

展望

バイオフィルムの形成と金属材料表面-5

バイオフィルムを利用した金属の微細加工 Micro Processing of Metals Using Biofilm

宮野泰征
Yasuyuki Miyano

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
VTTフィンランド国立技術研究センター
現：秋田大学 ペンチャービジネスラボラトリー 研究員

1 はじめに

自然環境中には多種多様な微生物が無数に存在している。微生物は単独で、あるいは相互に作用を及ぼしあいながら時には複雑な微生物共同体¹⁾ (バイオフィルム) を構築し、様々な活動を展開する。

近年、こうした微生物の活動を利用した微生物応用技術の開発が積極的に検討されている。食品酵素開発、新薬開発などはその代表であり、バイオテクノロジーと総称される。現在、バイオテクノロジーに関連する学術領域の研究は、様々な分野から高い関心を集めている。

これに対し、機械工学・材料工学系などの学術領域は、一般にバイオテクノロジーとは関連の少ない領域に位置してきた。しかし、これらの領域においても、生体材料開発などに代表されるように、バイオテクノロジーとの融合、あるいは境界領域創出を目指した研究の重要性が指摘されるようになって²⁾。

本稿の主題でもある、「微生物を利用した材料加工法」も、材料加工プロセスの分野からの新しい試みの一つである。このような加工形態は、宇野らにより最初に提唱され、既存の加工技術 (物理的加工法や化学的加工法)³⁾ に属しない新しい加工形態、すなわち生物的加工法として定義され、さらに、生物的除去加工法 (バイオマシニング)、生物的付加工法 (バイオデポジション)、生物の変形加工法 (バイオフィォーミング) の3類型が提案された³⁾。

このような「微生物を利用した材料加工法」とは、常温で効率的な生命活動を営む微生物の生体そのものを加工装置あるいは工具 (ツール) として利用しようとする新しいプロセスである。現在、産業界で実用化されている、物理的、あるいは化学的エネルギーの使用を基本としたプロセスにはない特徴⁴⁾ が期待される。主な特徴を以下にまとめる。

①加工変質層形成回避、低環境負荷

常温領域で効率的な生命活動を営む微生物を加工プロセスに利用しているため、加工温度を常温域に保持可能である。したがって、加工材への熱的影響・加工歪などの加工変質層の形成を回避できる。さらにエネルギー投入量、物質投入量の節約が期待できるため、総合的観点から地球に優しい、低環境負荷型の加工法としての可能性が期待される。

②新形態の微細加工

加工プロセスに用いる微生物のサイズは μm オーダーであるため、それらを加工単位として制御することができれば、新形態の微細加工の展開の可能性が開ける。

③様々な材料への適用の可能性

金属からプラスチックまで、様々な材料への適用の可能性が考えられる。

④加工速度向上への課題

微生物の生化学反応を利用したプロセスであるため、既存の加工技術に比べると加工速度が極めて緩慢である。律速条件の開拓等が課題となっている。

2 微生物を利用した材料加工法の研究状況

冒頭でもふれたように、この加工法については、1990 年代始めに宇野ら³⁾ による研究が最初で、この研究は、バイオリーチングで使用される *Thiobachillus ferrooxidans*⁵⁾ (以下、*T.ferrooxidans* と表記。) を用いて行われた。*T.ferrooxidans* は、鉄酸化細菌と総称される微生物の一種で、二価の鉄を三価の鉄に酸化する際に得られるエネルギーを利用して生存する。つまり、この微生物は、有機栄養源を一切使用せずに独立栄養的に生育する特殊な生体機能を持っている。この検討では、*T.ferrooxidans* の生体機能を金属の溶解現象へ応用して、除

去加工として適用するプロセスがバイオマシニングとして提案されている。同微生物による実験はその後、熊田ら⁶⁾、著者ら⁷⁾によっても展開された。

一方、黒崎らは、*T.ferrooxidans*以外の微生物の適用を検討している⁸⁾。中性海洋環境の微生物を対象（種類の特定はしていない。）に、自然海水中でおこる微生物の析出、溶解といった自然現象を適用したプロセスを想定している。常温、常圧、中性環境（以下、マイルドな環境と表記。）での加工プロセスを指向した検討を展開し、除去加工以外の可能性として、微生物の析出機構を応用したバイオデポジションの可能性を示した。

これらに対し、著者らが着目したのは、微生物腐食として知られる、微生物の活動により、マイルドな環境でも、材料が大きな速度で腐食、劣化を受ける現象⁹⁾を利用した加工プロセスである。著者らの研究グループは、微生物腐食の事例解析の過程で、腐食事例水中から微生物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¹⁰⁻¹²⁾。その中には、材料表面に付着した領域およびその近傍に、バイオフィルムを創出し、それを局所的な腐食環境として機能させる微生物がいることを確かめた。このような機構で発現する金属の腐食は、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る。このような知見をもとにした、微生物腐食を原理、原因微生物を加工装置とする新しい材料加工プロセスへの概念を、バイオエッチングとして提案した¹³⁻¹⁵⁾。中性・常温環境を雰囲気としながらも、バイオフィルムという局所的な腐食環境を利用する点が特徴である。

以上が、現時点でみられる主な報告例であるが、それらの概要を表1にまとめ、次の章では、加工例について述べていく。

3 微生物を利用した材料加工法による加工例

3.1 バイオマシニング

加工材表面に所定の加工形状のマスクをフォトリソグラフィで作成する。その後、加工材を*T.ferrooxidans*培養液中へ浸漬して所定の条件で一定期間震盪培養する。取り出し

後、試料のレジストを除去し、表面状況を触針式表面検査機で測定した。図1³⁾は純銅の場合の結果である。このように加工溝の形成が認められる。図2³⁾は各種金属を用いた時の加工量（溝の深さ）と加工時間（震盪培養期間）との関係を示す。加工量（微生物：ATCC13598は*T.ferrooxidans*）は時間に比例し増加している。微生物が存在しない場合（黒点）では、加工量は確認されない。加工量は10時間でそれぞれの金属で150～200μm程度である。この値で加工速度を直ちに論じることはできないとしても、既存の機械加工との比較からすれば遅い。この点を改善する手段として電界を付加する方法が試みられた。図3¹⁶⁾にその結果を示す。これによると陽極側は電界のない場合の約2倍の加工量となり陰極側はほとんど加工されていない。

バクテリアのない条件下で同じ電圧を加えた場合は電界研磨と同じ現象となり加工量は非常に少ない。このように電界付加の効果が認められる。バクテリアは一般にマイナスチャージを持つことが知られており、そのような性質とも関

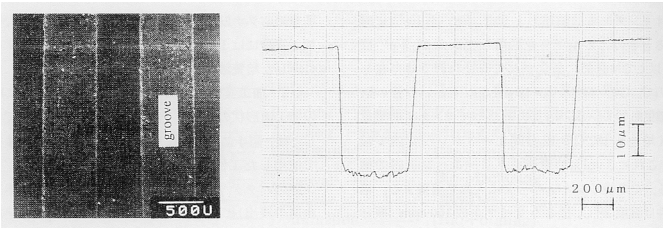


図1 バイオマシニングによる加工溝の測定例（加工材：純銅）

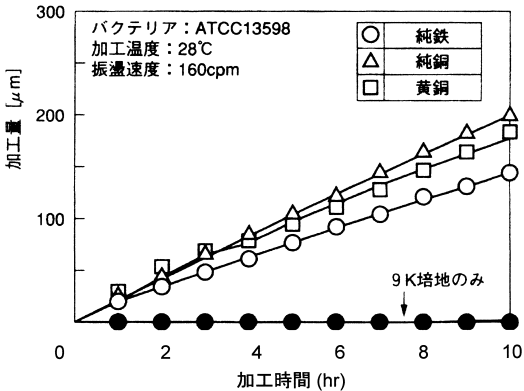


図2 バイオマシニングにおける加工時間と加工量の関係（加工材：純鉄、純銅）

表1 主な研究とその特徴

加工法	使用微生物	環境	対象材料	加工形態	特徴
バイオマシニング	<i>Thiobachillus ferrooxidans</i>	強酸性	炭素鋼/銅	除去	・バクテリアリーチング由来の微生物を利用
バイオデポジション	海洋性一般微生物	中性	鉄(マグネタイト)	付加	・自然海水中でおこる析出現象を利用 (微生物種を特定していない。)
バイオエッチング	微生物腐食原因微生物	中性	銅/ステンレス鋼	除去	・微生物腐食の発現機構を利用 (微生物種を特定)

連があるものと推定されている。

3.2 バイオデポジション

軟銅板を海水で腐食させ得られた黒錆（マグネタイト： Fe_3O_4 または FeFe_2O_4 ）と赤錆（ $\text{Fe}(\text{OH})_3$ ）の粒子について検討した結果を、図4⁸⁾に示す。滅菌海水を用いた場合、錆の生成量は赤錆が90%を越える割合である。有菌（海水中に微生物が生存している場合）では、黒錆の生成量は滅菌条件下に比べて著しく増加する。この条件に空気を通過すると赤錆および黒錆の生成量はさらに増加することが判る。得られた黒錆粒子について検討したところ、飽和磁化89emu/gが得られマグネタイトの標準値に近いことが判った。このような結果は微生物の新しい利用技術の可能性を示すものといえる。

3.3 バイオエッチング

3.3.1 *Staphylococcus* sp.を用いた銅の加工

Staphylococcus sp.を含む寒天培地をプラスチック製チューブに注入して銅に直接接触させる方法により、加工位置をコントロールして加工を行わせるものである。接触面は嫌気的な条件となりバクテリアの発酵によりアンモニアが生成されてそれにより銅を加工する。その模式図を図5¹³⁾に、

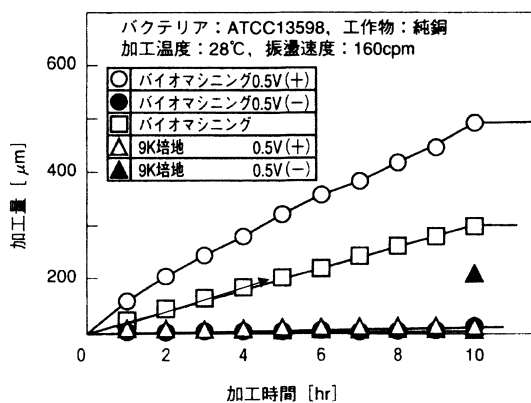


図3 バイオマシニングにおける加工時間と加工量の関係（加工材：純銅）

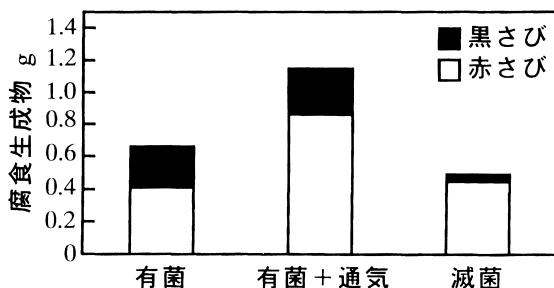
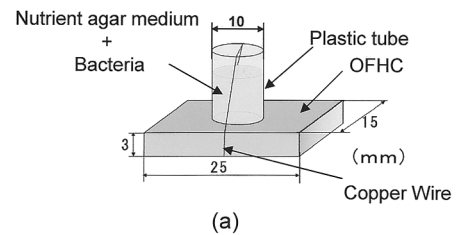


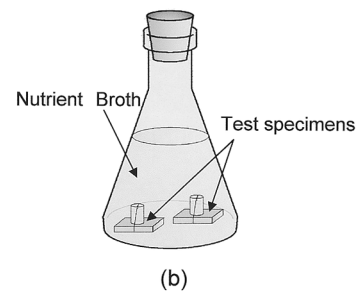
図4 軟銅の海水腐食試験で得られた生成物における赤錆および黒錆成分（材料：軟銅板 $50 \times 50 \times 0.8\text{mm}$ 、試験期間：60日、試験温度 25°C ）

加工結果を図6¹³⁾に示した。

図7¹⁴⁾は、メンブランフィルター上に *Staphylococcus* sp. のバイオフィームを人工的に形成し、加工材にこれに接触させることで、加工を行わせたものである¹⁴⁾。この方法によれば、バイオフィームが形成されるまでの培養時間を短縮できるばかりでなく、培養液を使用せずに加工プロセスを実現できる可能性がある。図8は、超深度形状測定装置による非接触の形状測定結果である。レジストで規定した加工目標領域には平均深さ約 $20\mu\text{m}$ の溝が形成されていた¹⁴⁾。著者は、

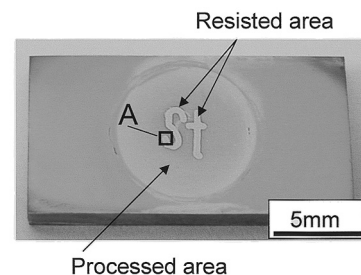


(a)

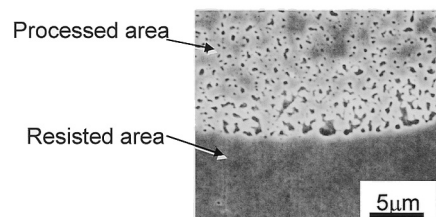


(b)

図5 バイオエッチングにおける実験の模式図 (1)
(a) 加工用試料
(b) 加工実験装置外観



(a)



(b)

図6 バイオエッチングにおける加工結果 (1)
(a) 加工実験後の加工材の全体像
(b) 加工位置の拡大像

このようなアプローチによる、マイルドな環境下における精密微細除去加工の可能性を目標としている。その一つとして取り組んだのが、光制御技術を用いた微生物による加工位置制御である。加工結果に関しては、予備検討の段階であるが、フォトリソ技術を用いた微細加工(図9)の可能性や、光殺菌による微生物反応層の微細制御の可能性(図10¹⁷⁾)についても研究を展開している。

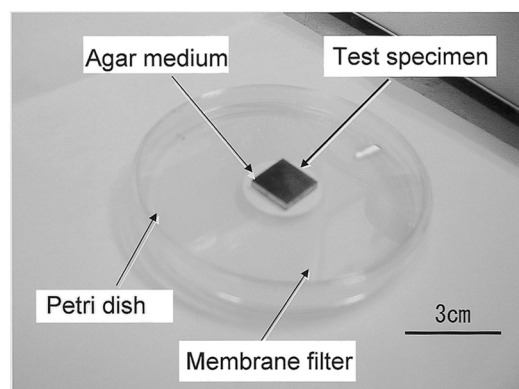


図7 バイオエッチングにおける実験の模式図(2)

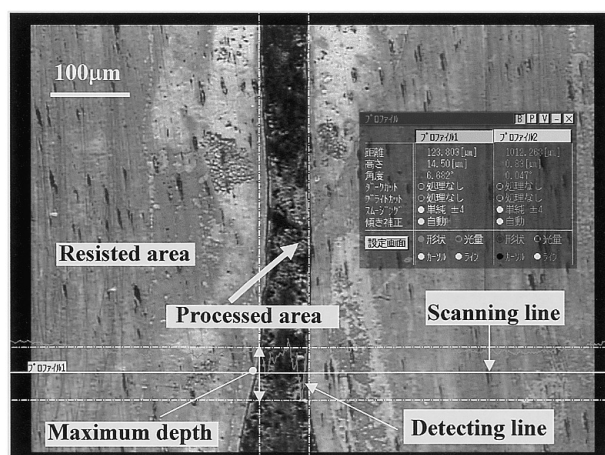


図8 バイオエッチングにおける加工結果(2)

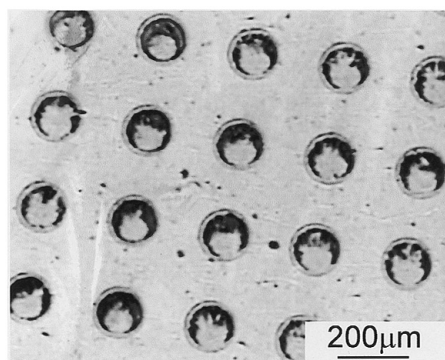


図9 光制御技術を用いたバイオエッチング
フォトリソによる被覆加工材表面に形成された加工痕
(φ100mmの円形の規則的な配列を除去加工により実現しようと試みた。)

3.3.2 腐食原因微生物を用いたステンレス鋼の加工

図11に、微生物腐食で確認されたスケルトン構造(オーステナイト相の組織選択溶解による。)を示す²⁾。このような金属組織に対応したポーラス構造を、微生物の作用で、人工的に創出すること(三次元複雑微細除去加工)が目標である。これまでに、ステンレス鋼を加工材とし、加工用微生物に *Bacillus* sp.および *Pseudomonas* sp.を使用した場合における、炭水化物を主成分とする培地を用いた場合の加工の優位性を確認した¹⁵⁾。加工量や加工速度を考慮した検討は今後の課題である。

4 おわりに

地球上に存在する微生物の数は非常に多く、その作用もまた千差万別である。この中から、我々が期待するプロセスの構築に有効な微生物の種類とその作用をどのように明らかにするかが、プロセス開発を展開する上での大きな鍵になると考える。

本稿では、微生物の有効利用に関する、材料加工プロセス

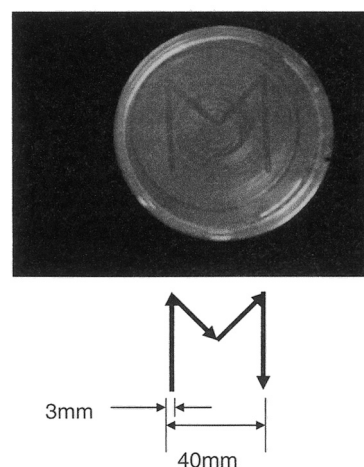


図10 光殺菌技術により形成した、微生物の生存・死滅領域のオンオフパターン(人工的に形成したバイオフィルム上に、紫外レーザー光を光ファイバーにより伝播することにより、微細な微生物の死滅領域を形成。(シャーレ中央部“M”))

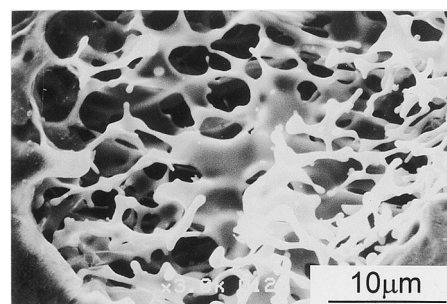


図11 ステンレス鋼の微生物腐食(オーステナイト相の組織選択溶解)

の分野からのアプローチの一つとして「微生物を利用した材料加工法」を紹介させていただき、著者らが展開する「バイオフィルムを利用した金属の微細加工」すなわちバイオエッチングについても述べさせていただいた。

著者らは、プロセスに有効な微生物の作用と種類を明らかにするための手がかりとして、微生物による金属材料の腐食解析に注目してきた。すなわち、研究室規模で事例水中から、その構成微生物を単離し、培養して可能性のある微生物を選択するという作業である。そして、実験室規模での再現実験で、微生物の持つ生化学反応を調べ、その中で金属加工に適した反応を持つ微生物を選択する方法の有効性を提案してきた。

しかしながら、加工に用いる微生物を1種類に特定することは非常に難しい。また、可能性を持つ候補の中から特定の微生物を選択できたとしても、その微生物が材料と反応する時の温度、培養条件をいかに決定するかが次の重要な課題となってくる。

もう一つは、反応速度の問題である。建造物等の構造体の腐食事故では異常な腐食速度と称されるまでに、微生物腐食の腐食速度は速く、規模も大きいとされる。しかし、実験室規模の再現実験では、一般に、速度、腐食孔の規模ともに実環境を大きく下回る。単離微生物という個々の微生物ではなく、バイオフィルムというような集合体の再現、解析に注意を払う必要性も考慮される。

著者は、日本学術振興会の制度で、昨年度、VTT フィンランド国立技術研究センターで在外研究を行った。ここでの一年間の滞在研究で、Non-Corrosive environment (非腐食環境 (著者らが言うマイルドな環境も含む。)) における、リアルタイム腐食モニタリングに関するプロジェクト研究に参画する機会を得た。

LPR (Liner Polarization Resistance) 等は、腐食速度のリアルタイムモニタリングに有効な方法として広く利用される手段であるが、非腐食環境下での精度的な信頼性については十分な議論がされていないとされる。

一方、非腐食環境下での腐食影響の評価には、腐食重量減少、あるいは金属溶出量の化学分析等が主体であり、実測値であるが故の信頼性はあるものの、莫大な検証時間を要してしまうという問題点がある。

微生物腐食の再現には、大きな時間の投入が不可欠とされる。また、微生物腐食の誘発因子とされる、温度、水質等の環境因子、ならびに微生物的因子 (個体数、バイオフィルムの生成状況) 等の組み合わせ (実験パラメータ) を逐一考慮すると、それらが膨大な数になることは想像に難くない。しかしながら、このような腐食因子の実態解明こそが、今なおもって不明点が多数あるとされる、微生物腐食の機構、なら

びに微生物腐食とバイオフィルムの関係の理解には極めて重要な要素となるのではないだろうか。今後の微生物腐食の更なる機構解明の進展、ならびに「微生物を利用した材料加工法」の進展、さらにはバイオプロセッシングの新展開のためには、微生物腐食の再現速度をリアルタイムで理解するための、電気化学的なアプローチが極めて有効な手段になるものと考ええる。今後の計測技術の確立を大いに期待したい。

謝辞

バイオエッチングに関する研究を行うにあたり、懇切丁寧なる御指導、御助言をいただいた大阪大学名誉教授 菊地靖志博士に深甚なる謝意を表す。光制御技術を応用したバイオエッチングを展開するにあたり、御協力いただいた、独立行政法人産業技術総合研究所 光技術研究部門 村井健介博士、西井準治博士に感謝する。

参考文献

- 1) H. Morisaki : Bull. Iron Steel Inst. Jpn, 12 (2007), 191.
- 2) Y. Kikuchi : Bull. Iron Steel Inst. Jpn, 12 (2007), 275.
- 3) Y. Uno, T. Kanaeda and S. Yokomizo : Trans. Jpn. Soc. Mech. Eng. Series - C, 59-566 (1993), 293.
- 4) 生産加工の原理, 日本機械学会編, 日刊工業新聞社, (1998), 301.
- 5) 微生物資源工学, 千田信編著, コロナ社, 東京 (1996), 55.
- 6) M. Kumada, T. Kawasumi, S. Kobuchi, Y. Uno, S. Maeda and H. Miyuki : Zairyo-to-Kankyo, 50, (2001), 411.
- 7) Y. Miyano and O. Kamiya : J. High-Temperature. Soc. (Jpn.), 27 (2001), 326.
- 8) Y. Kurosaki, M. Matsui and Y. Nakamura : J. High-Temperature. Soc. (Jpn.), 27 (2001), 25.
- 9) Y. Miyano, Y. Kikuchi : J. Adhesion Soc. (Jpn.), 40 (2004), 75
- 10) Y. Kikuchi, K. Tohmoto, C. Okayama, F. Matsuda, M. Nishimura, K. Sakane and Y. Kaneko : J. Jap. Inst. Met., 61 (1997), 490.
- 11) Y. Kikuchi, M. Ozawa, K. Tohmoto, H. Ohnishi and T. Anzai : Tetsu-to-Hagane, 88 (2002), 83.
- 12) Y. Miyano, M. Yamamoto, K. Watanabe, A. Ohmori and Y. Kikuchi : Q. J. Jpn. Weld. Soc., 22 (2004), 448.
- 13) Y. Miyano, S. Shikata, M. Ozawa, K.R. Sreekmari

- and Y. Kikuchi : Tetsu-to-Hagane, 92 (2006), 274.
- 14) Y. Miyano, T. Tsubonuma, A. Omori and Y. Kikuchi :
Tetsu-to-Hagane, 92 (2006), 280.
- 15) Y. Miyano, A. Omori and Y. Kikuchi : Tetsu-to-
Hagane, 92 (2006), 287.
- 16) Y. Uno, T. Kaneeda, S. Yokomizo and T. Yoshimura :
Q. J. Jap. Soc. Precision Eng., 62 (1996), 540.
- 17) K. Murai and Y. Miyano : Japanese Journal of
Applied Physics, 45 (2006) 8A, 6537.

(2007年5月10日受付)