。Fig. 4 の結果と同様、400 mV という高い電位に達するためには、バクテリア類に加えて、他の微生物の共存が必要である。

3.2 自然海水浸漬中に試験片に付着したバクテリアの調査

2.3 に述べた調査による、各バクテリア付着密度と 316 鋼試験片の E_{sp} との季節変動を Fig. 6 に示す。N-SOB と SRB は年間を通して検出されたが、前者の密度は、各月とも桁違いに多かった。A-SOB は春から夏にかけてのみ検出された。IOB は年間を通じて検出されなかった。

IOB は二価鉄を三価鉄に酸化することで ATP を生成しているが、この酸化はバルク液中の硫酸イオン濃度に対する塩化物イオンまたは他の陰イオン濃度の割合が高いと抑制される⁵⁾。したがって、塩化物イオン濃度比が高い海水環境においては、IOB は存在しないと考察している報告⁶⁾ もある。また、このバクテリアの至適 pH が酸性であることも、pH 8 という海水環境では増殖しにくい要因と考えられる。

SRB も N-SOB 同様、年間を通して検出されたが、その密度は 10^3 cells/ml 以下と低い。SRB は偏性嫌気

Fig. 5 Monthly relationship between E_{sp} and density of attached bacteria on Type 316 steel in natural (unfiltered) and filtered ($0.4 \mu\text{m}$) sea water.

性菌で、主に沿岸海洋・干潟や湖沼の嫌気的な堆積物や水田土壌に分布している⁷⁾ため、酸素を含む自然海水環境には適さない可能性が考えられる。

A-SOB は 5~9 月にのみ検出されたが、その密度は 10^2 cells/ml 弱と低かった。このバクテリアの至適 pH は 3 であるので、pH 8 という海水環境では増殖しにくいかもしれない。これに比べ、中性 pH 条件を好む N-SOB は、調査したいずれの月でも $10^6 \sim 10^7$ cells/ml の高密度で検出された。

3.3 硫黄酸化細菌 (SOB) 単独の E_{sp} 貴化効果

3.2 で調査したバクテリア類のうち、特に高密度であった N-SOB を含み、かつこれまで研究例の少ない SOB に着目し、その単独の貴化効果を調べるために、A-SOB または N-SOB を純粋培養した懸濁液中に試験片を浸漬し、 E_{sp} を経時的に測定した。この際に用いるバクテリアは、清水にて試験片に付着したバイオフィilm 中から単離・純粋培養するのが望ましいが、それに要する時間や同定の難しさなどを考慮の上、国内の菌株保存機関より以下の 2 種、*T. thiooxidans* (A-SOB) と *T. thioparus* (N-SOB) を購入した。これらはともに淡水種であるが、前者は大西洋⁸⁾・ベンガル湾⁹⁾、後者は大西洋¹⁰⁾・ベンガル湾⁹⁾・太平洋¹¹⁾などで、同属同種が検出されている。

3.3.1 酸性硫黄酸化細菌 *T. thiooxidans*

2.85×10^7 cells/ml *T. thiooxidans* 懸濁液における 304 鋼試験片 E_{sp} の経時変化を Fig. 7 に示す。バクテリア懸濁液の pH を硫酸により、至適値である 3 に調整すると (●), バクテリアを含まない培養液に浸漬された場合 (×) より、試験終了時の E_{sp} は約 100 mV だけ貴化していた。また、試験片によっては、同様のバクテリア懸濁液浸漬下で 2 日目に E_{sp} が約 -400 mV vs. SCE まで大きく卑化したこともあった。これは、導線と試験

Fig.7 Time variation of E_{sp} for Type 304 steel in *Thiobacillus thiooxidans* solution and the culture medium.

片の接続部で、すきま腐食が発生したためと考えられる。一方、自然海水と同じ pH 8 に調整した懸濁液中 (○) では、pH 3 の時と同じバクテリア密度であるにもかかわらず、貴化効果はみられなかった。*T. thiooxidans* は $2S + 3O_2 + 2H_2O \rightarrow 2H_2SO_4$ という反応によりエネルギーを得ている¹²⁾ので、生成された硫酸により、懸濁液中の pH が低下する。実際に、Fig. 7 における試験終了時の (pH, SO_4^{2-} 濃度) は、pH 3 懸濁液で (1.68, 1.07%), 培養液では (3.02, 0.05%), pH 8 懸濁液で (7.12, 0.66%) であった。これを Fig. 8 に示す。pH 8 バクテリア懸濁液中の SO_4^{2-} 濃度は、培養液におけるそれより高く、pH も 0.88 低下していたので、至適値よりかなりアルカリ側の pH においてもバクテリアの活性は失われないことがわかる。

研磨ステンレス鋼 E_{sp} には、Fig. 9 の①線に示される

Fig.6 Monthly variation of bacteria detected on Type 316 steel with E_{sp} attained in natural sea water.

Fig.8 Change in concentration of SO_4^{2-} and pH in *Thiobacillus thiooxidans* (A-SOB) and *T. thioparus* (N-SOB) solutions before and after the tests shown in Figures 7 and 10. The number beside each data point is density of bacteria in cells/ml.

ような pH 依存性¹³⁾が存在する。この図中に Fig. 7 の試験終了時点 A1 と A2 における到達電位と pH とを併せて (○) 印で記入すると、各 pH における E_{sp} は、①線のそれより 100～150 mV 程度低かった。これは A-SOB 培養液成分の影響によるのではないかと考え、培養液を pH 3 から 8 まで 1N NaOH で順に各 pH に調整し、1 時間ずつ 316 鋼試験片を浸漬した際の pH と到達 E_{sp} との関係を調べた。その結果を Fig. 9 の④線に示す。①線と傾きはほぼ同じであるが、全体的に 100～200 mV 卑化しており、この A-SOB 培養液でみられた卑化は培養液成分の影響と考えられる。同量の A-SOB を懸濁させたが初期 pH を異にする A1 と A2 の E_{sp} はともに、ほぼ④線に乗っていることから、 2.85×10^7 cells/ml *T. thiooxidans* 懸濁液でみられる E_{sp} は、A2 のそれを含めて pH 低下のみで説明でき、自然海水で従来観察してきた②、③線のような貴化効果には寄与しないと考えられる。

A2 における試験片付着バクテリア密度は、およそ 8×10^5 pg/cm² であり、これを Fig. 5 に参照すると、非ろ過・0.4 μ m ろ過のいずれの自然海水で達成される量より多い。すなわち、このように十分量のバクテリア密度をもっても上述のように“貴化なし”であったことから、このバクテリア単独で貴化を引き起こす可能性は低いと考えられる。

3.3.2 中性硫黄酸化細菌 *T. thioparus*

密度の異なる *T. thioparus* 懸濁液およびバクテリアを含まない培養液に浸漬した 304 鋼試験片の E_{sp} の経時変化を Fig. 10 に示す。高密度懸濁液では、およそ 1 週間で 400 mV vs. SCE という高い E_{sp} まで貴化したが、低密度懸濁液および培養液中では貴化しなかった。*T. thioparus* は、 $5S_2O_3^{2-} + H_2O + 4O_2 \rightarrow 5SO_4^{2-} + H_2SO_4 + 4S$ という反応¹²⁾にしたがって硫酸を生成するので、*T. thiooxidans* 同様、pH 低下による E_{sp} 貴化の

Fig.10 Time variation of E_{sp} for Type 304 steel in *Thiobacillus thioparus* solutions and the culture medium.

可能性がある。そこで、Fig.10 における試験終了時点 N1 と N2 それぞれの SO_4^{2-} 濃度と pH とを測定したところ、Fig. 8 に示すようにバクテリア密度が高いほど、生成した SO_4^{2-} 濃度は高く、同時に pH もより低下することがわかった。次に N1 と N2 それぞれの E_{sp} と pH を Fig. 9 に併せて (■) 印で記入した。N-SOB 用培養液中 E_{sp} の pH 依存性を示す⑤線は①線にほぼ重なる。バクテリア密度の低い N1 の E_{sp} はこれより卑であるが、バクテリア密度の高い N2 の E_{sp} は②線で示すバイオフィーム付着試験片に近い、高い値を示し、実際にもバイオフィームを認めた。すなわち、N2 でみられた E_{sp} の貴化には pH 低下効果に加えて、自然海水で従来観察してきたバイオフィーム類の寄与もあると思われる。

Fig.10 において 1.34×10^7 個/ml の *T. thioparus* 懸濁液中で、304 鋼試験片は大きな E_{sp} 貴化を示したが、これより一桁少ない 1.35×10^6 個/ml の *T. thioparus* 懸濁液中では貴化しなかった。後者の試験終了時のバクテリア付着密度は、LPS 値として 5×10^5 pg/cm² であった。Fig. 5 で示されるように、試験片の E_{sp} はバクテリア付着量が多いほど高いため、より高い到達 E_{sp} を示した 1.34×10^7 個/ml 懸濁液中では、さらに大きな付着密度になると予測される。 1.35×10^6 個/ml の *T. thioparus* 懸濁液中で試験片へ付着したバクテリア量は E_{sp} 貴化のなかった N1 で LPS 値として 5×10^5 pg/cm² であった。この値でも、Fig. 5 の結果に参照すると、自然海中では達成されない高密度であるので、もともとの懸濁量がひと桁多い N2 では付着密度はさらに高

Fig.9 Effect of pH in E_{sp} for samples in various solutions. The lines ①, ② and ③ denote the E_{sp} data by Reference No.1 for stainless steels.

いと推定される。したがって、*T. thioparus* は高密度であれば E_{sp} 貴化効果があるが、清水における自然海水浸漬下において、単独で貴化をひきおこす可能性は低く、他種バクテリアやその他の微生物の共存が必要であると考えられる。

3.4 バクテリア類と珪藻の共存効果

清水にて自然海水に浸漬した試験片上には、バクテリアのみならず、様々な微生物が付着するが、中でも珪藻は季節を問わず必ず付着しており、前報²⁾で示したように、バクテリア類と共存させることで、自然海水浸漬下で達成されるのと同様の大きな E_{sp} 貴化を再現できる。

珪藻のような微細藻類とバクテリアの間には、互いに他方に利益を与える「共生」のような関係や、栄養分などについて「競争」したり「拮抗」する関係などの、様々な相互作用が知られている¹⁴⁾。その中でも、微細藻類が光合成により生産した体外排出有機物 (EOC: extra-cellular released organic carbon) をバクテリアが好適な増殖基質として享受するという関係は、もっとも重要であるとされている¹⁵⁾。そこで Stage I²⁾における到達電位 ($E_{sp,I}$) を 70 mV vs. SCE にそろえることで、ほぼ同量のバクテリア類 (LPS 値として約 25,000 pg/cm²) を付着させたとき期待する試験片を、Stage II²⁾にて様々な密度の珪藻懸濁液に浸漬することで珪藻付着密度を変え、10 日後のバクテリア密度と到達電位 ($E_{sp,II}$) を調べた。結果を Fig.11 に示す。 $E_{sp,II}$ が 200 mV vs. SCE 程度までは、付着珪藻密度が増すほどバクテリア密度も高くなっており、珪藻がバクテリアの増殖に寄与していると考えられる。しかし、それ以上の $E_{sp,II}$ では、付着珪藻密度が増加しているにもかかわらず、バクテリア付着密度は約 3.5×10^4 pg/cm² の一定

Fig.11 Effect of attached diatom and bacteria on $E_{sp,II}$ attained at the end of Stage II test conducted in various concentration of diatom solution with an initial condition for bacteria as $E_{sp,I}$ of 70 mV or LPS of 2.5×10^4 pg/cm².

値にとどまっている。

次に、Stage I 処理時間を変えることで、 $E_{sp,I}$ 値に幅をもたせた試験片 ($E_{sp,I} = 19 \sim 73$ mV vs. SCE・LPS 値: 20,000 ~ 25,000 pg/cm²) を Stage II において Fig.11 と同様に様々な密度の珪藻懸濁液に浸漬した。試験終了時の $E_{sp,II}$ とバクテリア付着密度および珪藻付着密度の関係を Fig.12 に示す。この試験においてもバクテリア密度は約 3.5×10^4 pg/cm² を越えなかった。同じバクテリア密度で比較すると、珪藻付着密度が高いほど、 E_{sp} はより大きく貴化している。すなわち、珪藻の寄与が大きく、同 350 mV 以上には 15×10^3 cell/cm² の珪藻の付着が必要とよめる。

4. ま と め

(1) a) 自然海水または b) 0.4 μ m のフィルターでろ過することで生物としてはバクテリア類のみを含むと期待される海水、に浸漬した 316 鋼試験片の到達 E_{sp} とバクテリア付着量との関係を調査した。バクテリア類単独 b) でも約 200 mV vs. SCE までは貴化するが、400 mV vs. SCE という高い E_{sp} に達する貴化は a) に限られ、他の微生物の共存が必要であることがわかった。

(2) 自然海水中で貴化した 316 鋼試験片に付着したバクテリア類のうち、酸性および中性硫黄酸化細菌・硫酸塩還元細菌・鉄酸化細菌の調査をおこなった。鉄酸化細菌以外の細菌が検出され、特に中性硫黄酸化細菌が年間を通じて多かった。

(3) 酸性硫黄酸化細菌 *Thiobacillus thiooxidans* および中性硫黄酸化細菌 *T. thioparus* の E_{sp} 貴化可能性を調べた。前者は E_{sp} 貴化効果を認めなかった。後者は自然海水浸漬下で期待されるよりは著しく高いバクテリア量で一定の貴化効果を示したが、LPS 値として $2 \sim 3 \times 10^5$ pg/cm² 以下の通常量では有意な貴化効果

Fig.12 $E_{sp,II}$ in terms of attached bacteria and diatom attained at the end of Stage II test. The number beside each data point is $E_{sp,II}$ in mV vs. SCE.

を示さなかった。

(4) あらかじめ自然海水に短期間浸漬することでバクテリア類を付着させた試験片を、純粋培養した種々濃度の珪藻 (*Nitzschia* sp.B) 懸濁液に移して、後の到達電位 $E_{sp,II}$ に及ぼす付着バクテリア量 (LPS 値) と付着珪藻との影響を調べた。バクテリア量は、約 3.5×10^4 pg/cm² を越えず、200 mV 以上さらに 350 mV vs. SCE 以上の高い $E_{sp,II}$ に達するには、珪藻の寄与が必要ことがわかった。

本研究の自然海水浸漬に関し、東京商船大学清水臨海実験実習所を使用させていただきました。同学の鈴木揚之助教授・元田慎一助教授、および実験所的小林充氏に深く感謝致します。さらに本研究に熱心に協力された上山健一氏 (現在、東京大学大学院)、嶋田葵氏 (同、木下プロダクション)、川村久美子秘書に厚く感謝します。

(Manuscript received March 30, 1999 ;
in final form May 20, 1999)

文 献

- 1) 石原靖子, 元田慎一, 鈴木揚之助, 辻川茂男: 材料と環境, **44**, 355 (1995).
- 2) 石原靖子, 辻川茂男: 材料と環境, **47**, 260 (1998).
- 3) 門田 元, 多賀信夫編: 「海洋微生物研究法」, p. 43, 学会出版センター (1985).
- 4) 微生物生態研究会編: 「微生物の生態 10-微生物生態論の諸側面」, p.312, 学会出版センター (1982).
- 5) N. Lazaroff: *J. Bacteriol.*, **85**, 78 (1963).
- 6) J. H. Tuttle and H. W. Jannasch: *Limnol. Oceanogr.*, **17**, 532 (1972).
- 7) 土壤微生物研究会編: 「土壤微生物研究法」, p. 312, 養賢堂 (1992).
- 8) R. C. Tilton, G. J. Stewart and G. E. Tones: *Can. J. Microbiol.*, **13**, 1529 (1967).
- 9) M. Eashwar, S. Maruthamuthu and Balakrishnan: *Indian J. Mar. Sci.*, **19**, 107 (1990).
- 10) R. C. Tilton, A. B. Cobet and G. E. Jones: *Can. J. Microbiol.*, **13**, 1521 (1967).
- 11) F. W. Adair and K. Gundersen: *Can. J. Microbiol.*, **15**, 345 (1969).
- 12) R. キャンベル: 「基礎微生物学 5 微生物生態学」, p.82, 培風館 (1985).
- 13) 中山元, 福田敬則, 明石正恒: 「腐食防食' 93 講演集」, p.415 (1993).
- 14) 清水 潮編: 「微生物の共生系〈微生物の生態 21〉」, p. 1, 学会出版センター (1995).
- 15) 清水 潮編: 「海洋微生物とバイオテクノロジー」, p.256, 技報堂出版 (1991).
- 16) 門田 元・多賀信夫編: 「海洋微生物研究法」, p. 120, 学会出版センター (1985).