

# 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3報 (ステンレス鋼溶接部の微生物誘起腐食と加工への応用)

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

Micro Etching Process of Metals Using Microbial Metabolic Reaction (III)  
—Application of Microbiologically Influenced Corrosion of Stainless Steel Welds to Material Processing—

Yasuyuki MIYANO, Akira OHMORI and Yasushi KIKUCHI

**Synopsis :** Bacteria having the ability to produce corrosive pits on metal surfaces were detected from Microbiologically Influenced Corrosion (MIC) failure case analysis. The target of this study is to apply the corrosive ability of these bacteria to material processing.

In previous reports, the authors focused on *Staphylococcus* sp. and its ability to corrode copper. Those studies showed the possibility of bio-etching with *Staphylococcus* sp. by defining the processing area with a protective resist.

In this report, another strategy of bio-etching is described, i.e., to define the processing area by controlling the phase of the material.

One of the characteristics of MIC is that in stainless steel welds the corrosive attacks occur preferentially on certain phases. Applying this phase-preferential corrosion property to material processing lead to the new method of bio-etching, namely, the location of the processing area can be defined by controlling the metal structure.

The following experiments were designed to verify this idea. *Bacillus* sp. and *Pseudomonas* sp. were selected as the test strains. The optimal bio-etching parameters, the adhesion area of the bacteria as well as the change of pH of the culture medium were evaluated. A processing bioreactor prototype was then designed based on these results. Finally an experiment for bio-etching of stainless steel welds was carried out.

This study confirmed that bio-etching process is suitable for position selective etching, by controlling the metallic phase of the material.

**Key words :** material processing; microorganism; bacteria; metabolic reaction; Microbiologically Influenced Corrosion (MIC); adhesion; biofilm; *Bacillus* sp.; *Pseudomonas* sp.; stainless steel welds; preferential phase attack; bio-etching.

## 1. 緒言

著者らは、加工原理に微生物を適用したマイルドな環境下での材料加工プロセスの開発に着手し、これをバイオエッチングとして提案してきた<sup>1,2)</sup>。本材料加工プロセスは、微生物腐食の事例解析により材料ごとに腐食原因微生物を特定し、その微生物を加工用微生物として適用することを特徴としている。前報<sup>1,2)</sup>までの検討では、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た、銅の加工プロセスについて報告した。本報では、ステンレス鋼の加工プロセスについて検討する。

ステンレス鋼の腐食事例の解析調査では、好気性の従属栄養細菌の中からも、*Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp. などの腐食原因微生物が見つかった<sup>3,4)</sup>。これらの微生物は、有機酸生成微生物<sup>5)</sup>と類型されるもので、代謝反応時の有機酸の産生が活発であり、実験室規模での腐食再現実験で

もステンレス鋼への孔食を顕著に発生させることが確認されている<sup>3,4)</sup>。これらの微生物の腐食機構とは、産生された有機酸を、材料表面に形成させたバイオフィーム内部に蓄積・濃化させ、局所的な腐食環境を材料界面に創出させることに由来するものである<sup>6-8)</sup>。これらの微生物を加工用微生物に適用すれば、バイオフィーム内部でおこる生化学的反応を利用した、加工プロセスの実現の可能性があると考えられる。

一方、ステンレス鋼の微生物腐食では、溶接金属の二相組織に、組織選択腐食がおこるケースが知られている<sup>9,10)</sup>。オーステナイト相あるいはデルタフェライト相のどちらかが選択的に溶解し、スケルトンと呼ばれる特有の構造が出現する現象で、微生物腐食のメルクマールとしても知られている<sup>11)</sup>。既存の加工技術でこのような加工を実現することは極めて困難と考えられるが、微生物の腐食作用を利用すれば、このような金属の微細な組織に対応した複雑微細

平成17年5月26日受付 平成17年12月5日受理 (Received on May 26, 2005; Accepted on Dec. 5, 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 Osaka 563-8577)

\*2 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.))

\*3 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))

除去も可能と考えられる。これは、加工位置制御を、微生物ではなく、加工材の金属組織の制御により実現しようというアプローチである<sup>12)</sup>。

本検討では、高耐食性材料に類型されるステンレス鋼を加工対象としている。ステンレス鋼は、耐食性の高さ故に、ラボスケールで微生物腐食の再現を確認することが難しいとの報告が多い<sup>13,14)</sup>。そこで本報では、まず、生菌数、有機酸産生、付着などの微生物腐食の発生因子を念頭に、金属が溶解されやすい環境の構築に適した微生物の培養条件を求めるための検討を行った。次に、求められた培養条件下で、二相組織を持つ溶接金属を試料として用い、バイオエッチングによる金属の微細な組織に対応した複雑微細除去の可能性について検証を行った。

## 2. 実験方法

### 2.1 加工材

実験には、SUS304L鋼を使用した。Table 1に化学組成を示す。サイズは20×10×3mmとし、表面は、エメリー紙により、#1000までの湿式研磨を実施した。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、クリーンベンチ内部、UV照射条件下でエタノールを十分に乾燥した。

### 2.2 供試微生物

マイルドな環境<sup>1)</sup>(常温、常圧、中性で材料への腐食影響が少ない環境)下における、SUS304L鋼の微生物腐食事例<sup>3,4)</sup>より単離された、*Bacillus* sp.と*Pseudomonas* sp.を供試微生物に使用した。

### 2.3 培養のための栄養源

培養のための栄養源には、Nutrient Broth培地(Difco社製、以下NBと表記。)と、Polypepton-Yeast extract-Glucose培地(以下PYGと表記。)の2種類を使用した。NB、PYGともに中性環境に生育する微生物の培養に一般的に使用されるものである。各栄養源の基本濃度をもとに、濃度を4段階設定し、実験に供した。栄養源の組成をTable 2に示す。NB-1とPYG-2が各栄養源の基本濃度である。

### 2.4 実験温度

インキュベーターを温度制御し、298Kの条件で実験を行った。

### 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寒天培地を作成し、線引き平板法<sup>15)</sup>により各供試微生物を植え付けた。微生物が対数増殖期<sup>15)</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をおこなった。

濃度を基本濃度の1/1000、pHを7に調整したNBまたはPYGの各液体培地を、容量200mLのErlenmeyerフラスコに

Table 1. Chemical composition of test specimen (mass%).

C	Si	Mn	P	S	Ni	Cr
0.013	0.61	0.92	0.031	0.003	9.46	18.41

Table 2. Chemical composition of medium used (g/L). (a) Nutrient broth medium (Difco). (b) Poly peptone-yeast extract-glucose medium.

(a) Nutrient Broth Medium (Difco)

	NB-1	NB-2	NB-3	NB-4
Beef extract	3.0	0.3	0.03	0.003
Peptone	5.0	0.5	0.05	0.005

(b) Poly Peptone-Yeast extract-Glucose Medium

	PYG-1	PYG-2	PYG-3	PYG-4
Glucose	5.0	0.5	0.05	0.005
Yeast extract	1.0	0.1	0.01	0.001
Poly peptone	5.0	0.5	0.05	0.005

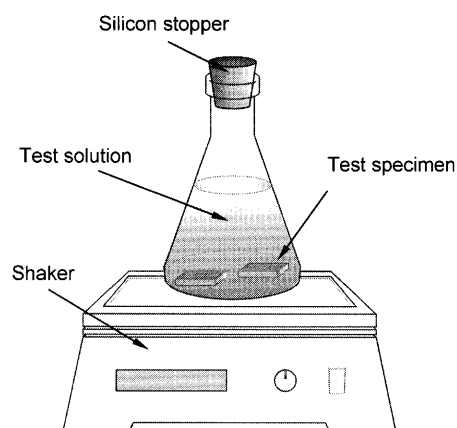


Fig. 1. Schematic illustration of test apparatus for cultivation of bacteria.

150 mLずつ用意し、復元後の微生物を1白金耳採取し植え付けた。これを、振盪速度85 rpmで24時間培養したものを微生物試料とした。

### 2.6 浸漬実験

NB、PYGの各栄養源、濃度の溶液を容量200 mLのErlenmeyerフラスコに150 mLずつ用意した。それらに、微生物試料を1 mL注入した。試料は水平上向きとなるように設置し、温度298K、振盪速度85 rpmの条件で、所定の期間浸漬した。外観をFig. 1に示す。浸漬期間中のpH値の測定および微生物の付着挙動の観察、供試液中の微生物固体数の測定を行った。

## 3. 実験結果および考察

### 3.1 試料表面への微生物の付着状況

Fig. 2とFig. 3は、試料表面への微生物の付着状況の、蛍

光顕微鏡による観察例である。いずれも実験開始から72h経過した時点の状況である。観察は、0.01 w/v%に調整したアクリジンオレンジで染色し、落射型蛍光生物顕微鏡(オリンパス社製 BX-50)を使用して行っている。B励起波長(波長420~490nm)下で観察を行った。微生物の付着領域が、NB-3よりもPYG-3場合で大きくなる傾向は、*Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp.の双方に共通している。*Bacil-*

*lus* sp.の場合では、細胞が凝集し、小さなコロニーが形成されている様子も確認できる。

観察画像を、顕微鏡搭載のCCDカメラを介してコンピュータに入力し、単位視野面積に占める微生物の付着領域を面積率(以下、付着面積率として記載。)として求めた。Fig. 4とFig. 5に、各供試液における72時間後の付着面積率を示す。結果は、各試料における10ヶ所での観察結果の平均値で整理している。

*Bacillus* sp.の場合、全般に、NBよりもPYGの場合で、大きな付着面積率が確認された。NB-4は、この微生物の腐食への関与を特定した解析時<sup>3)</sup>と同じ条件であるが、付着量はさほど大きくなかった。これに対し、PYG-3では、最も大きな付着面積率が確認された。このことから、PYG-3とした条件下では、腐食環境の形成が最も速やかであるものと推察される。ところで、NB, PYG双方で、濃度が最も高い条件で、付着量が最小の値となることが確認された。貧栄養状態において材料基板に付着しやすいことを指摘した報告<sup>17)</sup>と同様の傾向と考えられる。

*Pseudomonas* sp.の場合、PYG-2あるいはPYG-3で付着量が多くなる傾向が示されているが、*Bacillus* sp.の場合ほど、顕著な差は確認されなかった。最高濃度とした条件で、付着量が小さくなる傾向は、*Pseudomonas* sp.の場合でも確認された。

### 3.2 各培養条件下での微生物の代謝反応

Fig. 6に*Bacillus* sp.を、Fig. 7に*Pseudomonas* sp.を培養した際の各供試液のpHの経時変化を示す。なお、微生物未接種の場合では、NB, PYGの各条件において、pHが変化しないことを確認している。

PYGを栄養源とした条件では、PYG-4を除き、急激に

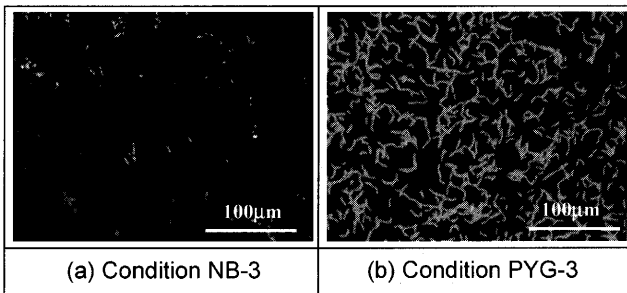


Fig. 2. Micrograph of *Bacillus* sp. adhered on specimen observed by epifluorescence microscope after 72 h incubation.

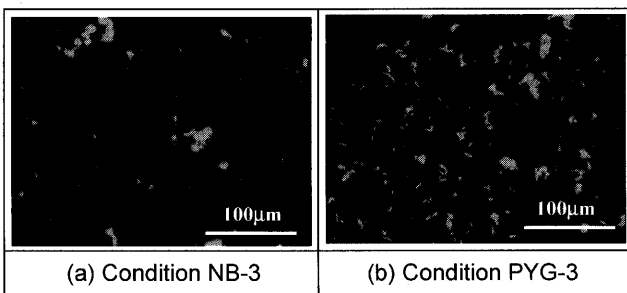


Fig. 3. Micrograph of *Pseudomonas* sp. adhered on specimen observed by epifluorescence microscope after 72 h exposing.

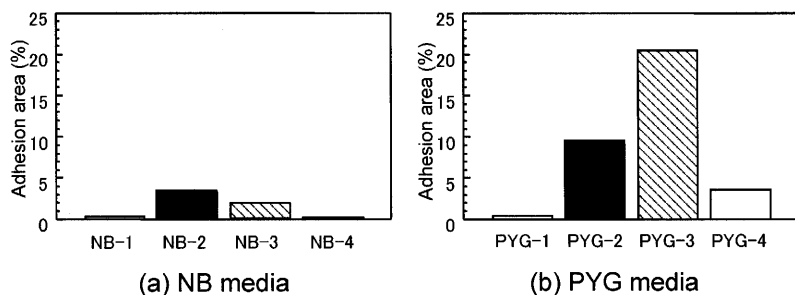


Fig. 4. Comparison of adhesion area of *Bacillus* sp. on test specimen in each condition of media after 72 h exposing.

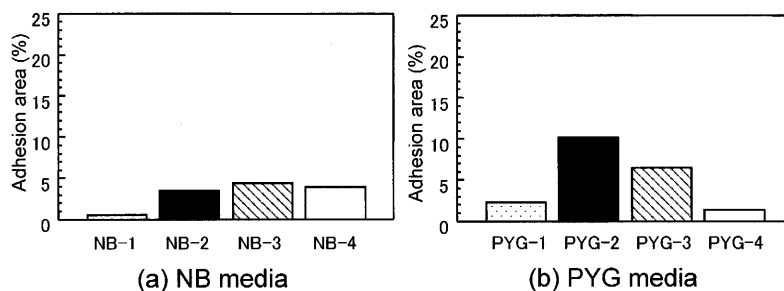


Fig. 5. Comparison of adhesion area of *Pseudomonas* sp. on test specimen in each condition of media after 72 h exposing.

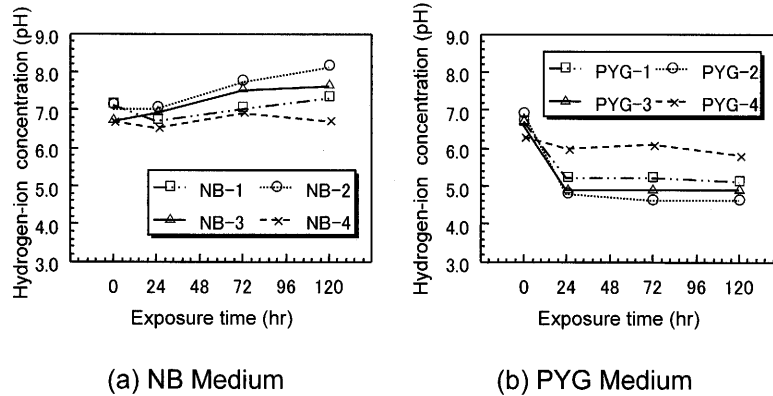


Fig. 6. Variation of pH in various culture media inoculated with *Bacillus* sp. as a function of exposure time.

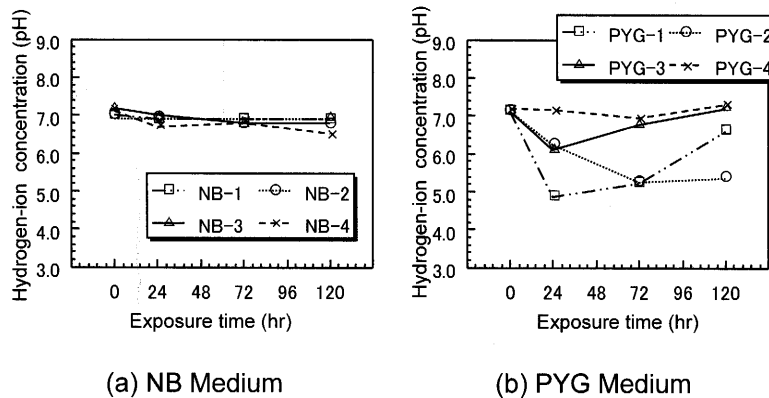


Fig. 7. Variation of pH in various culture media inoculated with *Pseudomonas* sp. as a function of exposure time.

溶液が酸性化する傾向が確認できる。NBの各条件では、このような変化は確認できない。顕著なpHの下降は、グルコースを成分に持つPYGの各条件に共通した現象である。グルコースの濃度が低いPYG-4の場合では、pHの下降の度合いも小さい。グルコースが関係する生命体の代謝機構としては、TCA回路（トリカルボン酸回路）が知られている<sup>17)</sup>。これは、生命体が有機酸を産生する代謝機構である。したがって、本結果は、培養液中のグルコースの作用で、微生物の有機酸の産生が促進された結果と考えられる。

微生物が生成する有機酸が、微生物腐食を発現させる主要な因子の一つと理解されることは周知の事実であるが、通常は微生物と材料の界面に形成される局所的な強酸性環境と関連づけて説明される<sup>6-8)</sup>。微生物誘起腐食の特徴の一つは、常温の中性環境に代表される、材料に極めて腐食性が少ない環境でも、大きな腐食速度が確認される点にある。本加工プロセスも、微生物誘起腐食の機構の応用を目指すものである以上、マイルドな環境<sup>1)</sup>下での加工プロセスの実現を目的としている。したがって、今回の検討で確認された供試液のpH値の下降の著しい条件を、必ずしも望ましいとは考えていない。しかし、当面は、耐食性に優れるステンレス鋼に対し、様々な微生物腐食の発生因子を念頭に、いかに迅速に腐食溶解を発生させるかを検討する

ことも重要な課題と位置づけられる。現段階では、pHの下降が顕著に確認された培養条件を、金属が溶解されやすい環境の構築に適したな微生物の培養条件の一つとして捉え、検討を進めていくこととした。

### 3.3 各培養条件下での生菌数の推移

Fig. 8に、*Bacillus* sp.の培養液中の生菌数の経時変化を示す。NB, PYGの双方の条件で、開始から24hまでの間に、生菌数の急激な増加が見られる。増加後、NBでは推移が安定であるが、PYGでは減少傾向が示されている。試料への付着面積率が最大となることを確認した条件：PYG-3に着目すると、生菌数は $10^1$  cfu/mL程度にまで減少する結果が示されている。中性環境を生育至適<sup>15)</sup>とする*Bacillus* sp.に対し、激しいpHの下降が、生育環境の悪化として作用したためと考えられる。

Fig. 9に、*Pseudomonas* sp.の結果を示す。NB, PYG双方の各条件で、開始直後からの生菌数の増加が確認できる。ピークに到達するまでの推移は、PYGの方が上昇の度合いが顕著である。増加後の推移に関してはNB-4で多少の減少傾向が見られるが、全ての条件で安定している。すなわち、*Pseudomonas* sp.の場合では、環境が酸性化するケースにおいても生菌数は依然維持される結果が示された。このような生育挙動の違いは、*Pseudomonas* sp.が持つグラム陰性菌としての特性と、*Bacillus* sp.が持つグラム陽性菌と

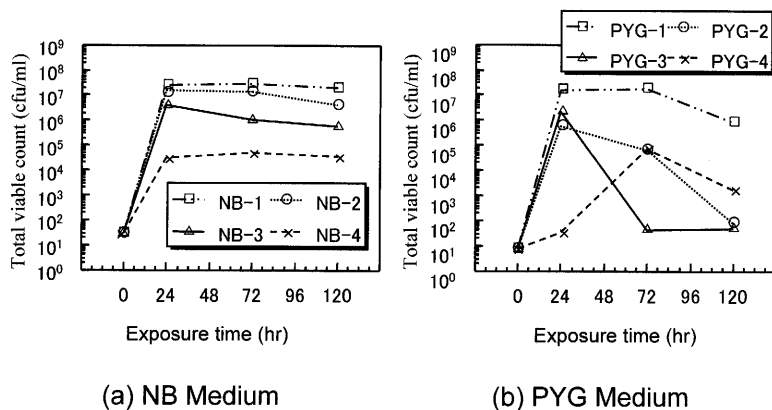


Fig. 8. Variation of colony forming units of *Bacillus* sp. in various experimental media as a function of time.

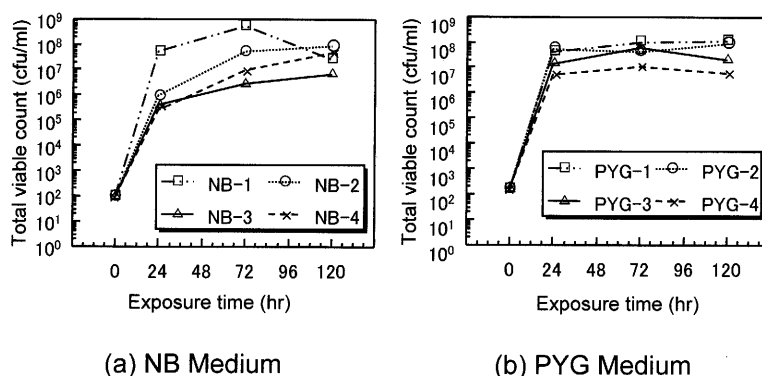


Fig. 9. Variation of colony forming units of *Pseudomonas* sp. in various experimental media as a function of time.

しての特性<sup>18)</sup>が反映された結果ではないかと考えている。すなわち、溶液中のpHの下降は生体に対し化学的なストレスの一種として作用すると考えられるが、グラム陽性菌は、一般に化学的ストレスに強いとの報告がある<sup>18)</sup>。このことは、*Pseudomonas* sp.でのみ、一度下降したpHが回復する現象にも関係すると推測している。この機構の詳細については検討の途中であるが、培養状況の目視による観察で、*Pseudomonas* sp.の培養でのみ顕著に見られた細胞外多糖類(EPS: Extracellular Polysaccharides)の影響を疑っている。EPSは、微生物細胞の固体表面への付着や、細胞の凝集に関与する物質である<sup>18)</sup>だけでなく、自己防衛ストレス応答の一種とも考えられており、環境からのダメージに対する緩衝機能についても報告されている<sup>6)</sup>。したがってEPSが、液体と接触することで、緩衝機能が発揮され、pHが回復に向かい生菌数が維持された可能性が考えられる。

### 3.4 加工実験および考察

微生物腐食の実験室レベルの再現実験では、微生物の付着が腐食発生の起点となることが確認されている。腐食の発生と、微生物の付着量や、バイオフィルムの形成個所とは良い相関が確認されている<sup>19-22)</sup>。この傾向は、好気性の付着性・有機酸生成微生物である、*Bacillus* sp.と *Pseudomonas* sp.でも確認されており<sup>20-22)</sup>、これらの微生物が、付着領域に、有機酸を濃化させた局所的な腐食環境を

創出し、材料を腐食溶解させている可能性を示唆する。

加工用微生物を、*Bacillus* sp.あるいは *Pseudomonas* sp.とした場合、栄養源をPYG-2あるいはPYG-3とした条件で、付着量が大きくなり、有機酸の産生も活発となることを確認した。このような条件の下では、微生物の付着領域が速やかに形成され、バイオフィルムの形成も速やかに進行するため、バイオフィルム内部への有機酸の濃化も促進されると考えられる。以下では、栄養源をPYG-3とした条件を、金属が溶解されやすい環境の構築に適した微生物の培養条件として捉え、加工実験の条件に使用した。

ところで、微生物腐食の機構を効率的に再現するためには、生菌数を確保し、微生物の活性を維持するという注意も不可欠である。フラスコ実験で、PYG-3を使用した条件では、時間経過とともに、生菌数が減少した点への配慮が重要となる。そこで、生菌数の維持を目的にFig.10に示す装置(循環型微生物加工装置と表記。)を試作し、これを実験で使用することとした。

装置は、培地供給用ボトル、廃液用ボトル、微生物反応槽で構成される。各容器はシリコンチューブで連結されている。培地供給用ボトルから微生物培養槽内への送液、微生物培養槽から廃液用ボトルへの廃液は、シリコンチューブ内の流量を、ペリスタティックポンプで制御することで、流量は、10~20mL/hとした。微生物反応槽

内の液量は300 mLとし、この溶液に、各微生物の培養済み調整液を2 mL注入し供試液とした。微生物反応槽の温度は、恒温槽内で298Kに保持した。

供試材には、SU304L溶接金属を使用した。溶接は、JISZ3221の被覆アーク溶接棒を使用し、手溶接、ビードオンプレートによりおこなった。機械加工により、20×10×3 mmの角型試料を作成し、表面をエメリー紙(#1000まで)で湿式研磨後、実験に供した。アセトン脱脂、エタノール滅菌処理、さらにバイオクリーンベンチ内、紫外線照射下での送風乾燥の後、微生物培養槽に観察面を水平、上向きに漬浸した。

Fig.11(a)にpHの経時変化を示す。*Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp.双方で、有機酸の産生が活発であることを示唆するpHの下降の様子が確認できる。

Fig.11(b)に生菌数の推移を示す。*Bacillus* sp.の場合、増殖後、pHの下降に対応した生菌数の減少が確認できる。一方、*Pseudomonas* sp.の場合、生菌数の増加速度は緩やか

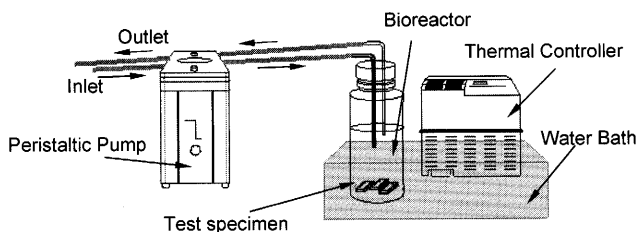
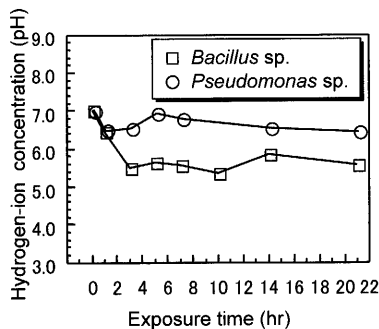
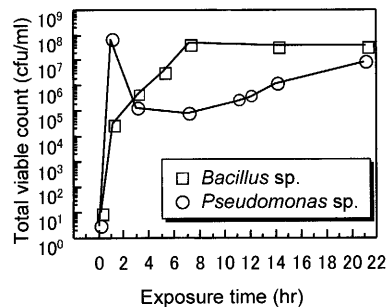


Fig. 10. Appearance of the prototype of bioreactor.



(a) pH



(b) Total viable count

Fig. 11. Variation of pH and total viable count of experimental medium as a function of times.

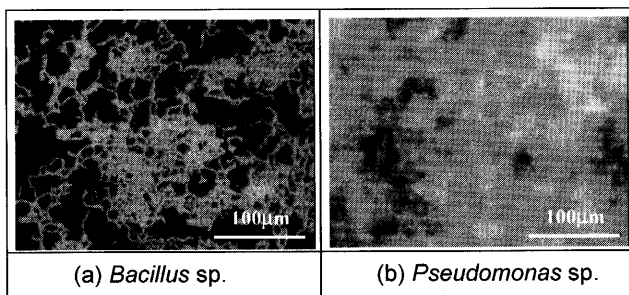


Fig. 12. Micrograph of microorganism adhered on specimen observed by epifluorescence microscope after 7 d processing in continuous flow culture.

であった。しかし、増加後の生菌数に関しては、双方で安定した推移の挙動を示した。これは、装置の廃液機構が、代謝物質の蓄積による培養環境の悪化を抑止している結果である。

Fig.12に、本実験系で7日間試験実施後の各供試微生物の付着状況を示す。Fig.13は、同一の実験をフラスコで実施した際の結果である。循環型微生物加工装置を使用した場合には、微生物の付着量は明らかに多い。

循環型微生物加工装置を使用した実験では、条件をPYG-3とした場合でも、*Bacillus* sp.および*Pseudomonas* sp.の生菌数を維持し、試料表面への微生物付着量に関しても良好な結果が得られることが確認された。また、有機酸の産生も活発であると推察される。循環型微生物加工装置を使用することで、金属が溶解されやすい環境の構築に適した微生物の培養条件の実現が可能と考えられた。

Fig.14は、浸漬終了後の試料表面のSEM観察結果である。直線状の研磨によるスクラッチ痕の中に、直径1~3 μm程度の孔食(以下、加工痕と表記)が分布している様子が確認できる。加工痕は、観察視野を選ばずに存在し、均一な分布傾向を示した。処理期間が経過しても、径が著しく成長した加工痕は確認されず、径自体が成長している様子もほとんど観察されなかった。一方で、いくつかの加工痕が複合化し、選択溶解<sup>9-11)</sup>の前段階と思われる形状が出現した場所も見つかった(Fig.15)。

観察倍率を1000倍とした場合のSEMでの観察結果を、

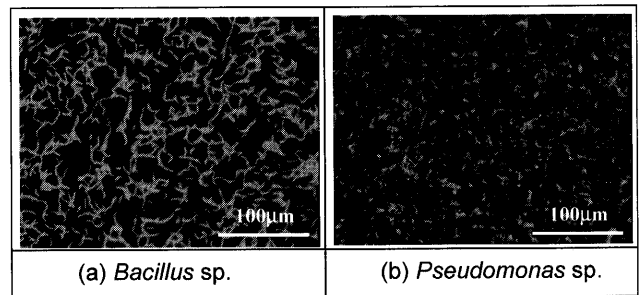


Fig. 13. Micrograph of microorganism adhered on specimen observed by epifluorescence microscope after 7 d processing in batch culture.

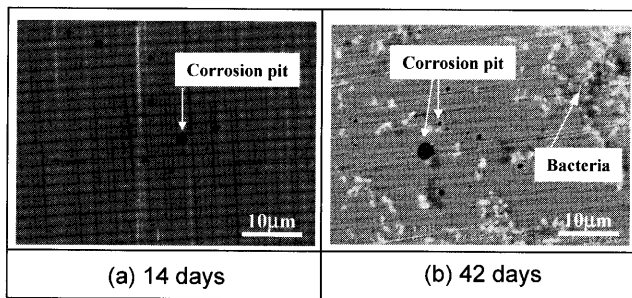


Fig. 14. Example of processed surface (*Bacillus* sp., SUS304L weld metal, polished surface processed hole (black spots, arrowed)).

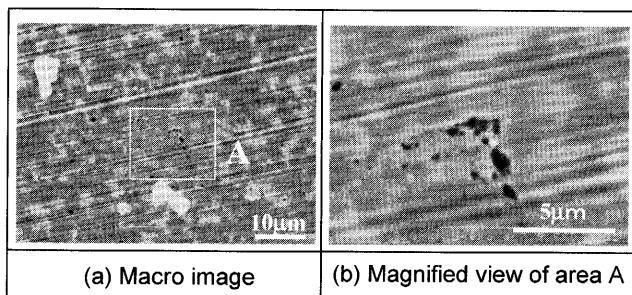


Fig. 15. Initiation of preferential dissolution on stainless steel weld (*Bacillus* sp., SUS304L weld metal, polished surface, 56 d processing).

コンピューターに入力し、単位面積あたりの加工痕（前述、直径1~3µmのものを対象。）の個数を、観察対象ごとに整理した。結果をFig.16に示す。各観察対象における5個所での観察結果の平均値で整理している。微生物の種の違いによる、加工痕の個数の違いは確認できない。しかし、時間経過に対し、加工痕が増加傾向を示すことはあきらかであるから、試料に見られた選択溶解<sup>9-11)</sup>の前段階と思われる形状については、選択溶解の起点を形成する可能性があるものと考えられた。

ここで、加工痕の深さ方向への進展の状況を確認するために、超深度形状測定装置(KEYENCE VK-8500)を使用し、深さ測定を行った。測定を1試料につき20個所実施し、計測された深さの平均値で整理したものがFig.17である。*Bacillus* sp.の方では200nm前後、*Pseudomonas* sp.の方では150nm前後と、*Bacillus* sp.の方が深い加工痕を形成する傾向が確認された。しかし、処理時間に応じて、深さはさほど大きくは変化していない。

*Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp.が試料表面に付着した領域には、バイオフィームが形成される。これらの微生物は有機酸生成微生物に分類され、バイオフィームを形成し、その内部には産生された有機酸を濃化させ、局所的な強酸性環境を構築することが知られている<sup>9)</sup>。この局所的な強酸性環境は、微生物腐食の発生に寄与する生化学的反応層<sup>1)</sup>とみることができる。すなわち、生化学的反応層が形成された金属表面からは、金属の溶解がおり加工痕が形成される。しかし、一方で、時間が経過すると、このような閉

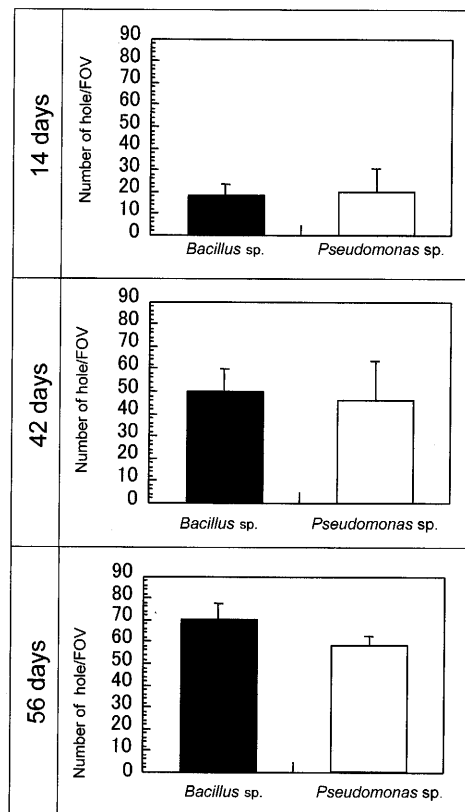


Fig. 16. Comparison of the total number of processed hole in the field of view (FOV) in each condition as a function of time.

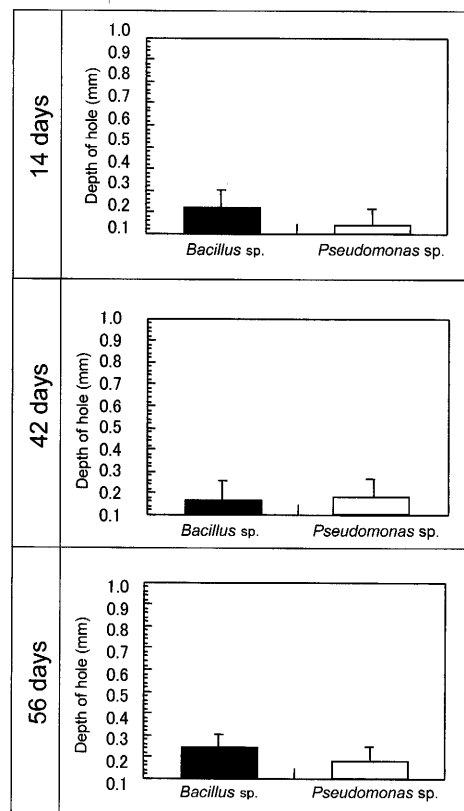


Fig. 17. Comparison of depth of processed hole in each condition as a function of time.

鎖的な環境では、微生物の呼吸活動に伴いしだいに嫌気的な環境に推移する可能性も考えられる。このような環境下では、好気性微生物である *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp. は、酸素の欠乏のため次第に活性を失ってしまうと考えられる。加工痕のスケールが、時間軸に対してそれほど大きな進展をみせなかった理由の一つには、このような微生物の活性の低下が原因ではないかと考えている。

循環型微生物加工装置の使用は、連続的な栄養源の供給により、有機酸産生を促進し、付着領域の早期形成の実現を可能とする一方で、代謝物質による環境の悪化を抑止し、生菌数を長期間維持することを可能とした。これらの微生物腐食発生因子を高次元で確立することで、耐食性が高く、再現実験での腐食孔の再現が困難なステンレス鋼に対し、多数の孔食（加工痕）を発現させ、前述加工装置の有効性を確認した。今後、さらなる加工量の向上を目指すためには、好気性の腐食性細菌が形成した生化学層内部に、硫酸塩還元菌のような腐食性を有する嫌気性細菌を共生させ、生化学反応によりおこる金属の溶解を加速させるような好気性および嫌気性細菌の複合環境を構築することが一つのアプローチになるのではないかと考えられる。すなわち、微細な金属組織構造を有するステンレス表面に、腐食性の細菌による機能的な複合環境を構築することで、組織選択溶解を迅速に再現し、複雑微細な形状の加工を実現できるものとする。

#### 4. 結言

二相の金属組織を有するステンレス鋼溶接金属を対象に、微細な金属組織の立体構造の創出を目標としたバイオエッチングに関する検討を行った。すなわち、ステンレス鋼の腐食原因微生物として特定された *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp. を対象に、金属の溶解が促進されやすい環境の構築に適した培養条件を求めた。得られた培養条件下での、微生物の作用による金属の複雑微細除去の可能性について検討を行った。主な結果を以下にまとめる。

(1) グルコースを含む栄養源を使用した条件では、*Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp. 双方の培養液の pH が低下すること、試料への付着量が多くなることを確認した。

(2) 有機酸の産生の促進、微生物の金属表面への付着を、微生物腐食の発生因子としてとらえる立場から、PYG-3 を培養液とした条件が、微生物の作用による金属の溶解誘発されやすい条件であると判断した。

(3) 加工プロセス中、微生物の有機酸産生による培養環境の悪化を抑止するという観点から、循環型微生物加工装置を試作し、その有効性を確認した。

(4) 循環型微生物加工装置により、微生物腐食が誘発

されやすい環境下で実験を行い、二相の金属組織を有する SUS304L 溶接金属を試料とし、その表面に、1~3 μm 程度の加工痕の出現を多数確認した。

(5) SUS304L 溶接金属表面に確認された加工痕は、時間経過に伴う増加傾向を示した。観察領域中には、これらが複合化し、組織選択溶解の前段階と思われる複雑な形状も確認された。

(6) 以上の結果から、微生物の作用による金属の複雑微細除去の可能性があると判断した。

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、塔本健次文部技官、中辻義弘文部技官、廣谷恭三技術支援職員に感謝の意を表す。

#### 文 献

- 1) Y. Miyano, S. Shikata, M. Ozawa and Y. Kikuchi: *Tetsu-to-Hagané*, **92** (2006), 42.
- 2) Y. Miyano, T. Tsubonuma, A. Ohmori and Y. Kikuchi: *Tetsu-to-Hagané*, **92** (2006), 48.
- 3) Y. Kikuchi, K. Tohmoto, C. Okayama, F. Matsuda, M. Nishimura, K. Sakane and Y. Kaneko: *J. Jpn. Inst. Met.*, **61** (1997), 486.
- 4) K. Yagi: Msc Dissertation, Osaka University, (2000), 2.
- 5) S. W. Borenstein: *Microbiologically Influenced Corrosion Handbook*, Woodhead Publishing, Ltd., New York, (1994), 31.
- 6) 森崎久雄, 大島広行, 磯部賢治編: バイオフィーム, サイエンスフォーラム, 東京, (1989), 49, 268.
- 7) Y. Kikuchi, M. Ozawa, K. Tohmoto, H. Ohnishi and T. Anzai: *Tetsu-to-Hagané*, **88** (2002), 84.
- 8) T. Tanji, T. Itoh, T. Nakano, K. Hori and H. Unno: *Corrosion*, **58** (2002), 232.
- 9) Y. Kikuchi and F. Matsuda: *Trans JWRI*, **25** (1996), 1.
- 10) J. C. Danko and C. D. Lundin: *Microstructural Sci.*, **25** (1997), 73.
- 11) Y. Miyano and Y. Kikuchi: *J. Adhesion Soc. Jpn.*, **40** (2004), 75.
- 12) Y. Miyano and O. Kamiya: *J. High-Temperature Soc. Jpn.*, **27** (2001), 326.
- 13) P. Gallagher, R. E. Malapas and E. B. Shone: *Br. Corros. J.*, **23**, 44 (1998), 229.
- 14) R. M. Kain: *Corrosion/79*, NACE Houston, (1979), paper no. 230.
- 15) R. Y. スタニエ, E. A. エーデルバーク, 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): *微生物学入門編*, 培風館, (2001), 16, 96, 291.
- 16) 木暮一啓: *微生物の付着と増殖のメカニズム*, 電気化学協会 海生生物汚染対策懇談会, (1987), 21.
- 17) *生化学辞典*: 今堀和友, 山川民夫, 東京化学同人, 東京, (1989), 345.
- 18) K. Isobe: *J. Surf. Sci. Soc. Jpn.*, **22** (2001), 653.
- 19) D. Walsh: *Corrosion/99*, NACE International, Houston, (1999), paper no. 188.
- 20) K. R. Sreekumari, M. Ozawa, K. Tohmoto and Y. Kikuchi: *ISIJ Int.*, **40** (2000), S54.
- 21) K. R. Sreekumari, K. Nandakumar and Y. Kikuchi: *Biofouling*, **17** (2001), 303.
- 22) H. Amaya, Y. Kikuchi, M. Ozawa, H. Miyuki and Y. Takeishi: *Q. J. Jpn. Weld. Soc.*, **19** (2001), 345.