

微生物の生化学反応を応用した材料微細加工 プロセスに関する研究 第1報 (銅の微生物誘起腐食の加工への応用)

宮野 泰征*・四方 真治*²・小澤 正義*³・スリー・クマリ*⁴・菊地 靖志*⁵

Micro Etching Process of Metals Using Microbial Metabolic Reaction (I)
—Application of Microbiologically Influenced Corrosion of Metallic Copper to Material Processing—

Yasuyuki MIYANO, Shinji SHIKATA, Masayoshi OZAWA, K. R. SREEKUMARI and Yasushi KIKUCHI

Synopsis : The possibility of new material processing using microorganism has been studied. In these studies, it was investigated new techniques to utilize bacteria as processing tools and to apply microbial metabolic reaction to material processing.

This method originated from the proposal of using the iron oxidizing bacteria, *Thiobachillus ferrooxidans*, focusing on the possibility of applying its supreme ability of corroding iron to material processing. However, *T. ferrooxidans* is not always suitable for material processing because it prefers a strong sour environment, and usual materials are easily damaged by these sour solutions. Therefore, bacteria that live in a neutral environment and their biochemical is more suitable for this processing. Therefore, Microbiologically Influenced Corrosion (MIC) is a good candidate for this processing because MIC involves high corrosion rates in a mild environment.

A study on this new etching process for metals, applying the microbial metabolic reaction related to MIC, is reported here. The process is called “Bio-etching” and it is investigated by the following experiments. First, *Staphylococcus* sp., detected as the cause of the corrosion of copper was selected as the test strain. The situations of the adhesion area of *Staphylococcus* sp. and the occurrence of the corrosion on each culture condition were evaluated, and the optimal conditions for processing were examined. Secondly, an experiment for bio-etching to metallic copper using *Staphylococcus* sp. was carried out, the creation of the processing pattern corresponding to the shape provided by resist was observed.

Key words: micro-processing; bio-processing; bacteria; microbiologically influenced corrosion (MIC); adhesion; biofilm; *Staphylococcus* sp.; copper; bio-etching.

1. 緒言

1990年代初頭、宇野らにより、“生物的加工法”という概念が発表された¹⁾。これは、分解、生成、凝集といった微生物の生化学的作用を、材料加工プロセスに応用しようとする着想である。自立活動する微生物を加工工具とした、常温、常圧環境という材料に比較的負荷の少ない環境における材料加工工程を指向した加工法である。物質投入量、エネルギー投入量の節約が可能で、環境、加工材への負荷(加工歪み、熱影響)の抑制が期待できる。加工工具となる微生物がマイクロサイズであることから、新しい微細加工法としての可能性もある。

宇野らの研究¹⁾では、主に鉄酸化細菌(チオバチルスフェロオキシダンス: *Thiobachillus ferrooxidans*²⁾(以下 *T.*

*ferrooxidans*と記載。)が利用された。この微生物は、鉄を酸化する能力に優れ、従来、微生物浸出法(バイオリーチング)²⁾に利用されてきたものである。宇野らは、この微生物の酸化作用で実現される、金属表面の腐食溶解を、金属材料表面の除去加工の原理に応用し、“生物的除去加工(バイオマシニング)”として提唱している¹⁾。

*T. ferrooxidans*の適用を検討した研究は他にもある³⁻⁶⁾。鉄・銅などを加工対象とした、加工プロセスの開発を目指した検討、あるいは加工量、加工速度の向上に関する報告例である。しかし、上記の研究で用いられた微生物の生育環境は、水分を含んだ強酸性下(pH 3以下)に限定されるため、環境、加工材への負荷の軽減には必ずしも直結しない。また、強酸性水溶液の使用は、実用という側面からも大きな課題と考えられる。

平成17年5月26日受付 平成17年12月15日受理 (Received on May 26, 2005; Accepted on Dec. 15, 2005)

* 大阪大学大学院(現:日本学術振興会特別研究員(独立行政法人 産業技術総合研究所))(Graduate School of Engineering Osaka University, now Research Fellow of Japan Society for the Promotion of Science (National Institute of Advanced Industrial Science and Technology), 1-8-31 Midorioka Ikeda 563-8577)

* 2 大阪大学大学院(現:関東自動車工業(株))(Graduate School of Engineering, Osaka University, now Kanto Auto Works Ltd.)

* 3 大阪大学接合科学研究所(現:独立行政法人 原子力安全基盤機構)(Joining and Welding Research Institute, Osaka University, now Japan Nuclear Energy Safety Organization)

* 4 大阪大学接合科学研究所(現:レークヘッド大学(カナダ))(Joining and Welding Research Institute, Osaka University, now Lakehead University)

* 5 大阪大学名誉教授(大阪市立大学客員教授)(Professor Emeritus, Osaka University (Visiting Professor, Osaka City University))

これらに対し、黒崎らは、*T. ferrooxidans*以外の微生物の適用を検討している⁷⁾。中性海洋環境の微生物を対象に、自然海水中でおこる微生物による金属の析出、溶解といった反応を適用したプロセスを想定している。常温、常圧、中性環境での加工プロセスを指向した検討といえる。しかし、加工プロセスの実現という観点からは、自然環境中の微生物の反応速度をさらに向上させることが、今後の大きな検討課題となる。原理とする反応機構、微生物の種類についても不明であるため、これらを明らかにすることもプロセス開発を展開する上で重要な課題と考えられる。

しかし、環境、材料の双方に負荷の少ない工程を期待できる点は、微生物を利用した材料加工プロセスが持つ大きな利点⁸⁾と考えられる。そのためには、常温、常圧、中性の環境における微生物が関与する現象に着目し、その中から加工に応用の可能性を持つ微生物を選定することが重要となる。

微生物の活動により、マイルドな環境(常温、常圧、中性で材料への腐食影響が少ない環境)でも、材料が大きな速度で腐食、劣化を受ける現象があり、微生物誘起腐食として注目を集めるようになってきている⁹⁾。各種構造材料での被害が報告¹⁰⁻¹²⁾されており、例えば、耐食性に優れたステンレス鋼においても、通常では考えられない非常に大きな速度で腐食が局部的に成長し貫通孔を形成し、大規模な被害を発生させた事故例がいくつか報告されている^{13,14)}。

著者らは、微生物誘起腐食の事例解析を、実験室規模での再現実験を中心に検討してきた。この過程で、用いた腐食事例水中から微生物誘起腐食の原因となる微生物を特定し、それらの反応機構をもとに、銅、ステンレス鋼などに腐食を再現できる条件を明らかにしてきた¹⁵⁻¹⁷⁾。実際、著者らが原因微生物として特定したのものの中には、常温、中性環境に生育する微生物が存在した。これらの微生物は、材料表面に付着した領域およびその近傍に、局所的な腐食環境を創出する特徴を持っていた。このような機構で発現する金属の腐食を、微生物の付着と生化学反応を原因とする材料の溶解現象と見ることができ、材料加工プロセスの原理として応用が期待できると考えた^{8,18)}。

著者らは、微生物誘起腐食を原理、原因微生物を加工工具とした材料加工プロセスという着想を新しく示し、これをバイオエッチング(微生物腐食加工)として提案する。加工工具となる微生物には、これまでの微生物腐食の事例解析から見つけた、腐食原因微生物を利用し^{10,15-17)}、さらに、加工対象となる材料に適当な微生物と腐食機構を選定し、金属材料を対象にした、微生物を利用した材料加工プロセスを確立することを本研究の目的とする。本報告は、その第1報として、*Staphylococcus* sp.による銅表面の腐食溶解現象を応用した、バイオエッチングの可能性について検討した。すなわち、*Staphylococcus* sp.による銅の腐食機

構は、エネルギー代謝活動で産生される物質が、*Staphylococcus* sp.の付着位置近傍に濃化し、環境を材料の腐食誘発環境に変えることに起因するとされる¹⁰⁾。実際、*Staphylococcus* sp.を使用した微生物腐食の再現実験では、*Staphylococcus* sp.の付着位置と腐食の発生位置に良い相関が確認されている¹⁰⁾。つまり、腐食は、*Staphylococcus* sp.が増殖過程で形成したバイオフィーム付着部に見つかるケースが多い。このことは、*Staphylococcus* sp.の付着位置を制御することで、腐食の発生位置を制御できる可能性を示唆している。

そこで、本研究では、*Staphylococcus* sp.が有する腐食機構を効率的に再現するために、付着量の増加、安定した付着量の再現に有利な条件について検討した。次に、微生物の付着位置を制御するための加工装置を試作し、装置使用条件下での加工実験を行った。

2. 実験方法

2.1 微生物試料

微生物試料には、淡水環境の熱交換器銅パイプ冷却系の腐食事例の解析で、腐食の原因微生物として特定した、*Staphylococcus* sp.¹⁰⁾を使用した。この微生物は、通性嫌気性微生物であり、中性環境を主な生育環境とする。

2.2 培養のための栄養源

実験は全て*Staphylococcus* sp.の純粋培養環境で行った。栄養源には、中性環境に生育する微生物の培養に使用される代表的な培地であるNutrient Broth (Difco社製)を使用した(以下NBと表記)。化学成分組成をTable 1に示す。栄養源NBは、目的に応じて濃度を調整し、実験に供した。

2.3 供試材

実験には、無酸素銅(OFHC)を使用した。Table 2に化学成分組成を示す。試料サイズは25×15×3mmとした。表面を、エメリー紙による湿式研磨(#1000まで)、あるいはバフ研磨(ダイヤモンドペースト1μmまで)したものを試料とした。アセトン脱脂、滅菌操作の後、実験に供した。滅菌は、70%エチルアルコールで行い、その後表面に

Table 1. Chemical composition Nutrient Broth (Difco).

Component	Amount
Beef extract	3.0g
Peptone	5.0g
Distilled Water	1ℓ

Table 2. Chemical composition of test specimen (ppm). (test specimen: oxygen free high conductivity copper).

O	H	S	As	Fe	Ni	P	Pb	Zn	Cu
1.1	0.5	3	0.3	0.6	0.8	<0.5	0.9	0.2	Rem

付着したエタノールを除去するため、クリーンベンチ内部、UV照射条件下に60分以上静置した。

2.4 加工実験

加工実験は、すべて浸漬実験の手法¹⁵⁻¹⁷⁾により行った。三角フラスコに、濃度を希釈調整したNB液体培地を作成し、供試液とした。これに、*Staphylococcus* sp.を植え付け、試料を浸漬した。試料観察面は水平、上向きとなるように設置し、フラスコごとインキュベーター（培養装置）に静置した。NBの濃度は、供試材への腐食影響を考慮し0.0025 v/v%¹⁹⁾、培養温度は、供試微生物の増殖に適した303K²⁰⁾とした。実験終了後、試料表面の微生物付着状況を蛍光顕微鏡で観察した。形成された加工状況については、走査型電子顕微鏡(Scanning Electron Microscopy: SEM)、共焦点レーザー顕微鏡(Confocal Scanning Laser Microscopy: CSLM)により観察した。

3. 実験結果と考察

3.1 加工材への微生物試料の付着挙動

Staphylococcus sp.による銅の腐食機構は、エネルギー代謝活動で産生される物質が、*Staphylococcus* sp.の付着位置近傍に濃化し、環境を材料の腐食誘発環境に変えることに起因するとされる¹⁰⁾。この機構を効率的に再現するために、付着量の増加、安定した付着量の再現に有利な微生物試料の調整条件について検討した。

微生物の付着状況の評価は、浸漬終了後の試料表面の微生物を蛍光試薬アクリジンオレンジで染色し、それを蛍光顕微鏡で観察することにより行った。この方法によれば、微生物の付着状況をオレンジ色の発色で確認できる。

実験には、*Staphylococcus* sp.を復元後、二代まで継体培養し、復元後の微生物の状態が対数増殖期にまで到達したものを使用し行った。この結果が、Fig. 1(a)である。試料に微生物が点在している様子が確認できる。一方、Fig. 1(b)は、二代まで継体培養した*Staphylococcus* sp.を、銅試料に一度付着させ、付着したもののみを回収し、再度実験に供した結果（以下、この操作を銅試片付着処理(adhesion processing)とする。）である。付着量が前者よりも増大している様子が確認できる。

このような蛍光観察画像をもとに、単位視野面積に占める微生物の付着面積率を画像解析により求めた。付着面積率を、各条件20ヶ所の観察結果の平均値として整理したものを、Fig. 2に示す。銅試料付着処理の実施回数が増すほど、付着量には増加傾向が確認できる。

銅については、加工材に選定した無酸素銅も含め、一般に抗菌性金属としての作用が報告されており²¹⁾、実環境中においても、微生物の付着を抑制する効果が比較的大きいことが報告されている²²⁾。したがって、このような材料に付着し、微生物腐食を再現できる微生物は、必然的に銅の

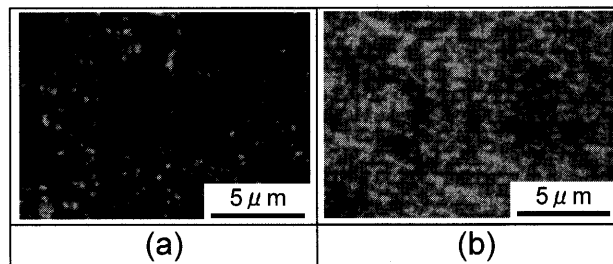


Fig. 1. Micrographs of bacteria on specimen observed by epifluorescence microscope (orange colored spots are adhered *Staphylococcus* sp.). (a) Test bacteria not proceeded the adhesion processing to copper plate. (b) Test bacteria proceeded the adhesion processing to copper plate.

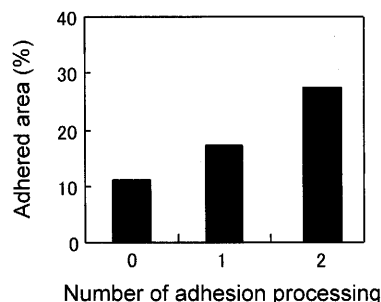


Fig. 2. Result of bacterial adhesion after each adhesion processing.

抗菌作用を受けにくい性状のものに限定されると考えられる。

対象とされた*Staphylococcus* sp.についても、微生物腐食の再現実験で、銅への腐食能力だけでなく、銅に対する付着量が他の微生物よりも著しく大きく、銅浸漬環境中においても生菌数が比較的安定に推移したことから、銅の抗菌作用を受けにくい傾向を示すことが確認されていた¹⁰⁾。しかし、付着量の増加を確認した今回の結果は、このような*Staphylococcus* sp.の特性が、銅試片付着処理により、さらに強化された可能性を示唆している。これについては、銅試片付着処理が、*Staphylococcus* sp.に対し、一種の順化(adaptation)として作用したためではないかと考えている。本検討では、銅試片付着処理に、*Staphylococcus* sp.の付着面積の増加を、加工プロセスの効率化を推進する因子として意識し、以下の検討では、銅試片付着処理を二回実施した*Staphylococcus* sp.を微生物試料として使用することとした。

3.2 加工装置の試作

Fig. 3に示す加工装置を使用し、微生物の付着位置を制御した条件下での実験を行った。

装置は、プラスチックチューブに注入した0.0025 v/v% NB寒天培地に、銅試片付着処理を二回実施した*Staphylococcus* sp.の培養液を1 mL接種し、そのチューブと加工材を銅ワイヤーで固定したものである。なお、実験開始時にプラスチックチューブ内の寒天中に固定される微生物の個

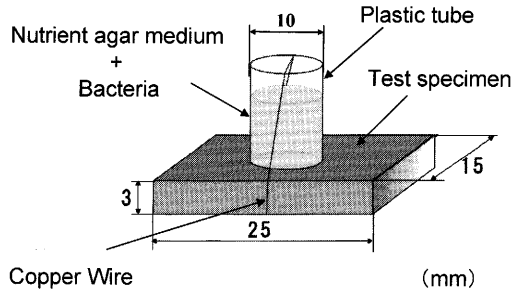


Fig. 3. Schematic illustration of the processing device.

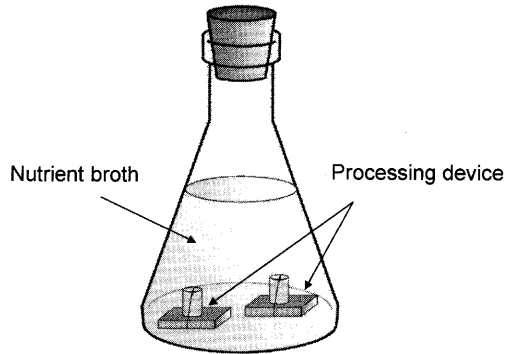


Fig. 4. Schematic illustration of the experimental set up.

体数は、およそ 10^8 cfu/mL レベルに調整した。実験は、Fig. 4に示すように、加工材を加工装置ごとと三角フラスコ内の培地溶液中に浸漬した状態で行った。

また、液体培地の濃度については、濃度を 0.00025 v/v% とした予備実験では十分な加工量が得られなかったため、 0.008 v/v% と 0.04 v/v% という二つの濃度を設定した。

濃度を 0.008 v/v% とした場合、 0.04 v/v% とした場合の実験後の加工材表面のSEMによる観察結果を Fig. 5に示す。結果は、加工時間を、 168 hとしたものである。*Staphylococcus* sp. を接種した場合には、表面に多数の孔食の発生を確認できる。孔食は、すべて加工装置内部の寒天培地と試料が接触した領域内部に発生していた。孔食の発生密度は、必ずしも高密度とはいえないが、加工装置により孔食の発生領域が制御されている印象が得られた。CSLMを使用した、孔食の深さ測定では、最大 $1\mu\text{m}$ 程度の深さが計測され、腐食進行が二次元方向だけでなく、深さ方向にも進展している様子が確認された。一方、*Staphylococcus* sp. を接種しない対照系の場合では、 0.04 v/v% の場合で、栄養源の化学成分の影響によると考えられる表面荒れが若干確認できるが、孔食の発生は確認されなかった。したがって、本検討で確認された、孔食は、*Staphylococcus* sp. の作用により形成されたものであることは明らかである。そこで以下では、これらの孔食を、加工痕と表記することとする。

Fig. 6に、加工痕の発生領域の面積率（以下、加工面積率と表記。）の経時変化を示す。これは、Fig. 5に示したようなSEM観察画像を、コンピューターに入力し、単位面

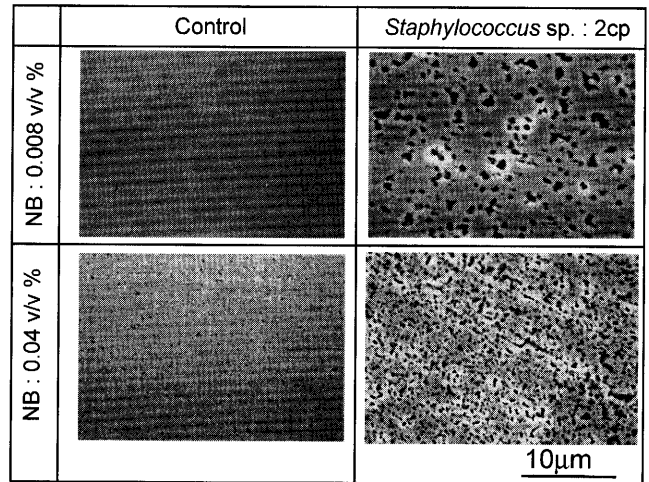


Fig. 5. SEM photomicrographs of test specimen after processing with *Staphylococcus* sp. (2 adhesion processing) for 168 h.

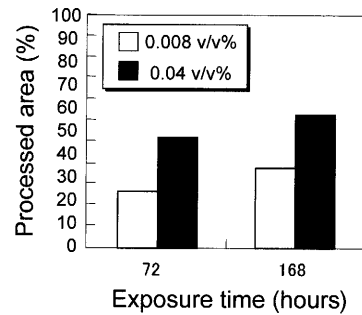


Fig. 6. Variation in total processed area after experiment with *Staphylococcus* sp. (2 adhesion processing).

積に占める加工領域が視野全体に占める面積の割合を求め、定量的な評価を行ったものである。加工面積率は、観察倍率を一定とした時の、無作為に選定した20視野の観察結果の平均値で整理した。加工面積率は、栄養源の濃度 0.008 v/v% および 0.04 v/v% 双方の条件で、時間経過に伴う増加傾向が見られるが、最終的に栄養源の濃度の高い 0.04 v/v% の方で、 0.008 v/v% に対し、 1.5 倍程の大きな加工面積率が確認された。このことから、栄養源の高いほうで、微生物の増殖、腐食物質の産生が活発であったことが示唆される。

ここで、腐食事例解析調査で考察された *Staphylococcus* sp. の腐食発生モデルについて触れる¹⁰⁾。環境中で、*Staphylococcus* sp. の固体表面への付着がおこる。付着した *Staphylococcus* sp. は、増殖過程でコロニーを形成し、コロニーは最終的にバイオフィーム²³⁾ という状態にいたる。*Staphylococcus* sp. の個体数が、それほど高密度ではない増殖過程初期では、周囲からの酸素の獲得も可能な状況にあるため、酸素呼吸によって代謝活動を行う。この時、炭水化物の資化により産生される物質が乳酸である。この乳酸により、銅表面はまず腐食影響を受ける。時間経過に伴い、*Staphylococcus* sp. の個体数が高密度化すると、環境中の酸

素が消費され嫌氣的となる。さらに、炭水化物も消費され、不足するようになると、*Staphylococcus* sp. は代謝活動を、呼吸から発酵へと切り替える。この時の、タンパク質の資化過程で産生されるアンモニアが、銅の腐食を著しく促進する物質として作用する。この段階では、バイオフィームは完全に形成されており、産生されたアンモニアは、バイオフィーム内部で濃化されるため、銅の腐食溶解が一層促進されやすい環境になっていると考えられている。すなわち、バイオフィーム内部には局所的な腐食環境が形成されており、銅の腐食溶解を進展させる生化学的反応層として機能している。

このように、*Staphylococcus* sp. の腐食機構とは、呼吸と発酵という二つの代謝過程に基づくものであるが、細分化すると、①銅表面への付着、②銅表面での増殖、③バイオフィーム形成、④バイオフィーム内部でのアンモニア生成・濃化、⑤創出された局所的な腐食環境における銅の腐食溶解、という5段階の反応プロセスに従って進行する機構と理解できる。本検討では、加工装置を使用することで、加工材の目標領域に高濃度の *Staphylococcus* sp. を含む寒天培地を接触させている。寒天培地は *Staphylococcus* sp. の増殖に十分な栄養源を含んでおり、*Staphylococcus* sp. は、増殖後もプラスチックチューブ内寒天表層および内部という限定された空間で増殖を続ける。寒天は、フラスコ内の液体培地から *Staphylococcus* sp. への養分と限定的な酸素の供給を可能にする一方で、嫌氣的環境の創出、産生されたアンモニアの濃化にも大きく寄与するものと考えられる。すなわち、寒天自体に人工的なバイオフィームとしての機能が期待できるため、付着から生化学的反応層の形成にいたるプロセスを、目標位置に人為的に再現する手法としても有効と考えられる。

3.3 加工位置を特定するためのレジスト手法

加工装置の使用により、*Staphylococcus* sp. の付着と増殖の位置を、目標領域へ制御できる可能性を示した。さらに、加工装置で規定した領域での加工痕の発生を確認した。これらの成果は、*Staphylococcus* sp. の増殖位置を予測し、その領域に微生物による加工を任意に再現できる可能性を示すものである。加工位置を特定するためには、*Staphylococcus* sp. の増殖位置、生化学的反応層の形成位置の制御性をさらに向上させる必要があるが、本検討ではレジスト手法に着目した。すなわち、加工装置で規定される領域内部に、加工領域を規定するためのレジスト領域を創出し加工実験を行った。今回、レジスト材には、油性マジックインクを使用した。栄養源の濃度は、NB 0.04 v/v%とした。

Fig. 7に実験結果を示す。Fig. 7(a)で、Stと確認される領域が、*Staphylococcus* sp. との接触を回避するためにレジストが形成されていた領域である。加工装置が接触していた内部は、このStと確認される領域を除いて、全体的に腐食影響を受け、表面が変色している様子が確認できる。

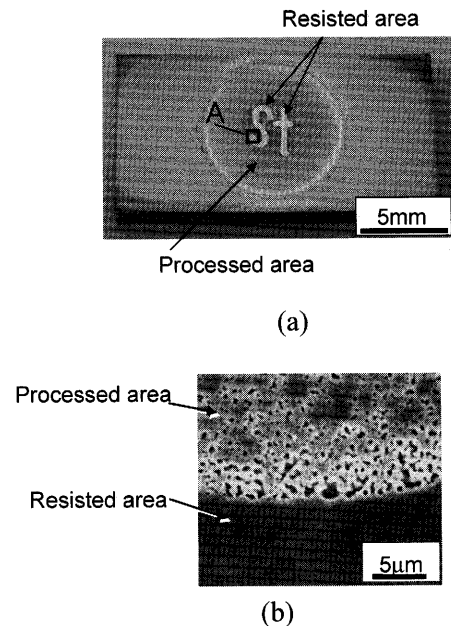


Fig. 7. Micrograph of test specimen after experiment with *Staphylococcus* sp. (2 adhesion processing). (a) Macro image. (b) Magnified view of area A.

Fig. 7(b)は、Fig. 7(a)でAと示した領域をさらに高倍率で確認した結果である。レジストで覆われていなかった領域には、多数の小さな加工痕が確認され、これらの集合体が、加工形状を形成している様子が確認された。さらに精細な加工形状を創出するためには、例えば加工痕の分布密度をさらに高密度化する等の対策が必要と考えられる。このためには、さらに高密度に *Staphylococcus* sp. 分布する領域を加工位置に創出する工夫が必要と考えられる。しかし、本検討結果は、*Staphylococcus* sp. を利用した銅の加工プロセスの可能性を実証する一つの結果である。

4. 結論

本研究で得られた知見は以下のようにまとめられる。

- (1) 生物の生化学反応を利用した材料加工プロセスとして、微生物誘起腐食を原理、原因微生物を加工工具とした材料加工プロセスという着想を新しく示し、これをバイオエッチングとして提案した。
- (2) 銅の微生物腐食事例解析調査を基に、原因微生物 *Staphylococcus* sp. を適用した、中性・好気性環境における銅のバイオエッチングを提案した。
- (3) 微生物試料とした *Staphylococcus* sp. に、銅試片付着処理を実施することで、銅への付着量を増加させ、生化学的反応層の早期形成に寄与できる可能性があることを確認した。
- (4) 本研究で考案した加工装置により、*Staphylococcus* sp. の付着位置、生化学的反応層の形成位置、さらには加工痕の発生位置を制御できる可能性を確認した。

(5) 上記手法実施下で、加工領域をレジストで特定した場合、銅を対象としたバイオエッチングの可能性が あることを確認した。

本研究は、2002年度(社)日本鉄鋼協会 鉄鋼研究振興助成および、2003年度 大阪大学21世紀COEプログラムの対象のもとに行われたことを付記し感謝する。

微生物学的検討に際し、種々の助言をいただいた関西大学工学部生物工学研究科教授 土戸哲明先生に感謝の意を表す。

本研究に協力をいただいた、大阪大学接合科学研究所 Knavillil Nandakumar 外国人COE研究員、廣谷恭三技術支援職員に感謝の意を表す。

文 献

- 1) Y.Uno, T.Kanaeda and S.Yokomizo: *Trans. Jpn. Soc. Mech. Eng. Series-C*, **59**-566 (1993), 293.
- 2) 千田信編著: 微生物資源工学, コロナ社, 東京, (1996), 1, 55.
- 3) T.Uno, S.Kanaeda, T.Yokomizo and Yoshimura: *Trans. Jpn. Soc. Preci. Eng.*, **62** (1996), 540.
- 4) A.Okada, Y.Uno, T.Kuno and Y.Kanaeda: *J. Soc. Precision Eng. (Jpn.)*, **68** (2002), 1585.
- 5) M.Kumada, T.Kawasum, S.Kobuchi, Y.Uno, S.Maeda and H.Miyuki: *Zairyo-to-Kankyo*, **50** (2001), 411.
- 6) Y.Miyano and O.Kamiya: *J. High-Temperature. Soc. Jpn.*, **27** (2001), 326.
- 7) Y.Kurosaki, M.Matsui and Y.Nakamura: *J. High-Temperature. Soc. Jpn.*, **27** (2001), 25.
- 8) Y.Miyano and Y.Kikuchi: *J. Soc. Powder Technol. Jpn.*, **41** (2004), 531.
- 9) Y.Miyano and Y.Kikuchi: *J. Adhesion Soc. Jpn.*, **40** (2004), 75.
- 10) Y.Kikuchi, M.Ozawa, K.Tohmoto, T.Kanamaru and K.Sakane: *J. Jpn. Copper Brass Assoc.*, **38** (1999), 160.
- 11) G.J.Licina: *Sourcebook for Microbiologically Influenced Corrosion in Nuclear Power Plants*, EPRI, Palo Alto, (1988), 3-1.
- 12) S.W.Borenstein: *Microbiologically Influenced Corrosion Handbook*, Woodhead Publishing, Ltd., New York, (1994), 50.
- 13) G.Kobrin: *A Practical Manual on Microbiologically Influenced Corrosion*, Vol. 1, NACE International, Houston, (1993), 233.
- 14) J.G.Stocker, II: *A Practical Manual on Microbiologically Influenced Corrosion*, Vol. 2, NACE International, Houston, (2001), 11.
- 15) Y.Kikuchi, K.Tohmoto, C.Okayama, F.Matsuda, M.Nishimura, K.Sakane and Y.Kaneko: *J. Jpn. Inst. Met.*, **61** (1997), 490.
- 16) Y.Kikuchi, M.Ozawa, K.Tohmoto, H.Ohnish and T.Anzai: *Tetsu-to-Hagané*, **88** (2002), 83.
- 17) Y.Miyano, M.Yamamoto, K.Watanabe, A.Ohmori and Y.Kikuchi: *Q. J. Jpn. Weld. Soc.*, **22** (2004), 448.
- 18) 菊地靖志, 小澤正義, 四方真治, 宮野泰征: 溶接学会全国大会講演概要, **69** (2001), 494.
- 19) T.Kanamaru: Msc Disseration, Osaka University, (1996), 52.
- 20) S.Shikata: Msc Disseration, Osaka University, (2001), 14.
- 21) Y.Kikuchi: *J. High-Temperature. Soc. Jpn.*, **29** (2003), 46.
- 22) S.Suzuki, K.Shiokawa and N.Hiramatsu: *J. Soc. Antibac. Amtifung. Jpn.*, **29** (2001), 433.
- 23) 森崎久雄, 大島広行, 磯部賢治編: バイオフィルム, サイエンスフォーラム, 東京, (1998), 50.