地下水中の好・嫌気性菌による SUS304L および SUS316L 鋼溶接部の微生物誘起腐食 (第二報) —好・嫌気性菌の役割—

菊地 靖志*・小澤 正義*²・塔本 健次*・大西 秀人*³
坂根 健*⁴・安斉 敏雄*⁵

Microbiologically Influenced Corrosion of SUS304L and SUS316L Welds Caused
by Aerobic and Anaerobic Bacteria in Groundwater (II)
—A Role of Aerobic and Anaerobic Bacteria—

Yasushi KIKUCHI, Masayoshi OZAWA, Kenji TOHMOTO, Hideto ONISHI, Takeshi SAKANE and Toshio ANZAI

Synopsis : Microbiologically influenced corrosion was suspected in a corrosion failure of stainless steel (SUS316L) piping, carrying saline groundwater. Laboratory simulation studies were planned to find out the mechanism of the corrosion. Culturing of bacteria strains in the ground water revealed 7 different species. Six of them were aerobic and one of them was anaerobic microbe that is Sulfate Reducing Bacteria (*Desulfovibrio* sp.). They were incubated separately in liquid medium and exposure studies were conducted. Formation of biofilm on SUS316L coupons was observed when they were exposed to the test solution with *Comamonas* sp., *Sphingomonas* sp., *Agrobacterium* sp., and *Desulfovibrio* sp. Pitting corrosion sites were observed on SUS316L coupons exposed in *Desulfovibrio* sp. inoculated solution. Corrosion potential of SUS316L coupons became noble when they exposed to the solution with Nutrient broth (NB). When SUS316L coupons exposed to the solution without NB and the sterile solution, the increasing of corrosion potential was not seen. The corrosion potential decreased when exposed to the aerobic microbes inoculated solution. However, in case of *Desulfovibrio* sp. inoculated solution, it stagnated in early stages, and increased after that. It was thought from the above result that *Desulfovibrio* sp. with aerobic microbes that are able to formed biofilm could influence this MIC.

Key words: MIC; SUS316L; bacteria; SRB; *Desulfovibrio* sp.

1. 緒言

著者らは臨海部に建設された LNG 貯槽の付属配管溶接部 (SUS316L 製) で発生した地下水の漏洩事故について事例解析を行い、それに基づく研究室レベルの再現実験を実施した。そして漏洩の原因となった微生物の種類とその役割に焦点を当てた系統的な検討を行っている。第1報¹⁾では主に次の点を明らかにした。(1) 受け入れままの地下水とそれを滅菌した地下水を用いて腐食実験を行い、比較した結果、後者では腐食が発生せず、この腐食には微生物が関与していること。(2) 微生物の活性度が低いと腐食は発生しにくいこと。(3) 腐食が発生する場合には、試料を浸漬させた地下水で自然電位の貴化現象があること。(4) 溶接金属部ではスケルトン状の腐食形態が観

察されたこと、などである。それらの結果を考慮し、本事例は微生物誘起腐食(MIC)と判断した。

本論文では事例地下水中の構成微生物の種類と役割に注目し、解析した結果について述べる。すなわち、地下水中の微生物を培養して単離した。次に、単離した微生物をそれぞれ生物学的手法で種を特定し、腐食の原因となった微生物の性質を検討した。さらに、それらの微生物のステンレス鋼に対する腐食発生の感受性の強弱を検討した。このようにして本事例の腐食発生の原因微生物を特定し、腐食過程について考察した内容を述べる。

平成 14 年 2 月 14 日受付 平成 14 年 6 月 23 日受理 (Received on Feb. 14, 2002; Accepted on June 23, 2002)

* 大阪大学接合科学研究所 (Joining and Welding Research Institute, Osaka University)

* 2 大阪大学接合科学研究所 (現: (財) 発電設備技術検査協会) (Joining and Welding Research Institute, Osaka University, now Japan Power Engineering and Inspection Corp., 1370-1 Nishihara Tarasaki Hitachinaka 312-0003)

* 3 大阪大学大学院生 (現: (株) 荏原製作所) (Graduate Student, Osaka University, now Ebara Corp.)

* 4 武田薬品工業 (株) 開拓第4研究所 (Takeda Chemical Industries, Ltd.)

* 5 (株) 高田工業所 (Takada Corp.)

2. 実験方法

2.1 供試液の調整

試料の浸漬実験には2種類の水を用いた。すなわち事例地下水と、それをオートクレーブを用いて394K-15minの条件で滅菌した地下水（以下、滅菌地下水とする）である。両地下水には0.01% Nutrient Broth（以下、Difco社製、NBとする）を添加した。さらに地下水から単離した微生物を滅菌地下水に接種した供試液を調整して用いた。NBは肉エキス成分を主体とした微生物の培養剤である。地下水の化学成分は前報¹⁾に示す通りである。

2.2 供試材料

SUS316L 板材($t=4$ mm)を試験材に用いた。溶接部はTIG溶接法によりビードオンプレート方式で作成した。そこから、溶接金属 (WM) および熱影響部 (HAZ) の試験片を得た。表面は溶接ままおよびエメリー紙#1000（一部0.25 μ ダイヤモンド研磨）仕上げとした。それらを20×10 mmの試験片に加工し、その表面以外を接着剤で被覆したものを浸漬用に用いた。

2.3 浸漬実験

滅菌済みの三角フラスコ（容量200 ml）に事例地下水から単離したそれぞれの菌を接種した供試液を入れ、その中に前述の試験片を浸漬した。試験環境は、好気的環境ならびに窒素を吹込み脱気した嫌気的環境とした。温度は事例条件に合わせて293K（20℃）一定とし、最長40日間保持した。微生物の活性維持のため15日ごとに溶液の半量を新しい溶液と交換した。その間、試験片の自然電位変化および溶液のpH変化を測定した。浸漬後の試験片の表面を走査型電顕 (SEM) により調べた。

2.4 構成微生物の観察と特定

2.4.1 微生物の単離

好気性微生物（菌）の単離には線引き平板法を用いた²⁾。使用した寒天培地の化学成分をTable 1に示す。地下水を同培地表面に塗抹し、298Kで10ks保持した。発生したコロニーから色、大きさなどが異なるものをそれぞれ新しい寒天培地に塗抹して単離した。なお、嫌気性菌の確認と単離には混合希釈法³⁾を用いた。Table 1の液体培地に地下水を混合し、段階的に数回希釈する。培地を固化させ、空気が接触しないように栓をして、298Kで10ks保持して寒天中に分離したコロニーを得た。嫌気性菌では硫酸塩還元菌が多数のMIC事例で報告されているので、この菌を確認して単離した。Table 2に示した硫酸塩還元菌用の液体培地³⁾を作り、地下水を接種した。298Kで10ks保持し、黒色の硫化鉄沈殿物の生成の有無により存在の有無を判断した。前述した方法で単離した菌は生物顕微鏡（1000倍）によって観察し、形態の差を確認した。

2.4.2 単離微生物の特定

前述した方法で単離した菌を（財）発酵研究所・大阪に

Table 1. Composition of culture medium for anaerobic bacteria.

Nutrient Broth	3g
(NH ₄) ₂ Fe(SO ₄) ₂ ·6H ₂ O	0.1g
Artificial sea water	1000ml
Agar	20g

Table 2. Composition of culture for sulfate reducing bacteria.

Nutrient Broth	3g
Na-lactate	5g
MgSO ₄	1.5g
Na ₂ SO ₄	1.5g
KH ₂ SO ₄	0.5g
(NH ₄) ₂ Fe(SO ₄) ₂ ·6H ₂ O	0.1g
Distilled water	1000ml
NaCl	25g
pH	7.2

て種を特定した。

2.4.3 単離微生物の増殖試験

前報¹⁾での結果より、供試液中の微生物の活性度が高いことが腐食発生の重要な条件であることがわかった。そこで供試液中におけるそれぞれの生菌数の経時変化を測定した。試験は0.01% NBを含む滅菌地下水200 mlに単離された微生物を接種し、293Kに保持した。好気性菌は振とう培養で、嫌気性菌は窒素ガスを吹込み脱気し、静置状態で培養した。生菌数は好気性菌では平板培養法で、嫌気性菌では希釈法を用いた³⁾。すなわち、単離菌を接種した液から1 ml採取し、これを液体培地の入った試験管に混合して10倍に希釈する。次に約1/10量を第2試験管に接種する。同様の操作を4~9回行って希釈した後、全試験管に窒素ガスを吹込み封入用栓施栓後、293Kで20ks保持し、コロニーの生成状況から生菌数を求めた。各段階の希釈液は5本用意し、Taylor表³⁾より1 ml中の生菌数を求めた。なお、この場合単位はmpn (most probable number)/mlで示される。

3. 実験結果

3.1 事例地下水中の構成微生物とその特徴

2.4項で述べた方法で単離したコロニーから少量採取し、生物顕微鏡で形態などの特徴を調べた。一方、コロニーの一部を採取し寒天培地へ再び接種して純粋分離した微生物を特定に用いた。Fig. 1に光学顕微鏡観察結果を示す。独立して形成されたコロニーから得られたもので、形態は球状、桿状および糸状のものが認められる。これらにA~Jと記号を付け、形態学および生理学的性状、すなわち細胞形態、グラム染色性、運動性、コロニーの色および食塩要求性その他を調べた。グラム染色性では、A, G, およびI菌が陽性で、その他は陰性であった。運動性はA, B, C, EおよびH菌で認められたが、他は示さなかった。その他、分類学的な検討の上種を特定した。その結果を

Table 3に示す。同種のものも含まれており、7種の微生物が特定された。このなかでA~I菌は好気性菌であり、Jのみが嫌気性菌で硫酸塩還元菌であった。次に、0.01% NBを含む滅菌地下水を用いてTable 3の単離菌について増殖実験を行った。Fig. 2に生菌数と培養時間との関係を示す。

Fig. 1. Photographs of bacteria in the groundwater.

B菌(*Comamonas* sp.), C, F, H菌(*Sphingomonas* sp.), D, E菌(*Agrobacterium* sp.), およびJ菌(*Desulfovibrio* sp.) は約10日までは良好に増殖し、 10^7 (cfu/ml, mpn/ml) のレベルを維持した。A菌(*Bacillus* sp.) はやや少なく、 $10^5 \sim 10^6$ (cfu/ml) にとどまった。一方、G菌(*Micrococcus* sp.), I菌(*Staphylococcus* sp.) はこの環境が生存に適していないと考えられ、徐々に死滅に向かうことがわかった。したがってGおよびI菌が腐食に直接影響することは考えにくいと判断し、以後の実験からは除いた。図中の破線は液の半量を新しいものに交換したことを示す。残りの菌を用いてステンレス鋼の腐食試験を行った。

3.2 単離菌培養滅菌地下水中の316L鋼溶接部の腐食

NBを0.01%含む滅菌地下水にA(*Bacillus* sp.), B(*Comamonas* sp.), C, F, H(*Sphingomonas* sp.), D(*Agrobacterium* sp.), およびJ(*Desulfovibrio* sp.) をそれぞれ接種した菌液を、三角フラスコに200 ml採り、その中に溶接金属(WM), 熱影響部(HAZ) および母材から成る試験片を浸漬して40日間保持した。フラスコから取り出した試験片はアセトン中で超音波洗浄し、乾燥後、走査型電子顕微鏡(SEM)を用いて観察した。表面に付着した生成物はEDX分析を行った。

Fig. 3に、好気性菌を接種した溶液に母材を40日間浸漬した後の表面観察結果を示す。滅菌地下水では当然ながら表面に付着も腐食も発生していない。しかし、菌が接種された溶液中では、すべての菌種でコロニーの形成や付着の跡と代謝生成物の付着が認められ、菌は活発に活動してい

Table 3. Genus name of A-J bacteria.

A	<i>Bacillus</i> sp.
B	<i>Comamonas</i> sp.
C, F, H	<i>Sphingomonas</i> sp.
D, E	<i>Agrobacterium</i> sp.
G	<i>Micrococcus</i> sp.
I	<i>Staphylococcus</i> sp.
J	<i>Desulfovibrio</i> sp.

Fig. 2. Variation of colony forming units (A-I) and most probable number in bacterial solution as a function of time.

Fig. 3. SEM micrographs of surface condition on SUS316L base metal after 40 d exposure test in each aerobic bacterial solution.

たとえられる。付着の跡と考えられる変色部は見られるが、まだ腐食を発生するまでには至っていない。

記号B菌およびC菌の表面付着物のEDX分析結果をFig. 4に示す。B菌からSi, Pが確認され、C菌からはそれ以外にMg, Caなどが検出された。C菌は海水要求をもつことから、Ca, Mgは海水成分からのものと考えている。したがって、Si, P, Mg, およびCaは菌の代謝と関係するものと推定される。このようなフィルム状やコロニー状の生成物が表面に形成されると、その下部では酸素の供給がなくなる可能性があり、ステンレス鋼表面の再不働態化の障害となることが考えられる。

次に、嫌気性菌のJ菌を接種した溶液に母材を15日および40日間浸漬した後の表面観察結果をFig. 5に示す。15日

間の浸漬では腐食は認められなかったが、コロニーなどの付着が認められる。一方、40日間の浸漬では、浅くではあるがpitが発生していた。矢印はそこに確認された菌を示す。

Fig. 6に、J菌の生成物をEDX分析した結果を示す。Sの強度が大きい、このような結果は硫酸塩還元菌が関与した腐食にしばしば見られるもので、鉄の硫化鉄の存在を示すと考えられる。

溶接金属の試験片を浸漬した場合、前述の好気性菌を接種した溶液中では母材と同様40日間では腐食は認められなかった。一方、嫌気性のJ菌の場合は、Fig. 7(a)に示すように、腐食が発生することがわかった。表面にはフィルム状の菌膜や腐食生成物の付着が同時に見られる。この場合は明瞭なスケルトン状の腐食形態までには至っていない。HAZ部の試料を用いた場合でも、Fig. 7(b)に示すように、同様の結果が得られた。

以上の結果より、本腐食の原因は以下のように考えられる。すなわち、各好気性菌が試料表面に付着し、そこで増殖し菌膜が形成されるが、その内部は嫌気性環境となる。そこで、嫌気性菌（この場合J）が増殖し、活発な代謝反応で腐食が発生した。

3.3 生菌数、pHおよび自然電位の経時変化

好気性菌および嫌気性菌の生菌数変化は浸漬（0.01% NB+滅菌地下水+ステンレス鋼）開始から約7~10日経過して対数増殖期から定常期に入り、 $10^5 \sim 10^7$ (cfu/ml)のレベルを試験期間中維持した。このような変化過程は一般の微生物の増殖曲線と同様の傾向を示していた。pHも測定したが、各液とも大きな変化はなく初期値約7.0から7.5の間にあり、ほぼ中性であった。

次に自然電位変化をFig. 8に示す。まず(a)の好気性菌の結果について述べると、滅菌地下水(▲)では浸漬開始時約-210 mv (vs. Ag/AgCl) からほとんど変化しない。菌を接種した場合、A菌を除いて最大約40 mvの卑化が見られた。一方、(b)に示す嫌気性菌では大きな変化があった。すなわち、滅菌地下水では当然ながら電位変動はわずかである。菌を接種したものは約2週間ほぼ一定値 (-550~-570 mv (vs. Ag/AgCl)) を示すが、それを過ぎると貴化現象が観察され、約40日経過すると約-370~-390 mv (vs. Ag/AgCl)) に達することがわかった。

4. 考察

前述したように事例地下水中の構成微生物を好気性と嫌気性菌とに区別して、その腐食挙動への影響を研究室レベルでの再現実験手法で調べた。その結果、嫌気性菌（本実験では硫酸塩還元菌）がステンレス鋼の腐食に強い関連があることが判明した。以下にそれぞれの菌の役割について検討する。

Fig. 4. SEM micrographs and EDX analysis of biofilms on SUS316L base metal after 40 d exposure test in strain-B and C inoculated solution.

Fig. 5. SEM micrographs of surface condition on SUS316L base metal after 40 d exposure test in strain-J inoculated solution.

4・1 試験片表面への微生物の付着と自然電位の経時変化

浸漬試験後の表面をSEMで観察すると、微生物とその代謝生成物などの付着が見られた。それはFig. 3およびFig. 6に示した通りである。このような付着は試験片の自然電位変化に影響することが知られている。石原ら^{4,5)}はステンレス鋼と各種の微生物を組合せ、好気的条件下での研究で経時的な電位変化現象を詳細に検討している。それによると浸漬時間が長く、微生物の付着量が増加すると貴化しやすいことなどを示している。また、表面への付着面積率も重要な因子となり、その増加は貴化を促進する報告

もある^{6,7)}。

本実験では次の3条件の地下水を用いて浸漬実験を実施した。すなわち、(1)事例地下水(好・嫌気性菌共存)、(2)滅菌地下水+好気性菌接種、および(3)滅菌地下水+嫌気性菌接種の場合である。そしてその間の自然電位変化を測定した。(Fig. 8(a), (b)) 電位変化挙動をまとめてTable 4に示す。貴化挙動が見られる条件はいずれも嫌気性菌が存続する場合である。このことより、本実験では硫酸塩還元菌の影響が大きいことがわかる。条件②の好気性菌群を用いた場合に貴化現象が見られず、前出の文献結果と異な

る。この理由は現時点では十分に説明できない。試料表面での菌の付着量が少なかったことが SEM 観察で確認されているが、このことは表面を覆う量も少なかったことも予想され、実験期間内では貴化が観察されなかったものと考えている。今後の検討課題である。

一方、硫酸塩還元菌（Sulfate Reducing Bacteria, 以下 SRB）の存在下での炭素鋼の腐食に関して、白水ら⁸⁾、佐々木ら⁹⁾、馬場ら¹⁰⁾の報告がある。実験結果の一つとして自然電位変化が示されているが、いずれの結果も貴化することを示している。そのなかで、佐々木らは硫化水素発生、腐食発生および菌増殖と電位変化との関連を詳しく検討し、それらの相互関係を論じている。

Fig. 6. SEM micrographs and EDX analysis of biofilms on SUS316L base metal after 40 d exposure test in strain-J inoculated solution.

材料や試験条件が異なるので、それらの報告と本実験結果と直接に比較し、論ずることはできない。しかし、佐々木らの連続的に培地を供給しつつ行った腐食試験で示された自然電位変化傾向と本実験結果は比較的よく合っていることがわかった。本実験の浸漬過程でも、インキュベーター中およびフラスコからは硫化水素臭があることが定性的ではあるが確認された。したがって炭素鋼の場合と同じような反応が行われて、腐食発生の原因となったことが考えられる。

次に SRB によるステンレス鋼の腐食について述べる。

SRB による腐食機構については次のような反応式が提案されている^{11,12)}。

SRB は (4) 式の反応に関与し、カソードを復極させ、ひいてはアノード反応を促進させて腐食速度を増大させるとしている。

316L ステンレス鋼パイプの腐食に対する SRB の作用について梶山の報告がある¹³⁾。それによると、SRB の役割として中性・嫌気性環境下で、事例となった工業用水中の SO_4^{2-} を還元して次のように HS^- を生成するとしている。

Fig. 7. SEM micrographs of surface condition on SUS316L weld metal and HAZ after 40 d exposure test in strain-J inoculated solution.

パイプ内が好気性環境下になると HS^- は $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ に酸化される。

次いで $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ はプロトンと反応して元素Sが生成されるカソード反応が起こる。

Fig. 8. Variation of corrosion potential in bacteria inoculated solution as a function of time.

Table 4. TIG welding condition.

Current	Speed	Shield gas
250A	500mm/min	Ar

一方、バイオフィルムの厚さや形成は金属表面上で不均一であり、フィルムに覆われていないところでは、酸素還元反応（カソード反応）も存在すると考えられる。すなわち、本系におけるカソード反応は式(10)と酸素還元反応の和であり、ひいてはこれらとつり合うアノード反応も促進されて大きな腐食となる。パイプ内で水が流れていない期間に生成されたチオ硫酸イオン（9式）の働きが重要であると結論づけている。本実験で、インキュベーター中での再現実験途中で硫化水素臭はつねに確認しているので、上記の反応が行われていたことは十分に推定できる。

本事例のような好・嫌気性微生物の共存状態での腐食メカニズムを推定すると、まず好気性菌が試料表面上に付着し、そこで増殖が始まる。その結果バイオフィルムが形成され、その内部は嫌気的条件下となり、SRBが活動するようになる。こうして前出(8)式のように事例水中の硫酸イオンが還元され、各反応を経て腐食を発生させたものと考えられる。いったん腐食が発生すると、酸素が欠乏しているためステンレス鋼の再不動態化も阻害される。塩素イオンも存在しているので、急速に腐食は進行することが可能となる。事例水中での腐食発生モデルを Fig. 9 に示す。

5. 結論

SUS316L ステンレス鋼配管部の地下水による腐食事例を研究室レベルでの再現実験によって解析した。得られた主な結果を以下に示す。

(1) 事例地下水中の構成微生物を単離し同定した結果、7種類の微生物が確認された。このなかで好気性菌が6種類認められた。嫌気性菌は1種生存しており、それは *Desulfovibrio* sp. で、硫酸塩還元菌 (SRB) であった。

(2) 液体培地試験液を作製し、その中へそれぞれ単離菌を接種し、その中で浸漬実験を行った結果、好気性菌の *Comamonas* sp., *Sphingomonas* sp., *Agrobacterium* sp. は SUS316L 鋼表面上にバイオフィルムを形成することがわかった。しかし、本実験条件下では好気性菌は腐食を発生

Fig. 9. Schematic illustration of a corrosion process in the culture with aerobic microbes and *Desulfovibrio* sp.

しなかった。嫌気性菌の *Desulfovibrio* sp. (SRB) を接種した場合でもバイオフィルムが形成された。さらにこの場合は試験片に多数の腐食孔が観察された。したがって本事例の原因菌であると判断した。

(3) NB (Nutrient Broth) を添加した事例地下水中での浸漬実験で、電位の貴化が観察された。滅菌した、および NB を添加しなかった場合は貴化は認められず、この貴化現象へ微生物との関与が示唆された。

(4) 好気性菌を単独で接種した試験液においては電位は浸漬開始直後にわずかな卑化が見られたが、大きな変化は観察されなかった。嫌気性菌を接種した場合は一定期間経過した後、大きな貴化現象が現れ、腐食発生と関連していた。

終わりに、微生物学的検討に際し、種々の助言を頂いた東京大学分子細胞生物学研究所助教授横田明博士ならびに東京ガス(株)本社導管部梶山文夫博士に感謝申し上げます。

文 献

- 1) Y.Kikuchi, M.Ozawa, K.Tohmoto, H.Ohnishi, T.Sakane and T.Anzai: *Tetsu-to-Hagané*, **88** (2002), 658.
- 2) H.Takahashi, H.Saito, T. Tezuka, S.Mizushima and H.Yamaguchi: Bi-seibutsugaku-Nyumonhen, Baihuukan, Tokyo, (1991), 16.
- 3) R.Sudou: Kankyo Biseibutsu Jikken-hou, Koudansya Scientific, Tokyo, (1994), 265.
- 4) Y.Ishihara and S.Tsujikawa: *Zairyo-to-Kankyo*, **48** (1999), 520.
- 5) Y.Ishihara, S.Motoda, Y.Suzuki and S.Tsujikawa: *Zairyo-to-Kankyo*, **44** (1995), 355.
- 6) C.C.Gaylarde and H.A.Videla: Bioextraction and Biodeterioration of Metals, Cambridge Univ. Press, Cambridge, (1995) 148.
- 7) N.Washizu and H.Masuda: *Zairyo-to-Kankyo*, **49** (2000), 362.
- 8) T.Shiramizu, T.Umino and K.Muto: *Corros. Eng. (Jpn.)*, **23** (1974), 393.
- 9) H.Sasaki, T.Nakahara, Y.Kanda, K.Osato and H.Togano: *Corros. Eng. (Jpn.)*, **26** (1977), 77, 125.
- 10) F.Baba, T.Suzuki and M.Seo: *Zairyo-to-Kankyo*, **45** (1996), 595.
- 11) H. Kurata, K. Tsubaki, T. Harada and K. Minoura: Biseibutsu-ni-yoru-Zaishitsurekka, Koudansya Scientific, Tokyo, (1979), 93.
- 12) H.A.Videla: Manual of Biocorrosion, Lewis Publishers, Boca Raton, (1996), 170.
- 13) F.Kajiyama: *Zairyo-to-Kankyo*, **46** (1997), 326.