

コンクリート腐食に関与する微生物

Sulfur-oxidizing Bacteria Involved in Concrete Corrosion

杉尾 剛*, 前田照信**

コンクリート腐食の主原因微生物と考えられている硫黄酸化細菌の分類並びに元素硫黄酸化機構について概説する。また、浄化処理施設の腐食コンクリートより分離した硫黄酸化細菌が *Thiobacillus thiooxidans* であること、この細菌の増殖がニッケルイオンで強く阻害されること、この増殖阻害はニッケルが菌体に結合し、菌の呼吸を停止することに原因していることを示す。この結果は、ニッケルを含んだコンクリートが無添加のものより、硫化水素曝露試験で腐食しにくい結果と一致する。

1. はじめに

都市住民の生活を支えている下水道、下水処理施設等コンクリート構造物の腐食劣化が現在世界各地で急速に進んでいる^{1)~7)}。コンクリート構造物は半永久的なものであると思われがちであるが、実際には寿命があり、特にコンクリートが置かれた環境中に、硫化水素 (H_2S) などの硫黄化合物が多量に存在する場合にはその寿命が驚く程短くなることが明らかにされている。

一般のポルトランドセメントは、水和すると水酸化カルシウムを生成し、pH12~13を示す。このpHが保持されれば、コンクリートは本来の強度を長期に渡って保つことができる。通常的环境下においては、大気中に0.03%含まれる炭酸ガスが、コンクリート中の水酸化カルシウムと数十年という長い時間をかけて反応し、炭酸カルシウムを生成し、pH8.5~10に低下させる（コンクリー

トの中性化)。この中性化に伴ってコンクリートは漸次強度を失い劣化する。このような炭酸ガスによる化学的中性化の他に、下水管路に存在する硫黄酸化細菌が生産する硫酸による「微生物的な中性化反応」が存在している。1945年、Parker は、腐食コンクリートより硫黄酸化細菌を初めて単離し *Thiobacillus concretivorus* と命名した^{1), 2)}。しかし、この硫黄酸化細菌は、後に *Thiobacillus thiooxidans* と同定し直された。その後、腐食コンクリートから *Thiobacillus neapolitanus*, *Thiobacillus intermedius*, *Thiobacillus novellus* など多種類の *Thiobacillus* 属硫黄酸化細菌が単離、同定され、これらもコンクリート腐食に関与していると考えられている^{5), 9)}。

下水管路、下水処理場のコンクリート槽では、水面、あるいは水面より上部の比較的酸素供給量の高い場所で顕著なコンクリート腐食が観察され

* Tsuyoshi SUGIO 岡山大学 農学部 教授

** Terunobu MAEDA (株)間組 技術研究所 技術研究部 第5研究室 主任研究員

るのが一般的である。この理由は、下水から発生する硫化水素を硫酸へ酸化する原因微生物の硫黄酸化細菌が、増殖に酸素を要求する絶対好気性細菌であるからである。硫黄酸化細菌の餌になる硫化水素は、嫌気的な条件下で下水中に含まれる硫酸イオンが硫酸還元菌によって還元されて生成するか、あるいは、下水中に存在するタンパク質が従属栄養微生物の作用によって分解され、生じるシステイン、シスチン、メチオニンなどの含硫アミノ酸が、さらに微生物的な還元分解を受けて生成する。従って、コンクリート腐食を防止するためには、下水に硫黄を含む有機化合物をなるべく流さないよう各家庭が努力するとともに、微生物に侵されにくいコンクリートを開発することが重要と考えられる。

2. 硫黄酸化細菌

硫黄酸化細菌は、幅0.5~1.0 μm 、長さ1.0~2.0 μm の桿菌で、鉱山排水、温泉水など無機硫黄化合物の豊富に存在する環境に普通生息しているが、硫黄化合物と酸素の存在する環境には生息している可能性が高い。本菌は、*Thiobacillus* 属に分類され、硫化水素、元素硫黄、チオ硫酸、亜硫酸、ポリチオン酸などの還元型無機硫黄化合物を硫酸に酸化する際生ずるエネルギーを増殖や

生命維持のためのエネルギーとして利用できるという特殊な能力を持っている。*Thiobacillus* 属細菌の中には、硫黄化合物と二価鉄 (Fe^{2+}) の両方を酸化できる鉄酸化細菌 *T.ferrooxidans*、嫌気条件下において硝酸イオンを電子受容体にして窒素ガスを生成しながら増殖する脱窒性硫黄酸化菌 *T.denitrificans* なども含まれている。

Thiobacillus 属細菌は、利用可能なエネルギー源、炭素源、電子受容体および生育温度、pHなど生理学的性質の異なる極めて多彩な微生物群を含んでいる。たとえば、*Thiobacillus* 属細菌は、植物と同様に細胞炭素を空気中の炭酸ガスからのみ得ている絶対独立栄養性硫黄酸化細菌と、炭酸ガス以外にグルコースなどの有機炭素化合物をも利用可能な通性独立栄養性の硫黄酸化細菌との2つに分類できる(表1)。前者には、*T.thioparus*, *T.thiooxidans*, *T.ferrooxidans* などが、後者には *T.novellus*, *T.intermedius* などが属している。また、*Thiobacillus* 属細菌は、増殖可能なpHに関しても多彩である。生育最適pHを3.0以下の酸性域に持つ *T.thiooxidans*, *T.ferrooxidans*, *T.acidophilus*、中性域に持つ *T.thioparus*, *T.novellus*, *T.intermedius*, *T.versutus*, *T.neapolitanus* などが知られている。

表1 *Thiobacillus* 属細菌のエネルギー源、独立栄養性、生育 pH

<i>Thiobacillus</i> 属細菌の種	エネルギー源			独立栄養性	生育pH
	還元型無機硫黄化合物	Fe^{2+}	有機物		
<i>Thiobacillus thioparus</i>	+	—	—	絶対独立栄養	6~8
<i>Thiobacillus neapolitanus</i>	+	—	—	絶対独立栄養	6~8
<i>Thiobacillus capsulatus</i>	+	—	—	絶対独立栄養	5~7
<i>Thiobacillus tepidarius</i>	+	—	—	絶対独立栄養	6~8
<i>Thiobacillus denitrificans</i>	+	—	—	絶対独立栄養	6~8
<i>Thiobacillus ferrooxidans</i>	+	+	—	絶対独立栄養	2~4
<i>Thiobacillus thiooxidans</i>	+	—	—	絶対独立栄養	2~4
<i>Thiobacillus novellus</i>	+	—	+	通性独立栄養	6~8
<i>Thiobacillus versutus</i>	+	—	+	通性独立栄養	6~8
<i>Thiobacillus intermedius</i>	+	—	+	通性独立栄養	5~7
<i>Thiobacillus delicatus</i>	+	—	+	通性独立栄養	5~7
<i>Thiobacillus acidophilus</i>	+	—	+	通性独立栄養	2~4

+ : 利用可能, — : 利用不可能

以上, *Thiobacillus* 属細菌は, 炭酸ガスと無機塩しか存在しない栄養状態の極端に悪い環境下でも, 大量の硫黄および鉄化合物を素早く変換する能力を持っているので, 地球の硫黄および鉄化合物の循環に重要な役割を果していると考えられている。

3. 硫黄酸化細菌 *T.thiooxidans* の元素硫黄酸化機構

生理学的に性質の異なる極めて多種類の *Thiobacillus* 属硫黄酸化細菌が存在している。また, *Thiobacillus* 属細菌は, 硫化水素, 元素硫黄, チオ硫酸, 亜硫酸, ポリチオン酸など多種類の還元型無機硫黄化合物を酸化できる。個々の硫黄化合物に対しての微生物的硫黄酸化機構が提案されているけれども, ここではコンクリート腐食に最も関係深いと考えられる *T.thiooxidans* の硫黄酸化について述べる。*T.thiooxidans*, *T.acidophilus*, *T.ferrooxidans* は酸性環境下で元素硫黄 (S^0) を酸化できる細菌である (表 1)。これら好酸性硫黄酸化細菌による元素硫黄酸化の総括反応式は,



で与えられ, 反応中間体として亜硫酸が生成する点は共通しているが, これに関与する酵素, 硫黄酸化の機構は異なっている^{10)~12)}。

T.thiooxidans の硫黄酸化機構として, 図 1 に示す経路が提案されている^{13), 14)}。還元型グ

ルタチオン (GSH) の存在下, 8 員環構造を持つ S^0 は化学的に開裂を受けポリサルファイドを生成する。このポリサルファイドは Sulfur dioxygenase の作用で分子状酸素によって酸化され亜硫酸を生成する。この亜硫酸はさらに硫酸にまで酸化され反応が終結する。*T.thioparus*, *T.novellus*, *T.ferrooxidans* など他の *Thiobacillus* 属細菌にも sulfur dioxygenase の存在が報告されている。一方, Sulfur dioxygenase が関与しない S^0 酸化機構の存在も報告されている^{15), 16)}。

S^0 の酸化の際生成する亜硫酸は, 2 種類の方法で硫酸にまで酸化される。一つは sulfite : cytochrome c oxidoreductase が関与するもので, *T.novellus*¹⁷⁾ の他, *T.thioparus*, *T.verutus*, *T.ferrooxidans* などに本酵素の存在が認められている。もう一方は, アデノシン 5'-ホスホスルフェート (APS) 還元酵素およびアデノシンジリン酸 (ADP) スルフリラーゼが関与するもので¹⁸⁾, *T.thioparus* および *T.denitrificans* に両酵素の存在が報告されている。中村らは, *T.thiooxidans* JCM78141 株の亜硫酸酸化活性が AMP によって活性化されないこと, また, AMP と亜硫酸から APS が生成されないことより, この株の亜硫酸酸化は APS 経路ではなく sulfite : cytochrome c oxidoreductase を用いて行われていることを示唆し¹⁹⁾, 本菌の細胞膜より sulfite dehydrogenase を電気泳動的に均一な標品として単離精製し, 性質の検討を行っている²⁰⁾。

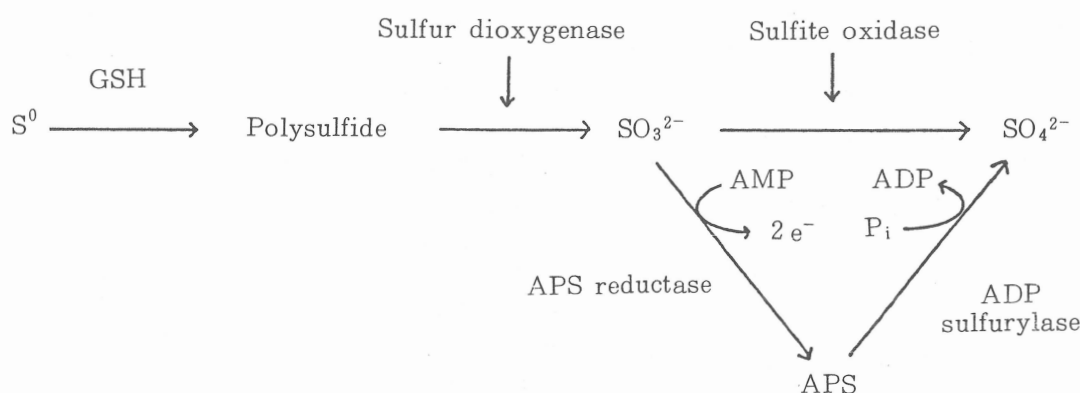


図 1 *Thiobacillus thiooxidans* の硫黄酸化機構

4. 硫黄酸化細菌の生育阻害剤による劣化防止の試み

コンクリートの腐食に関与する微生物に関しては現在まで多数の記載があるが、コンクリート腐食の防止を主目的にした応用的研究は比較的少ない。Dueckerらは、サルファーセメントに添加した β -ナフトールやセレンウムの硫黄酸化細菌に対する増殖阻害作用について²¹⁾、また、Emmelは、下水パイプの生物的腐食を阻害する試薬について報告している²²⁾。

硫黄酸化細菌による下水構造物の劣化状況を詳細に観察したところ、コンクリートに比べてステンレス材の損傷が僅かなことに疑問を感じた。こ

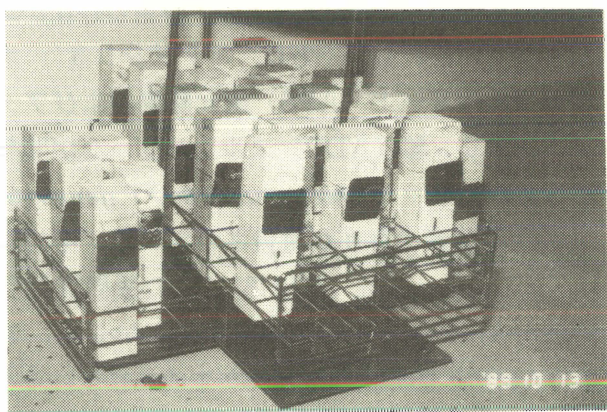


写真1 曝露状況

の原因として、重金属による硫黄酸化細菌の生育阻害を疑い確認のため曝露試験を行った。使用した薬剤を表2に示す。薬剤の添加濃度はセメントに対して2, 10, 20wt%とした。モルタルは水/セメント比=0.5, 砂/セメント比=2.0, 供試体の寸法は4×4×16cmとした。曝露状況を写真1に示す。

曝露試験を行った汚泥槽の硫化水素濃度は約50～80ppmであった。曝露試験2年目の結果についてはニッケルの阻害効果が顕著であることを先に報告した²³⁾。5.5年間曝露したときの重量減少率を図2に、腐食深さを図3に示す。なお、未硬化と記した配合はモルタルが硬化しなかったものである。重量減少の要因としては劣化による損耗、乾燥によるものが考えられる。また、重量増加の要因としては硫酸との反応によるものが考えられる。表から明らかなように、有機系殺菌剤、銅、酸化銅、ニッケル、酸化ニッケルによる防蝕効果が顕著である。図4にニッケルを添加した場合と無添加のカルシウムと硫黄のEPMAを示す。腐食による大きさの違い、無添加のカルシウムの溶脱と硫酸の侵入が明確に確認できる。

5. 腐食コンクリートより単離した硫黄酸化細菌のニッケルによる生育阻害

第4節の結果を明らかにするために下水道施設

表2 使用混和剤一覧

種 類	名 称	比 重	性 状	備 考
有機系	イミド系	1.7	白色微粉末	毒性LD ₅₀ =9,000mg/kg
	チオシアネート系	1.7	白色粉末	毒性LD ₅₀ =2,900mg/kg
	イソフタロ系	0.75	類白色微粉末	毒性LD ₅₀ >10,000mg/kg
無機系	銅	8.9	赤色微粉末	
	酸化銅	6.4	黒色微粉末	
	ニッケル	8.8	灰白色微粉末	
	酸化ニッケル	7.0	灰黒色微粉末	
	スズ	7.3	銀白色微粉末	
	酸化スズ	6.9	白色微粉末	
	鉛	11.3	銀白色微粉末	
	酸化鉛	9.3	黄褐色微粉末	
	酸化コバルト	6.2	灰緑色微粉末	
無添加	—			

から硫黄酸化細菌を分離し、この菌の増殖に及ぼすニッケルイオンの影響について検討した。

下水処理場着水井の腐食コンクリートより単離した硫黄酸化細菌NB1-3株は、グラム陰性の非孢子形成性桿菌(0.5~1.0×1.5~2.0 μm)で、1本の極鞭毛を持っていた^{2,3)}。本株は、生育最適pHを3.0~4.0に、生育最適温度を30℃に持っており、元素硫黄、チオ硫酸、テトラチオン酸を唯一のエネルギー源にして増殖した。また、NB1-3株は、元素硫黄、チオ硫酸、テトラチオン酸、サルファイドを酸化する酸素活性を、また、硫黄依存性の菌体内へのCO₂の取り込み活性を有しているので、硫黄酸化性の化学合成独立栄養細菌である。

GC含量は52.9%であった。一方、従来報告されている硫黄酸化細菌*T. thiooxidans*のGC含量は51~53%である。以上の結果は、NB1-3株が*Thiobacillus thiooxidans*であることを強く示している。

コンクリート腐食防止に効果のあったニッケルの本菌に及ぼす影響を検討した。チオ硫酸、元素硫黄、テトラチオン酸無機塩培地におけるNB1-3株の増殖は、0.1%の金属ニッケル、5mMの硫酸ニッケルで完全に阻害された(図5)。また、本菌の硫黄酸化酵素活性、CO₂固定活性は、いずれも5mMの硫酸ニッケルで強く阻害された(図6)。また、pH3.0あるいはpH7.0において、10mMの硫酸ニッケルで10時間処理した後の

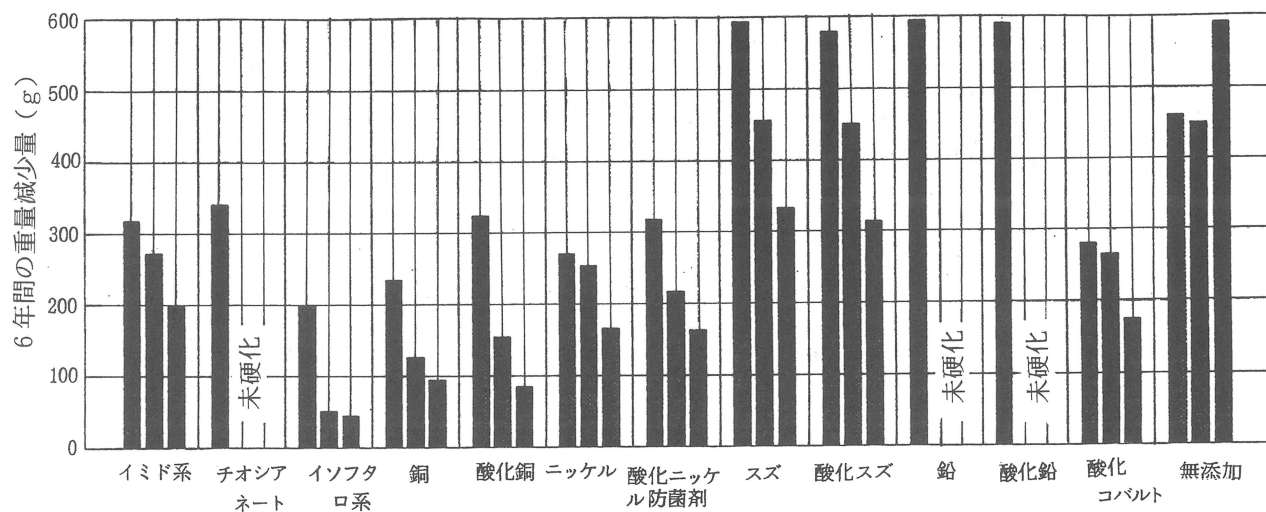


図2 重量減少量

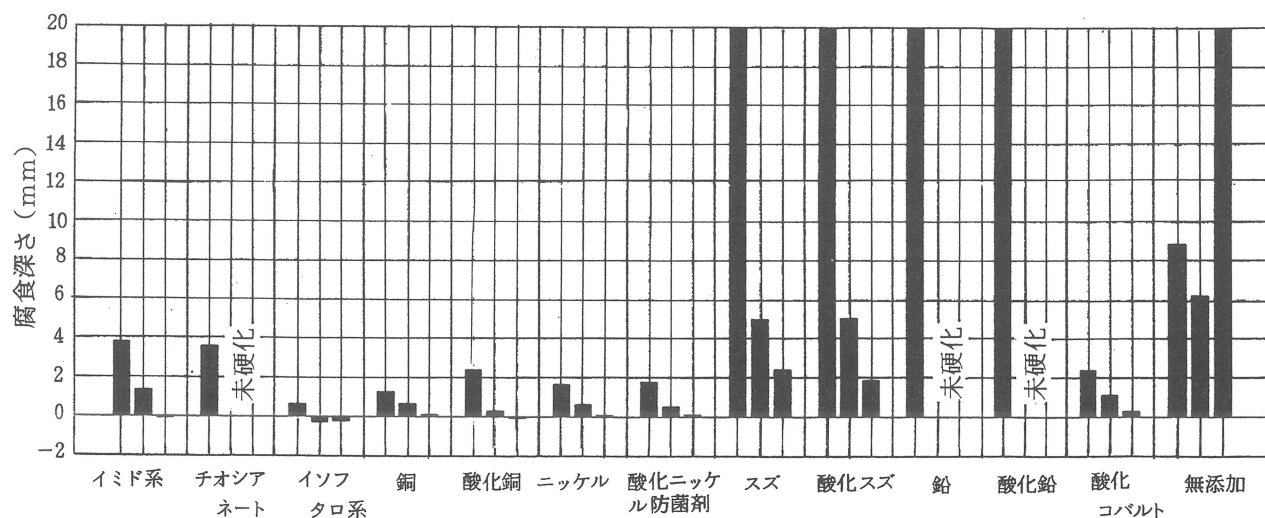


図3 腐食深さ

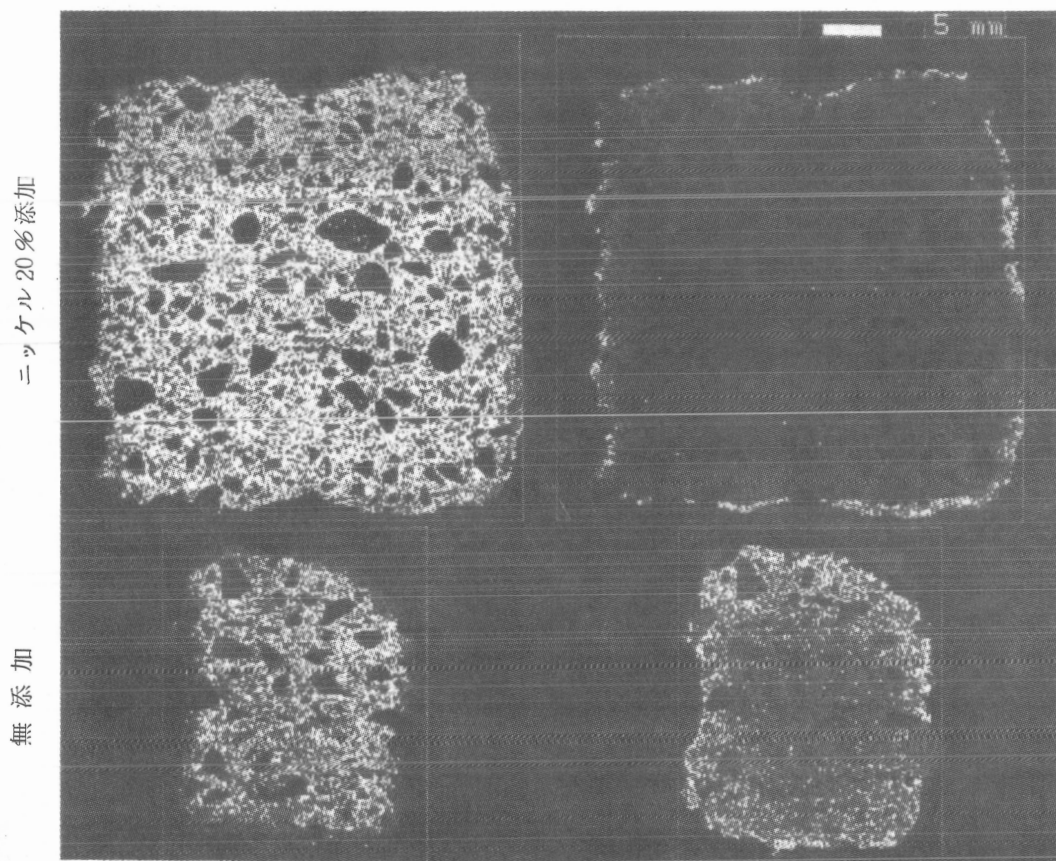


図4 EPMAによる観察 (左: カルシウム, 右: 硫黄)

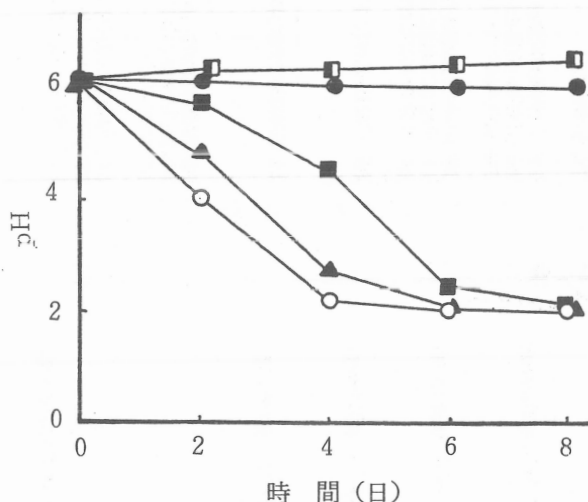


図5 *Thiobacillus thiooxidans* NB1-3株の増殖に及ぼす金属ニッケルおよび硫酸ニッケルの影響²⁵⁾

T. thiooxidans NB1-3株を 0.5mM(▲), 1.0mM(■), 5.0mM(●)の硫酸ニッケル, あるいは0.1%の金属ニッケル(◻)を含むチオ硫酸無機塩培地で増殖させた。(○)は, 硫酸ニッケルあるいは金属ニッケル無添加のチオ硫酸無機塩培地での菌の増殖を示す。菌の増殖は, 硫酸の生成によるpHの低下で見た。

NB1-3株菌体中のニッケル含量, およびニッケル無処理菌体のニッケル含量は, それぞれ30.0, 160.0, 1.7 nmol/mg proteinであった。これらの結果は, ニッケルがNB1-3株の菌体に結合し, 本菌のエネルギー生成系, すなわち硫黄酸化酵素を阻害し, その結果, 生育が阻害されることを強く示唆している。さらに, この結果は図6において, ニッケルの硫黄酸化活性, 炭酸ガス固定活性に対する阻害がpH3.0よりもpH7.0でより顕著であったことを支持する。ニッケルイオンが, 硫黄酸化酵素の sulfur dioxygenase を阻害するのか, あるいは sulfite : cytochrome c oxidoreductase を阻害するのかについては非常に興味ある問題である。

6. 硫黄酸化細菌生育阻害剤の将来展望

硫黄酸化細菌からコンクリート構造物を守る方法としては, 塗料やシートによる方法が現在一般的であるが, 塗料による方法では耐用年数が数年

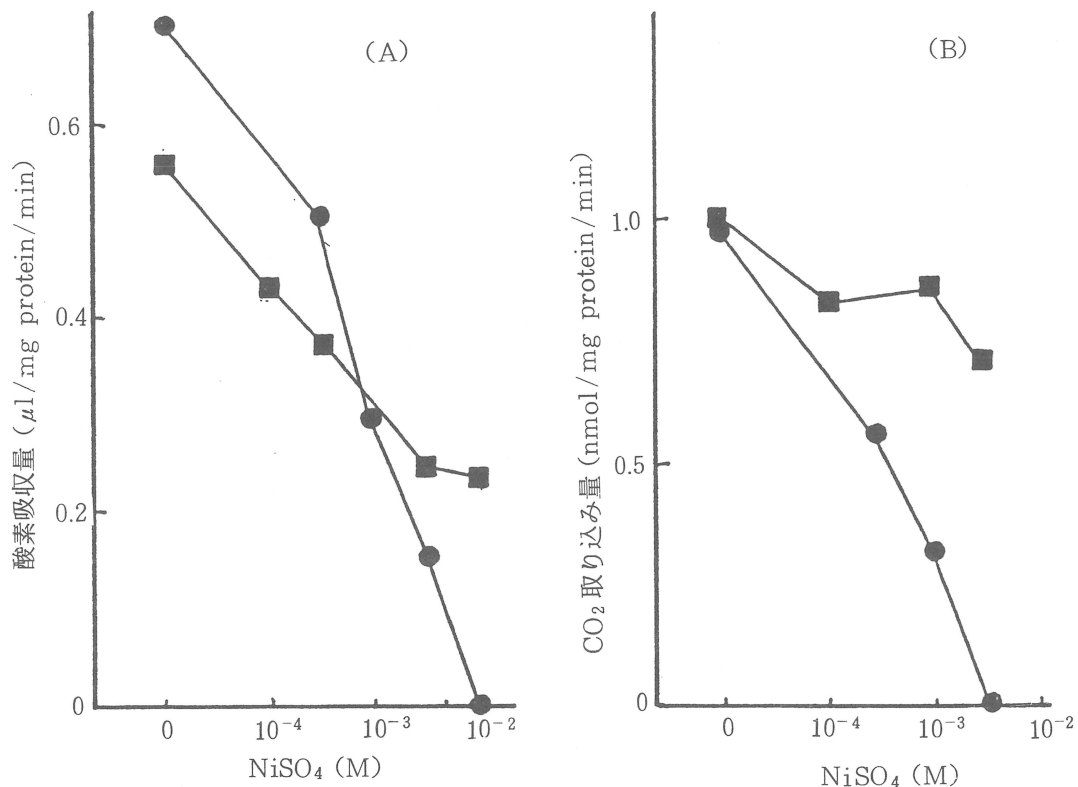


図6 硫黄酸化活性および炭酸ガス固定活性に及ぼす硫酸ニッケルの濃度の影響^{2,5)}

硫黄酸化活性 (A) は, *T. thiooxidans* NB 1 - 3 株の洗浄細胞を用い, 硫黄酸化に基づく酸素吸収量を検圧法で測定した。炭酸ガス固定活性 (B) は, *T. thiooxidans* NB 1 - 3 株の洗浄細胞を用い, 菌体内への炭酸ガスの取り込み量を $\text{Na}^{14}\text{CO}_3$ を用いて測定した。両実験ともに pH3.0 (■) 並びに pH7.0 (●) における測定結果を示す。

程度と短く, また, 両者とも小口径下水管での継ぎ手, 傷の補修が困難等の問題がある。

硫黄酸化細菌生育阻害剤によるコンクリート構造物の防蝕法は,

- ①水溶性の硫酸でさえも濃縮されるよう, イオンの溶出がない環境を対象にすることから, ニッケルイオンも溶出せず, 効果の永続性が期待できること
- ②補修や継ぎ手が簡単なこと
- ③部材に傷が生じても効果に致命的な影響を与えないこと

等の特徴があり, 従来工法より優位である。すでに94年からニッケルを主成分とした硫黄酸化細菌生育阻害剤を上市中で, 94年度の使用量は薬剤で約1トン, コンクリート換算で約1万トンに及んでおり, 今年度は使用量のさらなる増大が見込ま

れている。

偶然見出された硫黄酸化細菌生育阻害剤であるが, 近い将来本法による防蝕工法が主流となるのではないだろうか。

文 献

- 1) C. D. Parker, *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.*, **23**, 81-90 (1945)
- 2) C. D. Parker, *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.*, **23**, 91-98 (1945)
- 3) C. D. Parker, *Nature*, **159**, 439-440 (1947)
- 4) C. D. Parker, *Sewage and Industrial Wastes*, **23**, 1477-1485 (1951)
- 5) K. Milde *et al.*, *J. Gen. Microbiol.*, **129**, 1327-1333 (1983)

- 6) T. Mori *et al.*, *Wat. Res.*, **26**, 29-37 (1992)
- 7) W. Sand *et al.*, *Environ. Tech. Lett.*, **5**, 517-528 (1984)
- 8) W. Sand, *Appl. Environ. Microbiol.*, **53**, 1645-1648 (1987)
- 9) N. Yoshida *et al.*, *J. Ferment. Bioeng.*, **76**, 400-402 (1993)
- 10) 杉尾 剛, 発酵工学会誌, **67**, 173-193 (1989)
- 11) 杉尾 剛, *Thiobacillus* 属細菌の無機物代謝, 極限環境微生物ハンドブック, 大島泰郎監修, pp. 358-392, サイエンスフォーラム (1991)
- 12) 杉尾 剛, 鉄・硫黄酸化細菌の生理と利用, 化学と生物, **30**, 533-537 (1992)
- 13) I. Suzuki, *Ann. Rev. Microbiol.*, **28**, 85-101 (1974)
- 14) 今井和民, 独立栄養細菌, 化学同人 (1984)
- 15) A. Kodama *et al.*, *Plant and Cell Physiol.*, **10**, 645-655 (1969)
- 16) S. Takakuwa, *Plant and Cell Physiol.*, 1027-1035 (1975)
- 17) A. M. Charles *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta*, **128**, 522-534 (1966)
- 18) H. D. Peck, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **46**, 1053-1057 (1960)
- 19) K. Nakamura *et al.*, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **56**, 261-263 (1992)
- 20) K. Nakamura *et al.*, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **59**, 11-15 (1995)
- 21) W. W. Duecker *et al.*, *J. Am. Waterworks Assoc.*, **7**, 715-728 (1948)
- 22) T. Emmel *et al.*, *Biodeterioration*, **7**, 118-122 (1988)
- 23) T. Maeda *et al.*, *Fracture and Damage of Concrete and Rock-FDCR-2*, Edited by H. P. Rossmanith ©, 1993, E&FN Spon
- 24) 野上康雄ほか, 日本農芸化学大会講演要旨集, p. 197 (1995)
- 25) T. Maeda *et al.*, *Biosci. Biotech. Biochem.*, submitted