自然海水中に浸漬した SUS 316 L 表面における生物皮膜の形成*

鷲頭直樹**, 升田博之**

** 金属材料技術研究所

Formation of Biofilm on SUS 316 L Exposed to Natural Seawater*

Naoki Washizu** and Hiroyuki Masuda**

** National Research Institute for Metals

One of major causes of microbially influenced corrosion of stainless steels in marine environment is formation of biofilms on the surfaces by microorganisms. It has been known that the corrosion potential of stainless steel exposed to natural seawater is ennobled and that a biofilm formed on a metallic surface is thickening and structurally heterogeneous with the passage of exposure time. In this paper, we intend to discuss the relation between structural characteristics of biofilms formed on SUS 316 L in natural seawater and the exposure time.

Test pieces of SUS 316 L were exposed to natural seawater for 3 days-60 days. Open-circuit potentials of test pieces in natural seawater were measured and biofilms on test pieces were observed with Atomic Force Microscope (AFM) in natural seawater. The thicknesses of biofilms were measured by the *in-situ* observation with AFM. Then test pieces were dried and observed with an optical microscope, a laser microscope and AFM in the atmosphere.

Open-circuit potentials were ennobled and the biofilms in seawater thickened as the exposure time passed. The biofilms were growing partially and the major species in the biofilms shifted from bacteria to diatoms with the passage of exposure time.

It is concluded that thickening of biofilms on SUS 316 L causes ennoblement of potentials in natural seawater and that biofilms become more heterogeneous with diatoms on the surfaces.

Key words : microbially influenced corrosion, biofilms, natural seawater, SUS 316 L, thickness, heterogeneity

1. 緒 言

自然界には多種多様な微生物が存在しており、それらは周囲の環境から影響を受けるのみならず、それらの代謝作用が外部に対して影響を与えている。このような微生物の活動が要因となって材料が劣化する場合があり、微生物腐食はこれらの一例として知られている¹⁾。微生物腐食は土壌中²⁾、淡水中^{3),4)}、海水中^{5),6)}さらには大気中⁷⁾においても発生し、材料面でも金属材料のみならず無機材料⁸⁾や有機高分子材料の劣化⁹⁾に関する報告がなされている。また、金属材料の中でも耐食性材料として使用されるステンレス鋼が微生物の作用によって腐食を被ることが知られている^{10),11)}。海水中は種々の微生物が数多く生息しており、さらに塩化物イオンが存在するので金属材料の微生物腐食が発生しやすい条件である。ステンレス鋼に関しても海洋環境中、微生物存在下で腐食損傷が認められる場合があり、表面に微生物が付着し生物皮膜が形成されることによって腐食電位が貴化し、局部腐食が発生しやすい状態が作られることが知られている^{12),13)}。

生物皮膜は微生物由来の有機高分子物質からなり、これらは水を多く含んでいる。一般に生物皮膜を形成する物質の80%以上は水であるとされている。また、皮膜

内には微生物が高密度で、かつ移動しない状態で存在している¹⁴⁾。微生物の付着の形態は、まず有機物の膜が表面上に形成され、次いで微生物が付着および増殖し、それらが代謝した粘性物質等によって生物膜が形成される¹⁵⁾。時間が経過するに従って生物皮膜の厚さは増加するとともに、構造的に不均一化し微生物が密集した部分とほとんど膜が存在しない部分とが混在するようになる¹⁶⁾。

本研究は海水中における生物皮膜の形成ならびに成長が、ステンレス鋼の微生物腐食へ及ぼす影響について、知見を得ることを目的としている。具体的には、ステンレス鋼の中でも耐食性と費用の面との兼ね合いから、海洋環境において使用される機会が多いSUS 316 Lを自然海水中に浸漬し、表面に形成された生物皮膜の厚さおよび形状を調べ、特に以下の点に関して詳細に検討する。

- 1) 浸漬時間の経過にともなう生物皮膜の厚さの変化と自然浸漬電位の変化との関係
- 2) 浸漬時間の経過にともなう生物皮膜の形状、均一性および皮膜中の生物種の変化

2. 実 験 方 法

2.1 試験片の浸漬

化学成分をTable 1に示した市販のSUS 316 Lを、20×20×2 mm³の大きさに切り出し、表面をエメリー紙で# 600まで湿式研磨した。この試験片をFig. 1に示したように4 dm³の自然海水を入れた縦310 mm、横

* 第46回材料と環境討論会(福岡, 1999年)で発表

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

Table 1 Chemical composition of SUS 316 L (mass%).

C	Si	Mn	P	S	Ni
0.018	0.63	0.76	0.031	0.001	12.22
Cr	Mo	N	Al	O	
17.60	2.22	0.009	0.006	0.002

Fig. 1 Apparatus for exposure test.

220 mm, 深さ 200 mm の樹脂製の槽の底面から 10 mm, 水面から 55 mm の位置に浸漬した。さらにこの槽全体を直径 50 mm, 回転数 40 rpm でロータリー震とうさせた。浸漬中は 10 時間連続して水面の上方 0.4 m の位置に設置した太陽光ランプ (ワコム電創: KXW-75 WD) で水面に光を照射した。その後の 14 時間は暗所条件とし, さらに次の 10 時間は再びランプによって光を照射するという操作を 1 日周期で繰り返した。また, 海水は 7 日ごとにすべて採取直後のものと取り換えた。ただし, 試験片および槽の洗浄は行わなかった。

2.2 自然浸漬電位の測定

浸漬開始から 3 日後, 6 日後, 15 日後, 20 日後, 30 日後および 60 日後に, 自然海水中における試験片の自然浸漬電位の測定を行った。その後, 試験片表面に対して流水での洗浄, 樹脂製ブラシでの擦り洗い, エメリー研磨の 3 種の処理を行い, それぞれの処理直後に試験片を再び自然海水中に戻し, さらにその 2 時間後に自然浸漬電位を測定した。電位測定の際の参照極には濃度 $1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ の KCl 水溶液を内部液とした Ag/AgCl 電極を用いた。電位測定中においても 2.1 で用いた太陽光ランプで, 海水および試験片全体に光を照射した。

2.3 表面観察

電位測定後ただちに, 試験片表面を海水中において原子間力顕微鏡 (Atomic Force Microscope, 以下 AFM と呼ぶ) で観察した。今回使用した AFM (セイコー電子工業: SPI 3700) は探針を高さ方向に振動させることによって, 試験片表面へ与える衝撃を低減させる機能を持っており, 探針の振幅および振動中心の高さ方向での

Fig. 2 Relation between center of tip vibration and scanning point observing metal surface or film surface.

位置を独立に変化させることができる。振幅が大きいほど, また振動中心が試験片表面に近いほど表面に加わる衝撃力は大きくなる。この性質を利用すると, 探針の振動中心の位置を低く設定することによって, 金属表面上に存在する水中の生物皮膜のような変形しやすい物体は探針によって貫通され, 硬い金属素地が観察される。一方, 振動中心の位置を高く設定すると, 金属表面上に存在する生物皮膜を観察することができる。この現象をモデル化して示したものが Fig. 2 である。自然海水中におけるその場観察では, 探針の振動中心の高さを変化させて金属表面および生物皮膜表面をそれぞれ観察し, それによって生物皮膜の厚さを求めた。

海水中における観察終了後, 試験片を乾燥させ表面を光学顕微鏡, レーザー顕微鏡および AFM を用いて室温大気中で観察した。

3. 実験結果および考察

3.1 生物皮膜の成長

Fig. 3 に浸漬開始後 3 日間における試験片の, 海水中での AFM 観察像を示す。探針を X 方向に起点から終点まで走査した後, Y 方向に 1 線分移動して再び X 方向に走査するという動作を反復することによって像を得ている。走査線の数, 1 画像あたり 256 本である。観察開始から図中に示した A 点までは, 探針の振動中心の位置を低く設定し試験片表面に加わる衝撃力が強い状態で走査した。この状態では研磨傷が明確に観察されていたので, 探針は金属表面を走査していたと判断できる。図中の A 点から探針の振動中心の位置を徐々に高くしていくと, しばらくは像に変化は見られなかったが, B 点において走査位置が急激に約 $0.5 \mu\text{m}$ 上昇し, この状態を維持したままでも走査が続いた。ここからさらに振動中心の位置を上昇させても, 金属表面から約 $0.5 \mu\text{m}$ 離れた状態での走査が続いた。また, 逆に C 点から振動中心の位置を下げていくと, D 点において探針は再び金属表面の走査へと移行した。以上の結果から, 金属表面には厚さ約 $0.5 \mu\text{m}$ の比較的均一な生物皮膜が形成されていたと考えられる。

同様の観察手法を適用して, 浸漬開始から 6 日後, 15 日後および 20 日後における生物皮膜の厚さを求め, それらの値と浸漬時間との関係を Fig. 4 に示す。時間が

Fig. 3 AFM image of SUS 316 L exposed to natural seawater for 3 days observed in natural seawater.
A-C : Center of tip vibration was moved upward.
B-D : Biofilm was observed.
C- : Center of tip vibration was moved downward.

Fig. 4 Thickening of biofilm on SUS 316 L exposed to natural seawater.

経過するに従って皮膜の平均厚さは増加していた。また、厚さの増加は初期においては穏やかであったが、時間の経過とともに速くなった。

浸漬開始後 20 日間の試験片表面に存在した生物皮膜を海水中において AFM 観察した結果を Fig. 5 に示す。Fig. 3 に示した浸漬開始から 3 日後の生物皮膜と異なり、場所によって皮膜の厚さに大きな差が認められた。この結果は、浸漬時間の経過とともに生物皮膜の物理的不均一化が、海水中で実際に進行していることを示している。

3.2 自然浸漬電位の変化

Fig. 6 に自然浸漬電位の経時変化を示す。ただし、電位値は文献に従い対標準水素電極の値に換算したものである¹⁷⁾。浸漬開始から 6 日後までは急激に電位が上昇しているが、15 日後に +300 mV に達して以降は電位の上昇は鈍くなった。最終的には 60 日後に +350 mV の値となった。試験片を流水で洗浄後の自然浸漬電位は +240 mV、ブラシで擦り洗後は +90 mV、エメリー研磨後は 0 mV の値をそれぞれ示した。この事実は、各種の洗浄処理を施したことによって生物皮膜が段階的に除去され、その結果自然浸漬電位が低下したと説明でき

Fig. 5 AFM image of SUS 316 L exposed to natural seawater for 20 days observed in natural seawater.

Fig. 6 Variation of open-circuit potential in natural seawater as a function of exposure time and washing treatment.

る。このことを考慮すると、浸漬時間の経過とともに自然浸漬電位の上昇は、生物皮膜の成長によるところが大きいと言える。

しかしながら、電位の値は明石¹¹⁾、天谷ら¹²⁾および石原ら¹³⁾の報告における 450~700 mV vs. SHE に比較して低くとどまる結果となった。この原因としては、海水の交換周期が 1 週間であるため水質が劣化し、その結果微生物の活動が抑制されたことが予想できる。したがって、絶えず新鮮な海水が供給される条件下での浸漬試験が不可欠であり、現在これを実施するために準備中である。

3.3 乾燥後の生物皮膜の観察

Fig. 7 は 6 日間浸漬後に乾燥させた試験片表面を大気中で AFM 観察した結果である。大部分の領域では研磨傷が認められたが、部分的に最大約 1 μm 程度の厚さの付着物が存在していた。この約 1 μm という値は Fig. 4 で示した浸漬後 6 日間の海水中において観察された生物皮膜の厚さとほぼ一致する。また、浸漬時間 6 日間における特徴的な付着物は、多数見られた大きさ約 1 μm の球状の物体であり、これらは細菌の一種であると考えられる。

Fig. 7 AFM image of SUS 316 L exposed to natural seawater for 6 days observed in atmosphere.

Fig. 8 Optical micrograph of SUS 316 L exposed to natural seawater for 30 days observed in atmosphere.

30日間浸漬した試験片を乾燥させ、表面を光学顕微鏡で観察した結果を Fig. 8 に示す。金属表面は光の反射率が高いため明るく、付着物は暗く観察されていた。大部分の領域では厚い付着物が存在しないために、研磨傷が残る金属表面が観察された。同じ試験片表面において付着物が存在した部分をレーザー顕微鏡で観察した結果を Fig. 9 に示す。レーザー顕微鏡写真においても光の反射率の高い部分は明るく、反射率の低い部分は暗く観察された。付着物に見られた特徴は、長さ30~40 μm の紡錘形の珪藻類と思われる物体が、密集した状態で多数存在していたことである。Fig. 7 に示したように浸漬時間6日間での特徴的な付着物が大きさ1 μm の細菌であったことと対比すると、生物皮膜を構成する生物種は浸漬時間の経過とともに変化していくことがわかる。Fig. 9 の観察領域において高さ情報を求めたところ、付着物の最大厚さは約20 μm であった。付着物の厚い部分をAFMで大気中観察した結果が Fig. 10 である。Fig. 10(a) に示したように、付着物の厚い部分では Fig. 9 のレーザー顕微鏡写真において見られたのと同様に、珪藻が密集して存在しているのが認められた。また、珪藻はそれらの周囲に付着していた物質に埋もれた状態で存在していた。同じ観察領域を、探針の振動中心位置を低く設定し、皮膜表面に加わる衝撃力がより大きい状態で観察した結果が Fig. 10(b) である。珪藻自体の

Fig. 9 Laser micrograph of thick film on SUS 316 L exposed to natural seawater for 30 days observed in atmosphere.

Fig. 10 AFM images of thick film on SUS 316 L exposed to natural seawater for 30 days observed in atmosphere.

- (a) : Center of tip vibration was higher than (b).
(b) : Center of tip vibration was lower than (a).

像に変化は認められなかったが、珪藻の周囲に存在した物質の厚さは、Fig. 10(a)で観察された結果と比較して薄く観察され、部分的には金属素地が観察されていた。この事実は、珪藻の周囲に存在した物質が探針からの衝撃によって変形したことを示している。したがって、これらは軟質な物質であり、微生物が代謝した粘性物質が半乾燥したものであると考えられる。いっぽうで、Fig. 11 に示したように珪藻類や粘性物質が乾燥したと思われる物体が認められず、金属表面の下地形状がほぼ完全に残っている部分も存在した。以上の結果から、浸漬時間30日においては生物皮膜中に珪藻が目立ち、珪藻が密集して存在する部分に粘性物質も多く存在すると考えられる。また、これらの粘性物質が表面を覆うことによ

Fig. 11 AFM image of thin film on SUS 316 L exposed to natural seawater for 30 days observed in atmosphere.

って、微生物が生成した腐食を促進する物質の拡散が制限されると考えられる。このような生物皮膜の構造的特徴がひとつの要因となって、微生物が密集して存在する部分が選択的に腐食損傷を被ると予想される。

60日間浸漬した試験片表面のレーザー顕微鏡写真をFig. 12に示す。明らかに付着物が存在していた面は全体の約2/3であり30日間浸漬した場合より増加していたが、いまだに金属表面がほぼ露出した部分も存在した。付着物中には30日間浸漬の場合と同様に、珪藻が密集して存在していた。また、付着物の最大厚さは約50 μmであり、30日間浸漬の場合の約2倍の値となった。以上の結果から、生物皮膜は均一に成長するのではなく、一旦厚く付着した部分が選択的に成長すると考えられる。この時、付着面積が増加する方向に成長するのみならず、高さ方向にも浸漬時間にほぼ比例する速度で成長する。このため、皮膜の厚い部分はさらに厚さを増すのに対し、金属表面が露出した部分には皮膜が形成されにくいという結果をまねいたと考えられる。

4. 結 論

自然海水中に浸漬したSUS 316 L試験片表面に形成された生物皮膜に対し、AFMによるその場観察、大気中における各種観察を行い、さらに試験片の自然浸漬電位を測定したことによって以下の結論を得た。

- 1) 浸漬時間が経過するに従って海水中における生物皮膜の厚さが増大し、これが要因となって自然浸漬電位が上昇する。
- 2) 浸漬時間の経過とともに生物皮膜は不均一化し、厚い部分が選択的に成長する。さらに皮膜中における付着微生物の中で細菌が支配的であった初期の状態から、珪藻が多く存在する段階に達すると不均一化はより一層顕著化し、珪藻と粘性物質が密集した状態で偏在する傾向がある。

Fig. 12 Laser micrograph of SUS 316 L exposed to natural seawater for 60 days observed in atmosphere.

参 考 文 献

- 1) 佐々木英次 (H. Sasaki): 材料と環境 [Zairyo-to-Kankyo (Corros. Eng.)], 46, 475 (1997).
- 2) 梶山文夫 (F. Kajiya): 材料と環境 [Zairyo-to-Kankyo (Corros. Eng.)], 46, 491 (1997).
- 3) 西川正三: 溶接学会誌, 64, 258 (1995).
- 4) 菊地靖志, 塔本健次, 金丸 剛, 坂根 健 (Y. Kikuchi, K. Tomoto, T. Kanemaru and T. Sakane): 材料と環境 [Zairyo-to-Kankyo (Corros. Eng.)], 47, 468 (1998).
- 5) 天谷 尚, 幸 英昭: 溶接学会誌, 64, 146 (1995).
- 6) 石原靖子, 元田慎一, 鈴木揚之助, 辻川茂男 (Y. Ishihara, S. Motoda, Y. Suzuki and S. Tsujikawa): 材料と環境 [Zairyo-to-Kankyo (Corros. Eng.)], 44, 355 (1995).
- 7) 井上真由美: 金属, 61 [11] 48 (1991).
- 8) Th. Warscheid and W. E. Krumbein: "Microbially Influenced Corrosion of Materials", Ed. By E. Heitz, H. -C. Flemming and W. Sand, p.273, Springer-Verlag (1996).
- 9) 青山 恵, 梶山文夫 (M. Aoyama and F. Kajiya): 第114回腐食防食シンポジウム資料 (114th JSCE Symp.), p.35, 腐食防食協会 (JSCE) (1997).
- 10) 菊地靖志, 塔本健次, 岡山智豪, 松田福久ら: 日本金属学会誌, 61, 486 (1997).
- 11) 明石正恒 (M. Akashi): 第114回腐食防食シンポジウム資料 (114th JSCE Symp.), p.109, 腐食防食協会 (JSCE) (1997).
- 12) 天谷 尚, 幸 英昭 (H. Amaya and H. Miyuki): 材料と環境 [Zairyo-to-Kankyo (Corros. Eng.)], 46, 481 (1997).
- 13) 石原靖子, 辻川茂男 (Y. Ishihara and S. Tsujikawa): 材料と環境 [Zairyo-to-Kankyo (Corros. Eng.)], 48, 520 (1999).
- 14) H. -C. Flemming and G. Schaule: "Microbially Influenced Corrosion of Materials", Ed. By E. Heitz, H. -C. Flemming and W. Sand, p.39, Springer-Verlag (1996).
- 15) K. Xu, S. C. Dexter and G. W. Luther III: Corrosion, 54, 814 (1998).
- 16) S. C. Dexter and J. P. LaFontaine: Corrosion, 54, 851 (1998).
- 17) 伊藤伍郎: 「腐食科学と防食技術」, p.47, コロナ社 (1979).

(Manuscript received November 29, 1999 ; in final form February 14, 2000)