

# 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2報 (スタフィロコッカスを利用したバイオエッチングに関する研究)

宮野 泰征\*・坪沼 剛史\*<sup>2</sup>・大森 明\*<sup>3</sup>・菊地 靖志\*<sup>4</sup>

Micro Etching Process of Metals Using Microbial Metabolic Reaction (II)  
—Bio-etching of Metallic Copper by *Staphylococcus* sp.—

Yasuyuki MIYANO, Takeshi Tsubonuma, Akira Ohmori and Yasushi Kikuchi

**Synopsis** : The authors have been applying a microbial metabolic reaction that induces Microbiologically Influenced Corrosion (MIC) to develop a biological metal etching process (Bio-etching). Some kinds of bacteria that have the ability to induce corrosion on metals were detected through MIC failure case analysis. For example, *Staphylococcus* sp. is known to be able to induce corrosion on copper.

The mechanism of MIC of copper, related to *Staphylococcus* sp., is described in the following. First, the adhesion of *Staphylococcus* sp. on the surface of copper takes place. The bacteria then multiply and begin to form small patch colonies. At this point lactic acid, related to the beginning of the MIC process of copper, is produced. With further bacterial multiplication a bio-film is formed on the surface of copper and ammonia, which has a strong causticity to copper, is also produced, showing that further corrosion of the copper surface takes place.

In this paper, a study has been performed to investigate the effective application of the metabolic reaction of *Staphylococcus* sp. to bio-etching, by forcing microorganism to stick to the materials. It was confirmed that the formation speed of the adhesion area on copper, which has antibacterial function, had improved and that the processed area of the target zone could be defined with good accuracy. It was also observed that the corrosion takes place only in the small areas not covered by the protection resist. These results show that Bio-etching of metallic copper by *Staphylococcus* sp. is a very effective process.

**Key words** : micro-processing; bio-processing; bacteria; Microbiologically Influenced Corrosion (MIC); adhesion; biofilm; *Staphylococcus* sp.; copper; bio-etching.

## 1. 緒言

著者らは、加工原理に微生物腐食を適用したマイルドな環境下(常温、常圧、中性で材料への腐食影響が少ない環境下)での材料加工プロセスの開発に関する提案を行っている<sup>1,2)</sup>。前報<sup>2)</sup>では、微生物腐食事例解析で、銅の腐食原因微生物として特定された*Staphylococcus* sp.を加工用微生物とし、銅を対象としたバイオエッチングの可能性について検討を行った。すなわち、*Staphylococcus* sp.の純粋培養環境下での加工原理となる微生物腐食の早期再現、および腐食発生位置の制御の可能性について検討した。

*Staphylococcus* sp.が産生する代謝物質は、銅に対する腐食性を有する<sup>3)</sup>。これらの物質は、*Staphylococcus* sp.が付着後の増殖過程で形成するバイオフィーム(生物皮膜)内部に濃化される<sup>3)</sup>。これにより付着領域には局所的な腐食環境が創出され、腐食が進展する。この機構を、加工目標

となる位置に、効率的に再現することが加工プロセス実現の前提である。この時、良好な培養条件の選定、腐食の再現に十分な付着量の早期確保、加工対象への付着、増殖の位置あるいは規模の制御といったものが重要となる。しかし、加工材に選定した銅は、生物に対する毒性を持つため、微生物の付着、増殖も一般に抑制される傾向が示される<sup>4,5)</sup>。

前報<sup>2)</sup>では、銅試片付着処理により、*Staphylococcus* sp.の銅への付着親和性を向上させ、さらに試作した加工装置により*Staphylococcus* sp.の付着位置、増殖の規模を制御し、加工材とした銅表面に加工のための生化学的反応層を形成するプロセスを提案した。このようにして形成した生化学的反応層と加工材との接触領域をレジストにより物理的に制御することで、任意の加工パターンを創出できる可能性を示した。一方、加工プロセスとしての実現を目指す上では、より効率的かつ緻密に*Staphylococcus* sp.の生化学的反

平成17年5月26日受付 平成17年12月19日受理 (Received on May 26, 2005; Accepted on Dec. 19, 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:富士重工業(株))(Graduate School of Engineering, Osaka University, now Fuji Heavy Industries Ltd.)
- \* 3 大阪大学名誉教授 (トーカロ(株)技術顧問)(Professor Emeritus, Osaka University (Senior advisor, Tocalo Co., Ltd.))
- \* 4 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))

応層の形成が可能な手法を開発し、加工速度、加工精度を向上させることが課題として考えられる。現在まで、*Staphylococcus* sp.の生化学的反応層の早期形成を目的に、*Staphylococcus* sp.に電界を付加することで加工材表面に集積することを狙った試みが報告されている<sup>6)</sup>が、十分な加工痕を実現するまでにはいたっていない。

本報では、*Staphylococcus* sp.による銅の加工プロセスの効率化を目的に、銅表面への*Staphylococcus* sp.の生化学的反応層を形成させる方法を新しく考案し、その有効性について検討し、さらに微細な加工形状の創出を目的とした加工実験を行った結果について述べる。

## 2. 実験方法

### 2.1 加工材

実験には、無酸素銅を使用した。Table 1に化学組成を示す。サイズは15×15×3<sup>1</sup>mmとし、表面を、エメリー紙による湿式研磨の後、1 $\mu$ mのダイヤモンドペーストで鏡面仕上げしたものを加工材とした。アセトン脱脂、滅菌操作の後、実験に供した。滅菌操作は、70%エタノールへの浸漬滅菌により行った。滅菌後、エタノールは、クリーンベンチ内部で、UV照射条件下で十分に乾燥した。なお、後述する、レジスト処理材については、乾熱滅菌とした。

### 2.2 供試微生物

前報<sup>2)</sup>と同様に、銅の微生物誘起腐食の原因微生物として特定された*Staphylococcus* sp.を使用した<sup>7)</sup>。この微生物は、通性嫌気性微生物であり、中性環境を主な成育環境とする。

### 2.3 培養のための栄養源

培養のための栄養源には、Difco社製 Nutrient Broth (以下NBと記載する。)を使用した。Table 2に化学組成を示す。培地は、目的に応じて濃度を希釈・調整後、実験に供した。

### 2.4 実験温度

インキュベーター内で、303Kの温度制御条件下で実験を行った。

### 2.5 微生物試料の調整

実験の再現性を期す目的から以下に示す条件で前処理を行い、供試微生物の個体数・活性状態を調整した。

NBに1.5 w/v%の濃度で寒天を添加した寒天培地を作成し、線引き平板法<sup>8)</sup>により寒天に微生物を植え付けた。*Staphylococcus* sp.が対数増殖期<sup>8)</sup>を迎える、植え付け開始から24時間後を目安に復元のための培養 (一代培養)をおこなった。

前培養後の微生物を1白金耳採取し、試験管にいた滅菌蒸留水に懸濁させた。その後の希釈操作で、任意の個体数の微生物懸濁液を得た。その懸濁液を、pH 7、濃度0.0025 v/v%に調整したNB液体培地に植え付けた。震盪速

Table 1. 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 |

Table 2. Chemical composition of medium used.

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

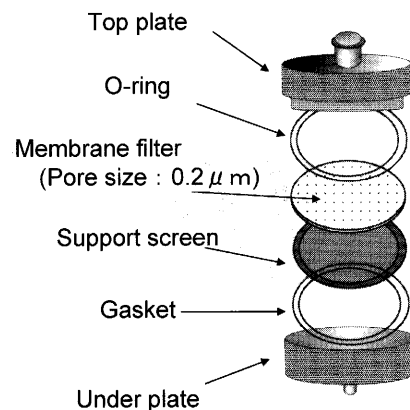


Fig. 1. Schematic illustration of the components of the filtering device.

度50rpmで24時間培養 (二代培養) したものを微生物試料とした。

一連の操作により、試料中の微生物個体数をおよそ10<sup>5</sup> cfu/mLレベルに調整したものを微生物試料とした。

### 2.6 微生物試料の加工材への接触方法

以下に示す方法で、微生物試料を加工材へ接触させた。外径 $\phi$ 25mm、ポア径 $\phi$ 0.2 $\mu$ mのメンブランフィルターを、Fig. 1に示したパーツで構成される、シリンジホルダーに固定した。次に、調整した微生物試料 (2.5で説明。) 20mLを、シリンジに採液し、シリンジホルダーを装着後、Fig. 2に示した方法で濾過した。この操作により、フィルター上に、1cm<sup>2</sup>あたり10<sup>6</sup>個体数レベルの*Staphylococcus* sp.の集積層を得た。

Fig. 3に微生物試料の加工材への接触方法を示す。*Staphylococcus* sp.の集積層が形成されたフィルター面を上向きにし、NB寒天培地に設置した。このときの寒天培地のNB濃度は0.008 v/v%とした。次に、加工材表面を下向きにし、微生物が集積したフィルター面に密着させ、*Staphylococcus* sp.集積層と加工材表面を、加工材の自重により密着状態に保持した。

ここで示した一連の微生物試料の加工材への接触方法を、以下では、強制密着法と表記する。微生物試料の加工材への接触時の外観をFig. 4に示す。

以上の操作終了後、加工材を設置したシャーレにフタを

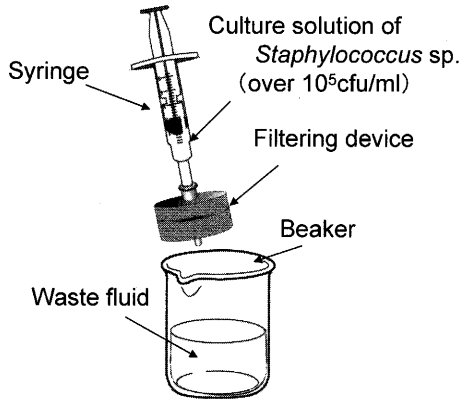


Fig. 2. Appearance of filtration for culture liquid.

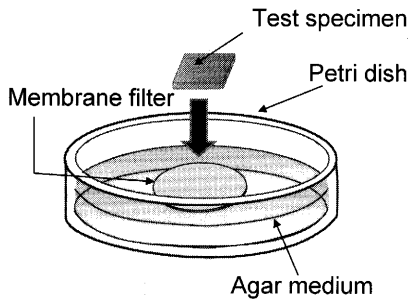


Fig. 3. Appearance of the experimental procedure for making microorganism compulsorily stick to material.

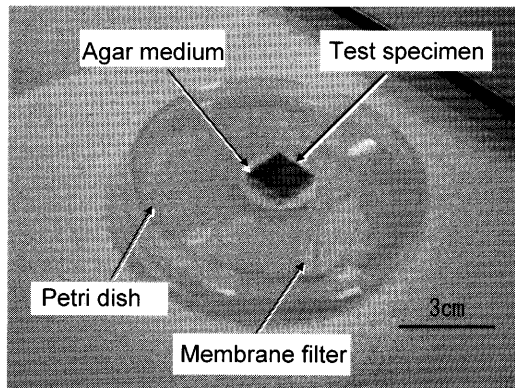


Fig. 4. Experimental setup for processing by *Staphylococcus* sp.

施し、インキュベーター中で所定の期間保持し、加工実験を行った。加工期間中の微生物の活性維持を目的に、微生物を集積したフィルターを3日ごとに新しいものに交換した。実験後の加工材への微生物の付着状況、加工面積、加工形状、加工深さについて検討を行った。加工への微生物の関与を明確にするために、微生物を接種しない対照系を設定した。

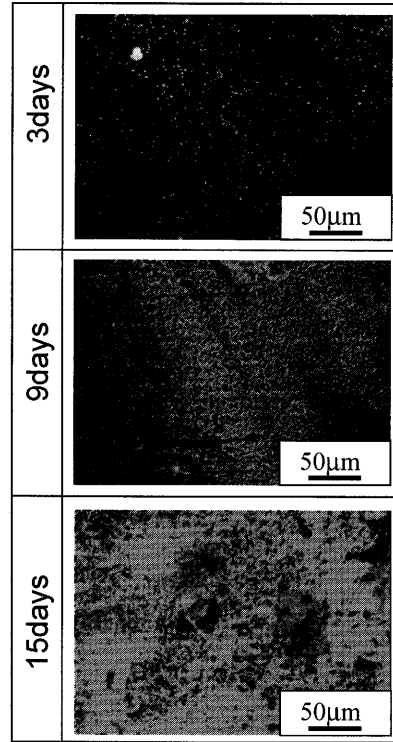


Fig. 5. Micrograph of bacteria adhered on test specimen observed by epifluorescence microscope.

### 3. 実験結果と考察

#### 3.1 強制密着法の有効性評価

Fig. 5は、加工材表面に付着した *Staphylococcus* sp. の蛍光顕微鏡による観察例である。観察には、実験期間の設定数に応じた試料を用意し、期間を終了したものから随時染色作業を実施した。蛍光試薬には、0.01 w/v% のアクリジンオレンジ溶液を使用した。試料表面の微生物の分布状況が、オレンジ色の発色で確認できる。試験開始から3日目の場合では、微生物はまばらに付着しているが、時間経過とともに微生物の付着領域が大きくなっていく様子が確認できる。期間が9日目以降の場合では、微生物が高密度で密集した領域（コロニー）が形成され、期間15日目の観察では、コロニーの直径が50µmを越える大きさにまで成長している様子が確認できる。

Fig. 6に微生物の付着面積率の経時変化を示す。蛍光顕微鏡観察画像を基に、画像解析を行った結果である。付着面積率は、蛍光観察において、観察倍率を200倍とした20視野を無作為に選定し、観察結果の平均値で整理した。計測区間毎の増加の速度には多少のばらつきはあるものの、付着面積は時間経過とともに終始増加傾向を示し、期間15日目のものでは約50%強にまで到達している。この結果は、付着後、増殖した微生物がコロニーを形成し、付着領域を継続的に拡大している様子を示すもので、加工期間中、*Staphylococcus* sp. が、フィルター越しに寒天培地から栄養源と水分を補給し、増殖活動を良好に維持していたこ

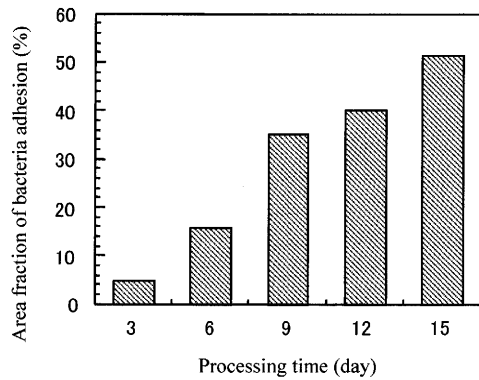


Fig. 6. Variation in total bacteria adhered area in the field of view as a function of time.

とを示唆している。増殖活動に伴う、付着領域の継続的な拡張は、加工材表面での微生物の活性が維持されていたことを示すもので、この時の微生物の代謝反応が活発であった可能性も大きい。これらのことから、強制密着法を適用することで、*Staphylococcus* sp.の付着を早期に実現し、また付着位置、増殖の規模を制御できる可能性があるものと考えられる。したがって、強制密着法を実施することで、前報<sup>2)</sup>で報告した銅試片付着処理という行程を経なくても、生化学的反應層を、速やか、効率的、かつ精度良く加工材表面に形成できる可能性があるものと考えられた。

### 3.2 加工量の評価

Fig. 7に実験後の加工材表面のSEM観察結果を示す。時間経過とともに表面に変色領域が形成され、その面積が成長する様子が確認された。変色領域内部、および近傍には、随所に数ミクロン程度の大きさの孔食の発生が確認された。孔食の発生個数、面積には、時間経過に伴う増加傾向も確認された。対照系には、処理期間中を通じて顕著な変化は確認されなかった。

Fig. 8は、CSLM (Confocal Scanning Laser Microscope: LASERTEC-1LM15W)を使用し、変色領域および孔食が認められた領域を観察し、深さ計測を行った結果の例である。Scanning lineと表示された部分の高低差の計測結果が、Detecting lineとして表示されている。変色領域内部に、深さを表示する波形の変動が顕著に認められる。深さは均一ではないが、最大7 $\mu$ mに達する領域も確認された。このことから、変色領域、孔食は、*Staphylococcus* sp.の作用により形成されたことは明らかであるため、孔食を加工痕、変色領域は加工痕を形成する前段階的兆候と考えていくこととした。

加工材の表面をSEM観察した際の、単位視野中に変色領域の面積、加工痕が占有する面積(以下、加工領域と表記)の割合を画像解析的手法によって求め、変色領域の面積率、および加工領域の面積率として定量的な評価を行った。結果をFig. 9, Fig.10に示す。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

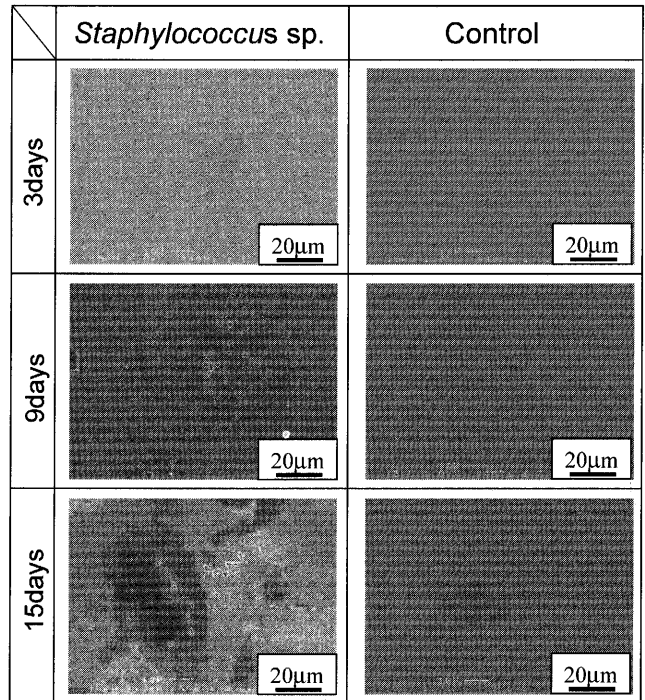


Fig. 7. SEM photomicrographs of test specimen after processing by *Staphylococcus* sp.

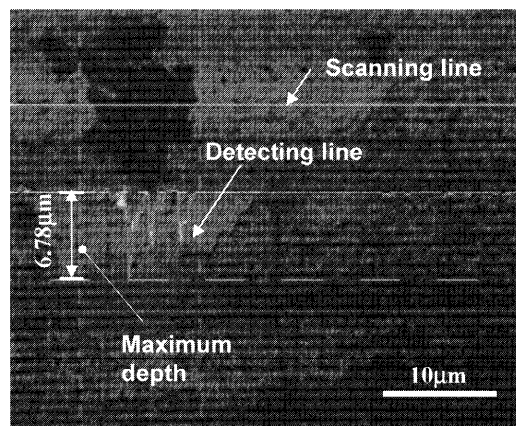


Fig. 8. Measurement example of surface profile after processing by confocal laser-scanning microscope (Lasertec-1LM15W).

果の平均値で整理している。変色領域、加工領域の双方で、時間経過ともなう増加傾向が確認された。すなわち加工材表面に密着した*Staphylococcus* sp.が、生化学反應層を形成し、時間経過とともに金属の溶解を促進していったことを示唆している。このことは、強制密着法の実施により、規定した領域内部に*Staphylococcus* sp.の生化学的反應層を形成させることで、形成される腐食領域の位置をある程度制御できることを示す結果で、加工領域が形成される区画を任意に制御できる可能性を示すものである。しかし、一方で、変色領域、加工領域双方の面積率増加の割合は、時間軸と共に、顕著に大きくなる傾向が確認された。これについては、以下のように考察している。すなわち、

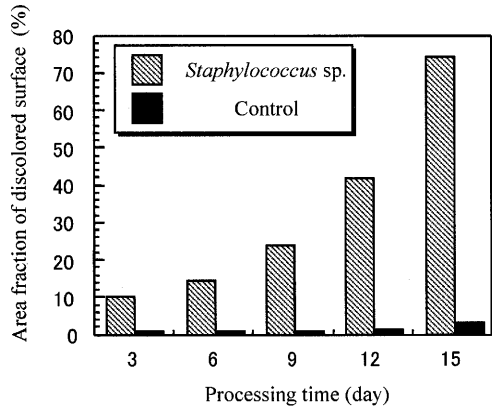


Fig. 9. Variation in total discolored area in the field of view as a function of time.

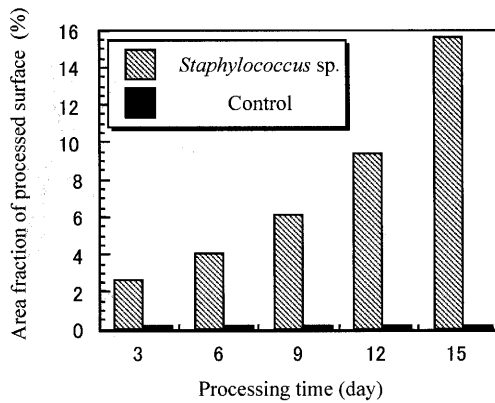


Fig. 10. Variation in total processed area in the field of view as a function of time.

*Staphylococcus* sp.の銅の腐食機能は、代謝過程初期の乳酸の産生、代謝過程後期のアンモニア産生の二つの代謝物質に由来するものである<sup>3)</sup>。この時、アンモニアの方が、乳酸よりも銅の腐食性に優れること、また、アンモニアの産生は、バイオフィーム形成下での増殖が飽和状態に達成し、環境が嫌気的な状態に推移した状態下で、*Staphylococcus* sp.の代謝機構が発酵に切り替わった際のものであるとの報告がなされている<sup>3)</sup>。したがって、変色領域、加工領域の広がり、時間軸の後半に推移するほど大きくなる理由は、*Staphylococcus* sp.が増殖後に発酵を開始するまでのタイムラグに起因するのではないかと考えられる。

### 3.3 レジストで規定した加工目標領域への除去加工実験

強制密着法を導入すると、加工領域が形成される区画を予測し、その区画内部に加工目標領域をレジスト処理で設定することが可能となる。ここでは、レジスト処理で加工目標領域を規定した加工材を対象に、加工実験を実施し、所定の加工形状の創出を目的とした検討を行った。レジストの作成には油性インクを使用し、スリット状に数百ミクロン程度の加工目標領域を規定した。Fig.11にレジスト処理した加工材の模式図を示す。実験終了後の形状観察、計測は、超深度形状測定装置(KEYENCE-VK8500)により

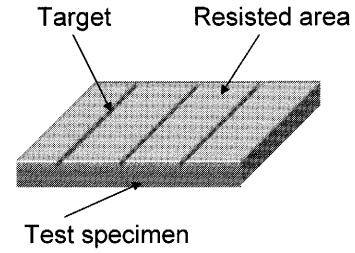


Fig. 11. Schematic illustration of resisted test specimen.

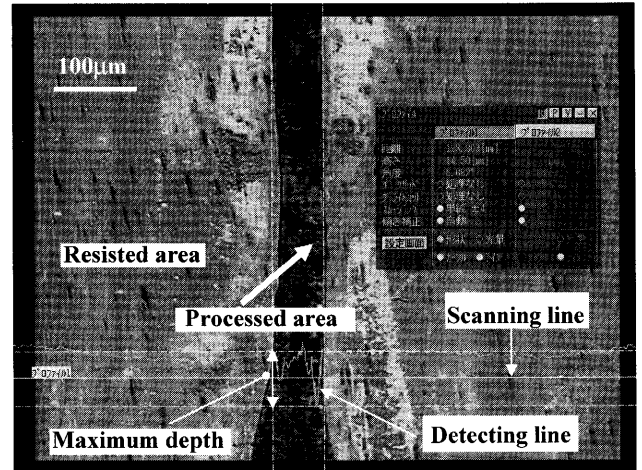


Fig. 12. Measurement example of surface profile after processing by confocal laser-scanning microscope (KEYENCE-VK8500).

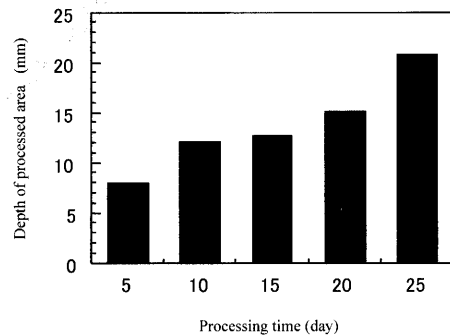


Fig. 13. Variation in depth of processed area.

行った。

Fig.12に、実験後の加工材表面の観察結果を示す。規定した加工目標領域には、変色領域が明確に形成されている。図中で、Detecting lineと表記される波形が、レジスト領域と加工目標領域の高低差を示している。このような測定を、各試料につき20個所で行い、計測された深さの最大値の平均を加工深さと定義し、時間経過との相関をグラフ化したものがFig.13である。加工深さは、試験開始後5日でも8μmに到達しているが、25日経過後でも20μm程度であり、それほど大きな進展は確認されなかった。

Fig.14に、25日経過後の加工材の表面観察結果を示す。視野中央部に確認される変色領域を画像解析機能により三

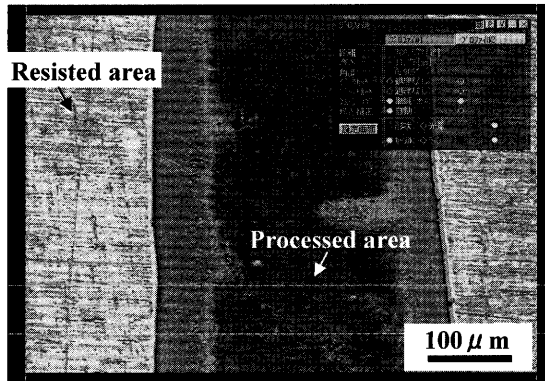


Fig. 14. Observation example of processed surface.

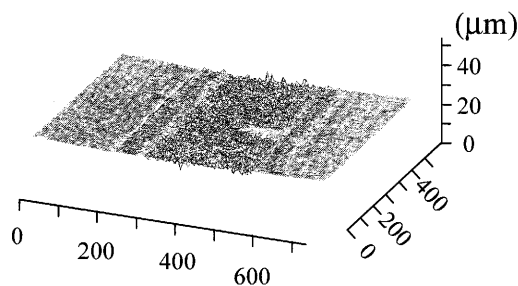


Fig. 15. Three dimensional image of processed surface.

次元イメージ化したものがFig.15である。表示される色彩の違いが、相対的な高低差の分布状況を示している。橙色で表示されている領域は、レジストが施されていた部位に対応し、一方、中央の青色の部分、周辺の橙色の部分よりも低いことを示している。これより、加工目標領域には、*Staphylococcus* sp.の作用により溝構造のパターンが形成されていることがわかる。

ここで確認された溝構造のパターンについて、構造内部の高低差を詳細に検討するために、超深度形状測定装置の画像解析機能により、溝横断方向に深さ計測を実施した。測定は、測定領域を任意に二区画選択し、区画ごとの高さデータの平均値を導出し、区画双方の相対的な高低差を比較する方法で行った。本測定においては、基準高さを設定するため、レジスト処理部から任意の単位区画を選択し、加工目標領域内に指定した単位区画当たりの高さの平均値との高さを比較した。加工形状の模式図を作成するために、溝横断方向に等間隔(50 μm)で計8カ所の領域を選択し、基準高さとの高低差測定を実施した。測定点をプロットすることにより、Fig.16に示す加工形状の模式図を作成した。周辺から中心部になるにつれ深くなる、緩やかな船底型の形状を示している様子が確認された。基準高さからの中心部の深さは約6 μmと計測され、加工幅に対する深さ方向への進展は大きくはない。

実環境における微生物腐食は、孔食を形成し、しばしば貫通孔を形成するとされる<sup>9)</sup>。このことから、深さ方向への腐食進展が速いことも、微生物腐食の特徴の一つと考え

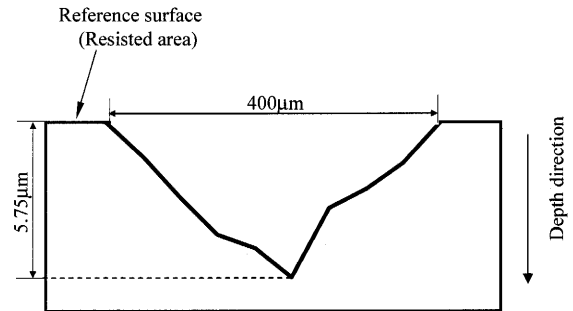


Fig. 16. Two dimensional topography of processed surface.

られている<sup>9)</sup>。今回の検討では、深さ方向への加工の進展の目安となるアスペクト比(この場合は加工幅に対する加工深さの比)は、それほど大きくはなく、また、加工形状についても舟底型の独特の形状を呈した。本検討におけるレジストで規定された加工目標領域は数100 μm程度であり、微生物一個体のサイズ(約1 μm)に対し、かなり大きなサイズであった。今後の研究の過程では、*Staphylococcus* sp.の銅に対する加工特性を理解することも重要と考えられるが、そのためにも、加工目標領域のサイズに対し、加工深さがどのような進展をするのかについて検証していきたいと考えている。

#### 4. 結言

実用材の一つである銅を対象に、バイオエッチングに関する検討を行った。すなわち、銅の腐食原因微生物として特定された*Staphylococcus* sp.を利用した加工プロセスの実現を試み、*Staphylococcus* sp.の加工材への接触方法の効率化、ならびに加工プロセスの効率化について検討し、さらにレジストで規定した加工目標領域への加工実験を行った。

- (1) *Staphylococcus* sp.の加工材への接触方法の効率化、ならびに加工プロセスの効率化を目的に強制密着法を考案した。
- (2) 生化学的反応層を加工材表面に速やかに形成させ、さらにその規模、形成領域を制御する方法として、強制密着法が有効であることを確認した。
- (3) 強制密着法により、*Staphylococcus* sp.が発現させる腐食位置、すなわち*Staphylococcus* sp.が形成する加工領域を制御できる可能性があることを確認した。
- (4) 強制密着法により創出された、銅表面と微生物との接触領域を、レジストにより制御することで、加工目標となる領域へ任意の加工形状を創出できる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。

本研究に協力をいただいた，大阪大学接合科学研究所 K. R. Sreekumari 外国人 COE 研究員，堀之内勉文部技官，塔本健次文部技官，廣谷恭三技術支援職員に感謝の意を表す。

### 文 献

- 1) Y.Miyano and Y.Kikuchi: *J. Soc. Powder Technol. (Jpn.)*, **41** (2004) 531.
- 2) Y.Miyano, S.Shikata, M.Ozawa and Y.kikuchi: *Tetsu-to-Hagané*, **92** (2006), 42.
- 3) Y.Kikuchi, M.Ozawa, K.Tohmoto, T.Kanamaru and K.Sakane: *J. Jpn. Copper Brass. Asso.*, **38** (1999), 157.
- 4) Y.Kikuchi: *J. High-Temperature Soc. Jpn.*, **29** (2003), 46.
- 5) S.Suzuki, K.Shiokawa and N.Hiramatsu: *J. Soc. Antibac. Amtifung. Jpn.*, **29** (2001), 433.
- 6) D.Kobayashi: Msc Disseration, Osaka University, (2000), 2.
- 7) Y.Kikuchi, K.Tohmoto, T.Kanamaru amd K.Sakane: *Zairyo-to-Kankyo*, **47** (1998), 468.
- 8) 微生物学入門編：R. Y. スタニエ, E. A. エーデルバーグ, J. L. イングラム, M. L. ウィーリス共著 (高橋 甫, 齊藤日向, 手塚泰彦, 水島昭二, 山口英世共訳), 培風館, 東京 (2001), 16, 96.
- 9) Y.Miyano and Y.Kikuchi: *J. Adhesion Soc. Jpn.*, **40** (2004), 75.