

平成 23 年度修士論文

海洋微生物による銅粒子の析出作用



指導教員 松井正仁 准教授

三重大学大学院 工学研究科 博士前期課程
物理工学専攻 ナノプロセッシング研究室

藤井 聖耶

目次

第 1 章	緒論	-1-
第 2 章	関連する微生物の特徴	-3-
2.1	嫌気性微生物	-3-
2.2	微生物の重金属耐性	-3-
2.3	腐食原因微生物	-4-
第 3 章	過去の研究結果	-5-
3.1	堀場の研究	-5-
3.2	芦田，淡川の研究	-7-
3.3	山口の研究	-9-
3.4	間柄の研究	-11-
3.5	福島の研究	-14-
3.6	考察	-16-
第 4 章	実験方法	-22-
4.1	観察および測定装置	-22-
4.1.1	観察および測定装置の概要	-22-
4.1.2	観察および測定装置の使用法	-28-
4.1.2.1	pH メータの使用法	-28-
4.1.2.2	溶存酸素メータの使用法	-29-
4.1.2.3	パックテストの使用法	-31-
4.1.2.4	SEM の使用法	-31-
4.1.2.5	金属顕微鏡の使用法	-33-
4.1.2.6	表面粗さ計の使用法	-33-
4.2	供試材および試験片	-34-
4.2.1	供試材	-34-
4.2.2	試験片	-36-
4.3	試験海水	-36-
4.4	試験方法	-39-
4.4.1	試験装置	-40-

4.4.2	試験記号	-40-
4.4.3	試験手順	-41-
4.5	滅菌方法	-43-
4.5.1	滅菌装置	-43-
4.5.2	滅菌手順	-45-
4.5.2.1	乾熱滅菌器の使用方法	-45-
4.5.2.2	オートクレーブの使用方法	-45-
4.6	研磨方法	-46-
4.6.1	研磨装置	-46-
4.6.2	研磨手順	-46-
第5章	析出粒子の評価法	-47-
5.1	金属顕微鏡像の撮影方法	-47-
5.2	画像処理法	-48-
5.2.1	2値化手順	-48-
5.2.2	フィルタの2値化	-53-
第6章	実験条件及び結果と考察	-59-
6.1	基板酸化処理，クランプの影響	-59-
6.1.1	80mL, 15×15 mm ² 酸化無クランプ無試験	-59-
6.1.1.1	実験条件	-59-
6.1.1.2	実験結果および考察	-59-
6.1.2	80mL, 15×15 mm ² 酸化有クランプ有試験	-61-
6.1.2.1	実験条件	-61-
6.1.2.2	実験結果および考察	-61-
6.1.3	80mL, 15×15 mm ² 酸化無クランプ有試験	-63-
6.1.3.1	実験条件	-63-
6.1.3.2	実験結果および考察	-63-
6.1.4	80mL, 15×15 mm ² 酸化有クランプ無試験	-64-
6.1.4.1	実験条件	-64-
6.1.4.2	実験結果および考察	-64-
6.2	400mL 試験	-66-
6.2.1	実験条件	-66-

6.2.2 実験結果および考察	-66-
6.3 微生物作用の確認	-68-
6.3.1 滅菌試験	-68-
6.3.2 実験条件	-68-
6.3.3 実験結果および考察	-68-
6.4 銅イオン濃度の影響	-70-
6.4.1 実験条件	-70-
6.4.2 実験結果および考察	-70-
6.5 試験片の表面状態の影響	-73-
6.5.1 実験条件	-73-
6.5.2 実験結果および考察	-73-
6.6 試験片の表面状態，銅イオン濃度の影響	-76-
6.6.1 実験条件	-76-
6.6.2 実験結果および考察	-76-
6.7 試験片の表面状態の影響 ($R_z=0.05\mu\text{m}$, $3\mu\text{m}$ 基板)	-78-
6.7.1 実験条件	-78-
6.7.2 実験結果および考察	-78-
6.8 pH および溶存酸素濃度の測定	-80-
6.8.1 pH 測定結果	-80-
6.8.2 溶存酸素濃度測定結果	-81-
6.9 微生物の観察	-82-
6.9.1 生物顕微鏡による観察結果	-82-
6.9.2 SEM による観察結果	-83-
第 7 章 結論	-89-
参考文献	-90-
謝辞	-91-

第1章 緒論

近年、工業製品の小型化・高性能化が求められており、ナノ領域での微細加工が様々な製品に進化をもたらしている。半導体回路はその技術の恩恵を受けた最たるものであり、半導体回路の微細化に伴い高い微細加工技術が必要不可欠になっている。新聞やニュースでは“MEMS”という単語をよく目にするようになった。MEMSとは、Micro Electro Mechanical Systemsの略称であり、機械要素部品、マイクロセンサ、マイクロアクチュエータ、電子回路素子を一つの基板上に集積化したデバイスである。そしてこれらは、携帯電話、薄型テレビ、パソコン、自動車といった身近にある様々な工業製品をはじめ、精密機器や医療機器などありとあらゆる分野で利用されており、血圧計用の圧力センサ、車載用ABSの加速度センサ、インクジェットプリンタの微小ノズルなどは実用化されたMEMSの一つである⁽¹⁾。MEMSの加工技術には、加工精度が数nmのものまであり、特殊な加工法を用いているようにも思われるが、主要な加工法としては半導体回路の作成に用いられるようなエッチング加工などが挙げられるが、従来からある技術を発展させたものであり、高精度である反面、高コストになるという問題を抱えている。また、その用途も限られている場合が多いため、全く新しい原理に基づいた加工法の開発が必要になってきた。このための方策として、本研究室では微生物の機能を利用した微生物処理法（バイオプロセッシング）に着目した。

微生物機能を利用した材料処理には、①低エネルギー消費、②高エネルギー効率、③低コスト、④機能の多様性といったメリットがあり、各種研究が進められている。近年の研究例としては、熊田らによる好気性細菌の一つである鉄酸化細菌を用いて、金属材料の微生物腐食を善玉として金属の微細加工に利用する研究⁽²⁾や、宇野らによりバクテリアを利用する金属の生物的除去加工法として、バイオマシニングに関する基礎的研究、電界付加によって除去加工を促進する、電界付加バイオマシニングに関する研究⁽³⁾、宮野らにより*Staphylococcus* sp.を利用した銅の微細除去加工⁽⁴⁾、西川により淡水中における銅の微生物腐食⁽⁵⁾、Rongjun Zuoにより微生物を用いて金属腐食抑制のためのバイオフィルムの研究⁽⁶⁾が報告されており、銅およびアルミニウムの腐食原理が解明されてきている。また、微生物の金属材料への作用であるバイオリーチング（微生物の触媒および酸化作用により特定の金属元素を濃集する）の工業的利用法である、湿式製錬法における新技術開発がDavid B. Dreisingerにより報告されており、現在、世界の湿式製錬法による銅生産量は全体の約20～25%を占めるまでになっている⁽⁷⁾。

本研究室ではこれまで、微生物の材料生成機能に注目し、海洋微生物を利用して微細粒子を析出させるバイオデポジション（Micro-Biogenic Deposition, MBD）の研究を行ってきた。これは、中川⁽⁸⁾によって発見されたもので、微生物酸化処理を行なった無酸素銅板の基板の酸化皮膜上に、銅結晶体が析出する現象である。堀場⁽⁹⁾は、中川により発見されたこの現象に対する微生物の関わりおよび酸化膜と析出粒子の分析を行った。その結果、基板の酸化およびMBD試験に最適な温度条件を見出し、さらにEPMA分析およびEDX分析によ

って、析出した結晶が複数の結晶体からなる純銅の結晶体であることを確認した。また、山口⁽¹⁰⁾はMBDの再現性を改善するため、MBDが発現する条件を調べた。その結果、MBDに最適な実験方法および実験条件を見出した。さらに、基板の傷に沿った結晶粒子の析出が確認され、この現象を利用すれば、基板上の析出位置の制御およびマスク板を被加工材としたエッチングや表面加工に使える可能性があることが示された。一方で、間柄⁽¹¹⁾はMBDの試験条件を再検討した結果、今まで必須であると思われてきた基板の酸化処理の工程を省いてもMBDが発現することを見出した。そして、福島⁽¹²⁾は今まで必要とされてきた基板酸化処理はMBD発現の必要条件ではなく、阻害要因であることを示し、今までMBDが発現しなかった無酸素銅の試験サイズ $15 \times 15 \text{mm}^2$ でも条件によっては析出する事を見出した。

そこで本研究では、MBD生成メカニズムを解明することを主目的とした実験的研究を行い、このMBDを発展させて新しい材料処理法として活用することを最終目標とした。本研究では、MBDの発現条件をより詳細に求めるべく、基板サイズを変更し、MBDの発現に最適な基板処理条件についての検討、また、試験片の表面粗さの影響、銅イオン濃度の影響について検討した。

第2章 関連する微生物の特徴

2.1 嫌気性微生物⁽¹³⁾

MBD に関与する微生物は未だ特定されていないが、その微生物は嫌気性微生物であることが示されている⁽¹⁰⁾。ここでは、その嫌気性微生物について、文献(13)を引用して述べる。

O₂ 依存性を異にする微生物のうち、嫌気性微生物は生態学的にも特殊な地位を占めている。今、これら嫌気性微生物のエネルギー獲得法に注目すると、偏性好気性菌 (obligate aerobe) と微好気性菌はもっぱら末端電子受容体 O₂ とする酸素呼吸によって酸化的磷酸化を行っている。通性嫌気性菌 (facultative anaerobe) は、末端電子受容体をそれぞれ O₂ または NO₃⁻ として、好氣的または嫌氣的呼吸をする細菌群である。

嫌気性菌のうち、耐気性菌の *Sarcina* などは、もっぱら発酵的手段によってエネルギーを獲得する。また、偏性嫌気性菌には、硫酸還元菌 (*Desulfovibrio*, *Desulfotomaculum*) のように末端電子受容体を SO₄²⁻ または S₂O₃²⁻ とするもの、メタン生成菌のようにそれを CO₂ とするもの、あるいは *Bacteroides* の数種、*Clostridium formicoauticum* のようにフマル酸を還元するものなどがあり、これらはいずれも嫌気呼吸によってエネルギーを獲得する。そのほか、多くの偏性嫌気性菌は発酵を行う。そして、多くの偏性嫌気性菌は、紅色硫黄細菌や緑色硫黄細菌のような光合成細菌を含めて、低 Eh (酸化還元電位) を保つことが必要である。

微生物生態学的に興味のもたれる現象として、協同体 (consortium) と呼ばれる生活様式がある。これは、嫌気性菌と好気性菌が共生して、一方が O₂ を消費し、他方がその利益を受けるという片利共生的な場合である。メタン生成細菌 (嫌気性菌) が生成したメタンをメタン酸化細菌 (好気性菌) が利用する場合がそうであり、またルーメンや腸内でも嫌気性細菌その他の微生物が協同体生活を行っていることは注目すべきことである。

2.2 微生物の重金属耐性⁽¹³⁾

MBD は、微生物の持つ機能の中でも特に微生物の重金属耐性に関係が深いと思われることから、その機能についてここで述べる。

微生物は種々の重金属によって阻害されるが、一般に共有結合の強さが金属イオンの毒性と関係し、Hg²⁺, Ag⁺, Cu²⁺などは強い毒性を発揮する。

多くの微生物のうちには、重金属に対し細胞内に何らかの耐性機構を持つものが発見されている。芦田らによる酵母の銅抵抗性に関する遺伝生化学的研究 (Ashida, 1965) では、*Saccharomyces* または *S. ellipsoideus* を用い、Cu²⁺ に対してそれらを適応させていくと、1mM の濃度にも耐えるようになるが、その場合形成された集落は褐色をしている。このような銅耐性酵母は H₂S を生産し、細胞壁内部およびその直下に Cu₂S を沈着して、Cu²⁺ の細胞内侵入を防いでいる。銅耐性酵母では Cu²⁺ に接触後、細胞内に特殊な銅結合性蛋白質を誘導的に合成する。酵母と同様に、*Pyricularia oryzae* でも銅に耐性の株が見出されており、その菌糸は感受性株に比して H₂S 生産活性が著しく高いことが示されている。一方、*Penicillium ochro-chlorum* で Cu²⁺, Mn²⁺, Zn²⁺ に耐性を示し、Hg²⁺ や Ni²⁺ には感受性の高い株が見出されたが、この場合には、菌糸は過剰の Cu²⁺ を取り込まないような機構を備えていることがわかっている。

バクテリアリーチングでは、*Tiobacillus ferrooxidans* や *T. thiooxidans* などの鉄酸化細菌や無色硫黄細菌が高濃度の重金属と高い水素イオン濃度に耐えることが要求される。たとえば、*T. ferrooxidans* は Cu²⁺, Cd²⁺, Zn²⁺, Cr³⁺ などに耐性で、Hg²⁺ や Ag²⁺ に対しては感受性が高い、その重金属耐性機作については

未だ充分わかっていないが、鉄細菌の菌糸には銅蛋白質 (rusticyanin) が含まれており、この蛋白質は Fe^{2+} によって還元されることから、鉄 - チトクロム *c* 還元酵素であろうと推論された。

2.3 腐食原因微生物⁽¹³⁾

MBD 試験では基板を一定期間海水に浸漬して酸化処理を施し、バイオフィーム(生物皮膜)を形成させる。そこで、関係していると思われる腐食原因微生物についてここに述べる。

微生物誘起腐食に関係する微生物は主としてバクテリアとカビである。そして硫化物や硝化物を還元するもの、酸を生成するもの、および金属を酸化させる能力のあるものなどが材料の腐食に関わってくる。しかし、生物学的な活性がどう腐食過程に作用しているのか、バクテリアによる腐食が他の腐食機構とどのようにして明確に区別できるのかなど十分理解できていないといわれている。微生物誘起腐食で常にとりあげられ、悪名高いバクテリアは硫酸塩還元菌(SRB)で硫酸塩を硫化物へと還元する。硫化水素や鉄が供給されるときには黒色の硫化鉄を作る。この作用がカソード反応に影響する。硫黄あるいは硫化物を酸化する好気性バクテリアもいる。それらは硫化物を元素硫黄あるいは硫酸塩に酸化する際のエネルギーで生息する。

鉄酸化バクテリアは溶液中で 2 価の鉄を 3 価に酸化させる。水酸化鉄を生成してそれらが表面に沈殿して、さびこぶを作る。さびこぶの真下の小さな場所は嫌氣的な環境となる。さらにまた、さびこぶの下の嫌氣的な場所は SRB が生息する都合のよい場所となりその結果微生物誘起腐食の発生となる。

また、*Staphylococcus* sp. は銅の腐食原因微生物として特定されている。*Staphylococcus* sp. が産生する代謝物質は、銅に対する腐食性を有する。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内部に濃化される。これにより付着領域には局所的な腐食環境が創出され、腐食が進展すると考えられている。

第3章 過去の研究結果

本研究室ではこれまで、微生物の機能を利用して微細粒子を析出させるバイオデポジション (MBD, Micro-Biogenic Deposition) の基礎的研究を行ってきた。これまでの研究では無酸素銅板を用い、MBDにより銅結晶粒子を析出させるための最適条件を検討してきた。本章では、MBDに関するこれまでの研究についてまとめる。

3.1 掘場の研究⁽⁹⁾

掘場は、中川⁽¹¹⁾により発見された銅粒子の析出をバイオデポジション (MBD) として、この現象に対する微生物の関わりおよび基板の酸化膜と析出粒子の分析を行った。その実験結果について以下に示す。

- ① Cu イオン環境下において、微生物の活動および繁殖に最適な温度を求めた。20℃, 25℃, 30℃, 40℃の海水中に無酸素銅板試験片を10日間浸漬し、メンブランフィルター法を用いて微生物の数を測定した。その結果、30℃付近が最適温度とされた。
- ② ①の試験条件でそれぞれの温度における腐食状況と酸化膜の厚さが調べられた。各温度における腐食生成物の量は、温度が高いほど多く生成されていた。①の結果から、これは化学腐食による影響が強いと思われる。一方、断面をFE-SEMにより観察した結果、酸化膜厚さは温度が高くなるにつれて減少する傾向にあることがわかった。また、30℃の試験片断面の酸化皮膜部分をEDX分析したところ、酸化皮膜はCuとOの化合物および微生物によるバイオフィームで構成されていると結論された。
- ③ MBD試験が様々な条件で行われた。その結果を表3.1に示す。この結果から、酸化処理を行わなかったもの、試験片を研磨したもの、滅菌試験では析出は生じないことが明らかにされた。結晶体をEPMAにより分析した結果、結晶体は純銅であることがわかった。また、結晶断面をEDX分析した結果からも、結晶体が純銅であることが確認され、同時に結晶体は複数の結晶粒で構成されていることが明らかにされた。

③ 表 3.1 MBD 試験の試験条件および結果

試験 番号	試験 条件	試験片表面	フィルタ 有・無	酸化皮膜処理 条件・浸漬日数	試験温度	浸漬日数	結果
1	有菌	圧延面	有	処理なし	25℃	14 日	×
2	有菌	圧延面	有	有菌海水中 2 日浸漬	25℃	14 日	○
3	有菌	圧延面	無	有菌海水中 2 日浸漬	25℃	14 日	×
4	有菌	研磨面	有	有菌海水中 2 日浸漬	25℃	14 日	×
5	有菌	圧延面	有	有菌海水中 2 日浸漬	25℃	150 日	○
6	有菌	圧延面	有	処理なし	30℃	20 日	×
7	有菌	圧延面	有	有菌海水中 5 日浸漬	30℃	20 日	○
8	有菌	研磨面	有	有菌海水中 5 日浸漬	30℃	20 日	×
9	有菌	圧延面	有	有菌海水中 5 日浸漬	15℃	20 日	×
10	滅菌	圧延面	有	滅菌海水中 5 日浸漬	30℃	20 日	×

マスク：無酸素銅板

○：結晶体が析出した

×：結晶体が析出しなかった

3.2 芦田，淡川の研究⁽¹⁴⁾

芦田らは，MBDの加工条件を究明するとともに，MBDの析出作用に対する促進方法として，結晶体促進法を考案しその有効性を確かめた．その実験結果について以下に示す．

- ① 有菌・滅菌試験を行った結果，滅菌試験では析出が得られないことを確認した．
- ② 基板の酸化処理期間を1日と5日の2種類に分けて試験した．その結果，2つの間には析出状態に差がほとんど見られなかった．
- ③ 基板とマスク板のクランプ状態を，導電と絶縁に分けて試験した．その結果，絶縁したものからのみ析出が得られた．
- ④ 基板とマスク板の間が嫌気的な環境になっていることに注目し，マスク板を通常は無酸素銅板からガラス板に取り替えることで嫌気的な環境を作る促進法（ガラス法）が考案された．試験の結果，4週間の試験では析出が見られず，促進効果はないとされた．
- ⑤ 海水にあらかじめ銅板を浸漬しておき，通常よりも銅イオンを多く含む環境下で試験する促進法（Cuイオンの環境）が考案された．その結果，通常の試験期間より1週間早い期間で析出が見られ，促進法として有効であるとされた．
- ⑥ バイオリーチングの1つとして，黄鉄鉱（ FeS_2 ）から鉄酸化細菌の作用によって $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ に酸化され，この3価の硫酸鉄が硫酸銅（ CuSO_4 ）を生成し，この硫酸銅により銅が溶出されるという考えがある．そこで鉄イオンを含む雰囲気の水を用いてMBDを行うことで，銅結晶の析出のきっかけにするという促進法（Feイオンの環境）が考案された．試験の結果，促進効果は得られなかったが，マスク板側に析出する現象が見られた．鉄イオンがMBDの析出過程に対し何らかの影響を与えたものと思われる．
- ⑦ 鉄は銅よりもイオン化しやすいことを利用して，キルド鋼板を基板の外側に張り合わせることで鉄がイオン化した際，電子が基板に供給されることを狙った促進法（イオン化傾向）が考案された．試験の結果，促進効果は見られずかえって析出を妨げてしまう結果となった．

以上の結果を表3.2に示す．

表 3.2 芦田らによる MBD の試験結果

試験法	試験条件	酸化処理日数	クランプ方法	試験期間			
				1 週間	2 週間	3 週間	4 週間
有菌・滅菌	有菌	5 日間	絶縁	—	—	—	○
	滅菌	5 日間	絶縁	—	—	—	×
酸化膜厚さ	有菌	5 日間	絶縁	—	—	—	○
	有菌	1 日間	絶縁	—	—	—	○
クランプ方法	有菌	5 日間	絶縁	—	—	—	○
	有菌	5 日間	導電	—	—	—	×
従来の MBD	有菌	5 日間	絶縁	×	×	×	○
ガラス法	有菌	5 日間	絶縁	×	×	×	×
Cu イオンの環境	有菌	5 日間	絶縁	×	×	○	—
Fe イオンの環境	有菌	5 日間	絶縁	×	×	×	○
イオン化傾向	有菌	5 日間	絶縁	×	×	×	×

3.3 山口の研究⁽¹⁰⁾

山口は、MBD の再現性が悪いことを最も重要な問題点として、その原因を明らかにし、再現性良く MBD を達成する条件の確立を研究の主題とした。その研究結果について以下に示す。

- ① 微生物の有無および淡水による MBD 試験を行った結果、MBD に関わる微生物は嫌気性の海洋微生物であることがわかった。
- ② 基板の表面条件は、海水中で有菌酸化したものに関り結晶粒子の析出が可能であった。また、そのときの酸化膜厚さは $0.1\mu\text{m}$ 以上であれば析出状態に影響しない。
- ③ MBD の試験温度の影響を調べた結果、最適温度は 20°C であり、この温度条件であれば浸漬期間 14 日以内に再現性良く析出が得られた。
- ④ マスク板・基板間の隙間の影響について調べた結果、隙間が $0.12\sim 0.24\text{mm}$ の時安定した析出が得られた。特に隙間が 0.12mm のとき、析出粒子は析出数、析出量ともに多く得られた。
- ⑤ 基板の傷に沿った結晶粒子の析出が確認された。この現象を利用すれば、基板上の析出位置の制御およびマスク板を被加工材としたエッチングや表面加工に使える可能性があることが示された。
- ⑥ 現段階で得られたデータに基づいて、MBD 生成メカニズムが推論された。

— 山口の推論 —

堀場の研究から、基板の酸化膜は Cu と O の化合物および微生物によるバイオフィームにより構成されていることが示されている。ゆえに、微生物酸化処理によって基板表面は Cu_2O とバイオフィームで覆われた微生物の生息しやすい状態であると思われる。この後、基板とマスク板をクランプすることで嫌気性環境となり、嫌気性微生物（細菌）が繁殖する。この間、マスク板から Cu イオンが溶出し、微生物は Cu イオンの害を避けるため基板上に集まる。マスク板・基板間の Cu イオン濃度が高くなり微生物の活動を阻害するようになると、基板表面上に生息する嫌気性微生物が酵素を分泌して銅粒子の析出を行うものと思われる。また、このとき基板とマスク板を導電すると析出が起こらないことから、微生物の酵素により基板表面を負に帯電させる反応が行われているものと思われる。以上のメカニズムの推論を模式図にして表し、図 3.1 に示す。

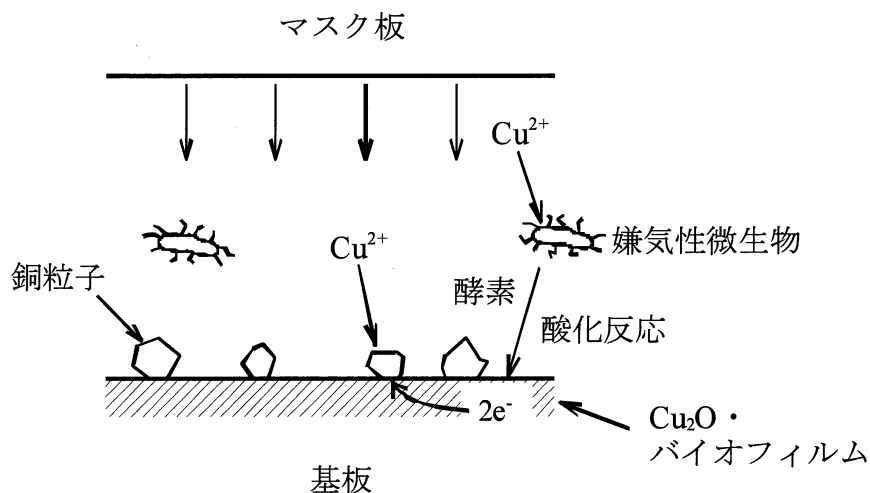


図 3.1 MBD において推定されるメカニズムの模式図

以上の結果を表 3.3 に示す.

表 3.3 山口による MBD の試験結果

試験片 条件	試験水	クランプ 方法	フィルタ 枚数	酸化温度	酸化期間	試験 温度	試験期間	結果
滅菌	滅菌海水	絶縁	1	30℃	5 日	室温	28 日	×
有菌	有菌淡水	絶縁	1	30℃	5 日	室温	28 日	×
滅菌	有菌海水	絶縁	1	30℃	5 日	室温	28 日	○
有菌	有菌海水	絶縁	1	30℃	5 日	室温	21 日	○
有菌	有菌海水	絶縁	1	30℃	5 日	5℃	14 日	×
有菌	有菌海水	絶縁	1	30℃	5 日	10℃	14 日	×
有菌	有菌海水	絶縁	1	30℃	5 日	15℃	14 日	○
有菌	有菌海水	絶縁	1	30℃	5 日	20℃	14 日	○
有菌	有菌海水	絶縁	1	30℃	5 日	25℃	14 日	○
有菌	有菌海水	絶縁	1	30℃	5 日	30℃	14 日	×
有菌	有菌海水	絶縁	1	30℃	5 日	35℃	14 日	×
有菌	有菌海水	絶縁	1	30℃	5 日	室温	28 日	○(4/4 枚)
有菌	有菌海水	絶縁	2	30℃	5 日	室温	28 日	○(4/4 枚)
有菌	有菌海水	絶縁	4	30℃	5 日	室温	28 日	○(3/4 枚)
有菌	有菌海水	絶縁	8	30℃	5 日	室温	28 日	○(2/4 枚)

3.4 間柄の研究⁽¹¹⁾

間柄は、前述の研究結果から試験温度や浸漬期間等を適切な条件下で試験を行えば安定した析出が得られると考え、過去の試験条件を分析し MBD における最適条件を定めた。その条件を表 3.4 に示す。

表 3.4 MBD 最適条件

試験装置				基板処理条件		フィルタ 処理条件		試験条件	
試験容器	試験水	試験片	基板・マスク板間 の隙間	酸化 温度	酸化 期間	浸漬 温度	浸漬 期間	試験 温度	試験 期間
500mL ビーカ	有菌海水 400mL	30×30mm ² 1 枚	0.12mm (フィルタ 1 枚)	30℃	1 日	室温	5 日	20℃	14 日

この条件を基に無酸素銅および真鍮を用いた MBD の再現性、および MBD 生成メカニズムについて検討を行った。また前述の基板の傷上に析出する現象についても検討を行った。その研究結果について以下に示す。

- ① 過去の研究から最適条件で実験を行い、MBD の再現性を確認した。
- ② 滅菌試験ではほとんどの基板から析出が得られなかったことから、MBD の発現には微生物が関与していることを確認した。
- ③ 真鍮を使った MBD 試験では析出は得られなかった。その原因の一つとして、酸化膜形成の有無について検討したが、5 週間の基板酸化処理では析出が得られなかった。
- ④ 基板サイズが 20×20mm² 以下のものでは析出は見られなかった。しかし、基板サイズが(30×15mm²)×2 や(15×15mm²)×4 では析出が見られた。これは、基板の表面積の違いによるものと考えられ、試験海水中に溶け込んでいる銅イオン濃度の影響ではないかと思われる。また、(30×15mm²)×2 と(15×15mm²)×4 で析出期間に差が生じ、基板サイズが析出に何らかの影響を与えていることがわかった。
- ⑤ 基板の表面粗さについて、Rz=0.2μm の研磨面では圧延面よりも多い析出が得られ、Rz=3μm の研磨面の析出量は圧延面とあまり変わらなかった。ゆえに、MBD の発現には基板の表面粗さが関係し、Rz=0.2μm またはその付近に MBD に最も適した表面粗さ状態が存在すると思われる。
- ⑥ Rz=0.2μm の研磨面にケガキ線をつけた試験では、ケガキ線に沿った析出が確認できた。ただし、析出はケガキ線上だけでなく基板全体に見られたため、ケガキ線上だけに析出を集中させる何らかの手立てが必要である。
- ⑦ 基板サイズが(15×15mm²)×4 で、Rz=0.04μm の基板を含むものは 2 週間からの析出があり、Rz=0.04μm のほうが圧延面よりも早期に析出する可能性がある。
- ⑧ 銅イオン濃度が 2.4mg/L の海水を用いた実験では、通常の海水を用いた実験よりも析出量が多かった。また、10mg/L の海水では、通常の海水よりも析出量が少なかった。銅イオン濃度が高すぎると析出量は逆に減少しており、MBD に最適な銅イオン濃度が存在すると思われる。

- ⑨ 基板酸化処理がなくても 2 週間での析出が見られた。また、フィルタ処理がない場合は 3 週間からの析出しか見られなかった。したがって、基板酸化処理よりもフィルタ処理のほうが重要と考えられ、MBD にはフィルタ内の微生物が作用していると思われる。
- ⑩ 試験後の基板上およびフィルタ上の SEM 観察を行った結果、MBD プロセスには海水中に生息する桿菌、短桿菌、球菌のいずれかが関与していると思われる。
- ⑪ 試験中の pH にはあまり大きな変化はなく、およそ $\text{pH}=8.0\sim 8.2$ で安定していた。また、試験中の溶存酸素濃度 DO の変化についてはばらつきが大きく、DO が直接析出量に関与するといった傾向は見られなかった。

以上の結果を表 3.5 に示す。

表 3.5 間柄による MBD の試験結果

試験 番号	試験名	試験装置				基板酸化 処理条件		フィルタ 処理条件		試験条件		析出の 有無
		試験片条件	研磨条件	試験 水	試験 場所	酸化 温度	酸化 期間	浸漬 温度	浸漬 期間	試験 温度	試験 期間	
1	有菌試験	無酸素銅板 30×30mm ² 有菌	圧延面	有菌 海水	クリーン ベンチ内	33± 1℃	1日	33± 1℃	5日	33± 1℃	2週間 ～5週間	○
2		無酸素銅板 30×30mm ² 有菌	圧延面	有菌 海水	タグボッ クス内	26± 1℃	1日	26± 1℃	5日	24～ 27℃	2週間 ～5週間	○
3	滅菌試験	無酸素銅板 30×30mm ² 滅菌	圧延面	滅菌 海水	クリーン ベンチ内	34± 1℃	1日	34± 1℃	5日	34± 1℃	2週間 ～5週間	× ^{*1}
4	真鍮試験	真鍮 30×30mm ² 有菌	圧延面	有菌 海水	クリーン ベンチ内	34± 1℃	1日	34± 1℃	5日	34± 1℃	2週間 ～5週間	×
5		真鍮 30×30mm ² 有菌	圧延面	有菌 海水	タグボッ クス内	24± 1℃	35日	24± 1℃	5日	22～ 26℃	2週間 ～5週間	×
6	20×20mm ²	無酸素銅板 20×20mm ² 有菌	圧延面	有菌 海水	タグボッ クス内	24± 1℃	1日	24± 1℃	5日	24± 1℃	2週間 ～5週間	×
7	15×15mm ²	無酸素銅板 15×15mm ² 有菌	圧延面	有菌 海水	タグボッ クス内	25± 1℃	1日	25± 1℃	5日	25± 1℃	2週間 ～5週間	×
8	(30×15mm ²)×2	無酸素銅板 (30×15mm ²)×2 有菌	圧延面	有菌 海水	タグボッ クス内	26.5± 0.5℃	1日	26.5± 0.5℃	5日	25～ 29℃	2週間 ～5週間	○
9	(15×15mm ²)×4	無酸素銅板 (15×15mm ²)×4 有菌	圧延面	有菌 海水	タグボッ クス内	25± 1℃	1日	25± 1℃	5日	25± 1℃	2週間 ～5週間	△ (3～5週間)
10	Rz=0.2μmバフ研磨	無酸素銅板 30×30mm ² 有菌	Rz=0.2μm研磨面	有菌 海水	タグボッ クス内	25.5± 0.5℃	1日	26± 1℃	5日	25± 1℃	2週間 ～3週間	○
11	Rz=0.2μmバフ研磨後 ケガキ	無酸素銅板 30×30mm ² 有菌	Rz=0.2μm研磨後 十字ケガキ	有菌 海水	タグボッ クス内	25.5± 0.5℃	1日	26± 1℃	5日	23～ 26℃	2週間 ～3週間	○
12	ケガキ後 Rz=0.2μmバフ研磨	無酸素銅板 30×30mm ² 有菌	十字ケガキ後 Rz=0.2μm研磨	有菌 海水	タグボッ クス内	24± 1℃	1日	24± 1℃	5日	22～ 26℃	2週間 ～3週間	○
13	#240サンドペーパー	無酸素銅板 30×30mm ² 有菌	Rz=3μm研磨面	有菌 海水	タグボッ クス内	24± 1℃	1日	24± 1℃	5日	24± 1℃	2週間 ～3週間	○
14	(15×15mm ²)×4 1枚 Rz=0.04μmバフ研磨	無酸素銅板 (15×15mm ²)×4 有菌	1枚 Rz=0.04μm研磨面	有菌 海水	タグボッ クス内	24± 1℃	1日	24± 1℃	5日	24± 1℃	2週間 ～5週間	△ ^{*2}
15	(15×15mm ²)×4 すべて Rz=0.04μmバフ研磨	無酸素銅板 (15×15mm ²)×4 有菌	すべて Rz=0.04μm研磨面	有菌 海水	タグボッ クス内	24± 0.5℃	1日	24± 0.5℃	5日	21～ 25℃	2週間 ～5週間	○
16	銅イオン濃度 2.2mgCu/L	無酸素銅板 30×30mm ² 有菌	圧延面	有菌 海水	タグボッ クス内	25± 1℃	1日	25± 1℃	5日	24～ 28℃	1週間 ～3週間	△ (2,3週間)
17	銅イオン濃度 10mgCu/L	無酸素銅板 30×30mm ² 有菌	圧延面	有菌 海水	タグボッ クス内	24± 1℃	1日	24± 1℃	5日	24± 1℃	1週間 ～3週間	△ (2,3週間)
18	基板酸化処理なし	無酸素銅板 30×30mm ² 有菌	圧延面	有菌 海水	タグボッ クス内	24± 1℃	なし	24± 1℃	5日	24± 1℃	2週間 ～3週間	○
19	フィルタ処理なし	無酸素銅板 30×30mm ² 有菌	圧延面	有菌 海水	タグボッ クス内	24± 1℃	1日	24± 1℃	なし	24± 1℃	2週間 ～3週間	△ (3週間)
20	基板酸化処理5日	無酸素銅板 30×30mm ² 有菌	圧延面	有菌 海水	タグボッ クス内	24± 1℃	5日	24± 1℃	5日	24± 1℃	2週間 ～3週間	△ (3週間)
21	基板酸化処理なし マスク板酸化処理1日	無酸素銅板 30×30mm ² 有菌	圧延面	有菌 海水	タグボッ クス内	24± 1℃	なし	24± 1℃	5日	24± 1℃	2週間 ～3週間	○

マスク板：圧延面

クランプ：絶縁

フィルタ：1枚

*1：8枚中7枚から析出し

*2：再試験は3～5週間で析出

3.5 福島の研究⁽¹²⁾

福島は、前述の研究結果より MBD の再現性は十分だと考え、簡易に試験を行う事が出来るように室温で行う簡易条件での MBD を確認した。また、銅純度が無酸素銅に近いりん青銅での MBD の有効性も確認した。その研究結果について以下に示す。

- ① 無酸素銅において基板酸化処理は MBD 発現の必須条件ではなく、阻害要因であると思われる。
- ② 無酸素銅においてフィルタ無では析出量が減少したことから、フィルタ処理は MBD 析出量に対して促進効果のある処理であることがわかった。
- ③ 無酸素銅においてクリップ無のほうが安定して析出が得られることがわかった。
- ④ 試験片サイズを $15 \times 15 \text{mm}^2$ にした試験では海水 80mL、酸化無クランプ無にすることで析出することがわかった。
- ⑤ 過去の研究から標準試験を定め、新たによりん青銅においても MBD の有効性を確認した。
- ⑥ 考案した析出量の評価法により従来よりも背景画像の除去率が向上し、析出総面積について妥当な結果を得られた。
- ⑦ りん青銅を用いた MBD 試験では無酸素銅よりも析出が多く、1 週目から析出が得られた。また滅菌試験を行ったところ、析出の開始が遅れるという遅延効果が得られた。
- ⑧ 真鍮を用いた MBD 酸化処理無試験では析出は得られなかった。
- ⑨ 無酸素銅とりん青銅または真鍮を組み合わせて試験をした結果、単体では析出の得られなかった真鍮においても MBD による析出が得られた。また、通常とは異なりマスク板側に析出する現象もみられた。酸化膜が阻害要因であると思われるため、嫌気性微生物が酸化膜を嫌ってマスク板側に集まったことによりマスク板上で析出が生じたものと思われる。
- ⑩ MBD によって析出した銅結晶粒子の組成を EPMA で解析したところ、無酸素銅を用いた試験では純銅であることがわかった。またりん青銅や異種金属を用いた試験でも銅純度 98%以上の銅粒子であることがわかった。
- ⑪ 試験後の基板上およびフィルタ上の SEM 観察を行った結果、MBD プロセスには海水中に生息する桿菌、短桿菌、球菌のいずれかが関与していると思われる。
- ⑫ 試験中の pH にはあまり大きな変化はなく、およそ $\text{pH}=8.1$ で安定していた。また、試験中の溶存酸素濃度 DO の変化についてははっきりとした傾向はつかめなかった。

以上の結果を表 3.6 に示す。

表 3.6 福島による MBD の試験結果

試験名	試験記号	基板	マスク板	試験片条件	試験水	クランプ	酸化処理		フィルタ浸漬		試験条件		結果		
							温度	日数	枚数	温度	日数	温度	日数	析出箇所	析出開始日
酸化処理無試験	CuCu-FC	無酸素銅 圧延面	無酸素銅 圧延面	有菌 30×30mm ²	有菌 海水	絶縁	—	0日	1	26～ 27℃	5日	26～ 27℃	2～ 5週間	基板	2週目 ^{*1}
	Cu(O)Cu-FC	無酸素銅 圧延面	無酸素銅 圧延面	有菌 30×30mm ²	有菌 海水	絶縁	26～ 27℃	1日	1	26～ 27℃	5日	26～ 27℃	2～ 5週間	基板	3週目
	CuCu-FC15	無酸素銅 圧延面	無酸素銅 圧延面	有菌 15×15mm ²	有菌 海水	絶縁	—	0日	1	22～ 25℃	5日	18～ 24℃	2～ 5週間	×	—
	PBPB-FC	りん青銅 圧延面	りん青銅 圧延面	有菌 30×30mm ²	有菌 海水	絶縁	—	0日	1	24～ 25℃	5日	23～ 25℃	2～ 5週間	基板	2週目
	BsBs-FC	真鍮 圧延面	真鍮 圧延面	有菌 30×30mm ²	有菌 海水	絶縁	—	0日	1	26℃	5日	24～ 27℃	2～ 5週間	×	—
	Bs(O)Bs-FC	真鍮 圧延面	真鍮 圧延面	有菌 30×30mm ²	有菌 海水	絶縁	26℃	1日	1	26℃	5日	24～ 27℃	2～ 5週間	×	—
フィルタ処理無試験	Cu(O)Cu-C	無酸素銅 圧延面	無酸素銅 圧延面	有菌 30×30mm ²	有菌 海水	絶縁	20～ 21℃	1日	1	—	0日	18～ 24℃	2～ 5週間	基板	2週目 ^{*1}
	Cu(O)Cu-FC	無酸素銅 圧延面	無酸素銅 圧延面	有菌 30×30mm ²	有菌 海水	絶縁	20～ 21℃	1日	1	20～ 23℃	5日	18～ 24℃	2～ 5週間	基板	2週目
酸化無フィルタ処理無試験	CuCu-C	無酸素銅 圧延面	無酸素銅 圧延面	有菌 30×30mm ²	有菌 海水	絶縁	—	0日	1	—	0日	22～ 27℃	2～ 5週間	基板	2週目 ^{*1}
	Cu(O)Cu-FC	無酸素銅 圧延面	無酸素銅 圧延面	有菌 30×30mm ²	有菌 海水	絶縁	25～ 27℃	1日	1	25～ 27℃	5日	22～ 27℃	2～ 5週間	基板	2週目 ^{*1}
15×15mm ² 酸化無クランプ無試験	CuCu-F15	無酸素銅 圧延面	無酸素銅 圧延面	有菌 15×15mm ²	有菌 海水	—	—	0日	1	18～ 22℃	5日	18～ 24℃	2～ 5週間	×	—
追加実験	CuCu-FC15 80mL sea water	無酸素銅 圧延面	無酸素銅 圧延面	有菌 15×15mm ²	有菌 海水	絶縁	—	0日	1	25～ 27℃	5日	23～ 26℃	3～ 4週間	×	—
	CuCu-F15 80mL sea water	無酸素銅 圧延面	無酸素銅 圧延面	有菌 15×15mm ²	有菌 海水	—	—	0日	1	25～ 27℃	5日	23～ 26℃	3～ 4週間	基板	3週目
クランプ無試験	Cu(O)Cu-F	無酸素銅 圧延面	無酸素銅 圧延面	有菌 30×30mm ²	有菌 海水	—	27℃	1日	1	27℃	5日	25～ 27℃	2～ 5週間	基板	2週目
	Cu(O)Cu-F15	無酸素銅 圧延面	無酸素銅 圧延面	有菌 15×15mm ²	有菌 海水	—	22～ 23℃	1日	1	22～ 25℃	5日	18～ 24℃	2～ 5週間	×	—
80mL試験	Cu(O)Cu-FC 80mL sea water	無酸素銅 圧延面	無酸素銅 圧延面	有菌 30×30mm ²	有菌 海水 ^{*2}	絶縁	26～ 27℃	1日	1	26～ 27℃	5日	27～ 28℃	2～ 5週間	基板	3週目
	Cu(O)Cu-FC	無酸素銅 圧延面	無酸素銅 圧延面	有菌 30×30mm ²	有菌 海水	絶縁	26～ 27℃	1日	1	26～ 27℃	5日	27～ 28℃	2～ 5週間	基板	3週目
15x15mm ² 嫌気性試験	Cu(O)Cu-FCW15	無酸素銅 圧延面	無酸素銅 圧延面	有菌(包有) 15×15mm ²	有菌 海水	絶縁	26～ 27℃	1日	1	26～ 27℃	5日	26～ 29℃	2～ 5週間	×	—
	Cu(O)Cu-FC15	無酸素銅 圧延面	無酸素銅 圧延面	有菌 15×15mm ²	有菌 海水	絶縁	26～ 27℃	1日	1	26～ 27℃	5日	26～ 29℃	2～ 5週間	×	—
15x15mm ² 基板試験	15Cu(O)Cu-F	無酸素銅 圧延面	無酸素銅 圧延面	有菌 15×15mm ² 30×30mm ²	有菌 海水	—	27℃	1日	1	27℃	5日	25～ 27℃	2～ 5週間	×	—
りん青銅試験	PB(O)PB-FC	りん青銅 圧延面	りん青銅 圧延面	有菌 30×30mm ²	有菌 海水	絶縁	24～ 25℃	1日	1	24～ 25℃	5日	24～ 28℃	2～ 5週間	基板	2週目
	PB(O)PB-FC	りん青銅 圧延面	りん青銅 圧延面	有菌 30×30mm ³	有菌 海水	絶縁	24℃	1日	1	23～ 24℃	5日	22～ 25℃	1～ 4週間	基板	1週目
	PB(O)PB-FC15	りん青銅 圧延面	りん青銅 圧延面	有菌 15×15mm ²	有菌 海水	絶縁	26℃	1日	1	26℃	5日	25～ 26℃	2～ 5週間	基板	2週目
滅菌試験 1回目	PB(O)PB-FCS	りん青銅 圧延面	りん青銅 圧延面	滅菌 30×30mm ²	滅菌 海水	絶縁	33～ 34℃	1日	1	33～ 34℃	5日	33～ 35℃	2～ 5週間	基板	3週目
滅菌試験 2回目	PB(O)PB-FCS	りん青銅 圧延面	りん青銅 圧延面	滅菌 30×30mm ²	滅菌 海水	絶縁	33～ 34℃	1日	1	33～ 34℃	5日	33～ 35℃	2～ 5週間	基板	2週目 ^{*1}
異種金属試験	PB(O)Cu-FC	りん青銅 圧延面	無酸素銅 圧延面	有菌 30×30mm ²	有菌 海水	絶縁	26℃	1日	1	26℃	5日	26～ 29℃	2～ 5週間	マスク板	2週目
	Cu(O)PB-FC	無酸素銅 圧延面	りん青銅 圧延面	有菌 30×30mm ²	有菌 海水	絶縁	24℃	1日	1	23～ 25℃	5日	23～ 26℃	2～ 5週間	マスク板	3週目
	Bs(O)Cu-FC	真鍮 圧延面	無酸素銅 圧延面	有菌 30×30mm ²	有菌 海水	絶縁	24～ 25℃	1日	1	24～ 25℃	5日	21～ 25℃	2～ 5週間	基板	2週目
	Cu(O)Bs-FC	無酸素銅 圧延面	真鍮 圧延面	有菌 30×30mm ²	有菌 海水	絶縁	23～ 24℃	1日	1	23～ 24℃	5日	23～ 25℃	2～ 5週間	マスク板	2週目
	PBCu-FC	りん青銅 圧延面	無酸素銅 圧延面	有菌 30×30mm ²	有菌 海水	絶縁	—	0日	1	24～ 26℃	5日	21～ 26℃	2～ 5週間	基板	2週目
	CuPB-FC	無酸素銅 圧延面	りん青銅 圧延面	有菌 30×30mm ²	有菌 海水	絶縁	—	0日	1	24～ 26℃	5日	21～ 26℃	2～ 5週間	基板	2週目
	BsCu-FC	真鍮 圧延面	無酸素銅 圧延面	有菌 30×30mm ²	有菌 海水	絶縁	—	0日	1	21～ 23℃	5日	18～ 24℃	2～ 5週間	基板	2週目
	CuBs-FC	無酸素銅 圧延面	真鍮 圧延面	有菌 30×30mm ²	有菌 海水	絶縁	—	0日	1	21～ 23℃	5日	18～ 24℃	2～ 5週間	マスク板	2週目

*1: 2 枚中 1 枚から析出あり

*2: 海水 80mL

3.6 考察

MBD を再現性良く達成するため、前述の研究結果を考察する。まず確立されたことを以下に記すとともに、過去の研究結果を一つにまとめたものを表 3.7, 3.8, 3.9, 3.10, 3.11 に示す。

- ① MBD に関与する微生物は嫌気性の海洋微生物である。
- ② MBD により得られる粒子は純銅であり、複数の結晶粒により構成されている。
- ③ 基板とマスク板は絶縁してクランプすることで安定した析出が得られる。
- ④ 試験水条件について分析され、浸漬期間や最適な温度条件が解明された。
- ⑤ 基板とマスク板間の隙間による影響について解明され、その最適条件が示された。
- ⑥ 促進法が考案され、試験海水への銅イオン添加による促進効果およびその条件が示された。
- ⑦ 基板上にケガキ線を引き、線上に結晶粒子を析出させることができた。しかし、析出は基板全体にも広がっているため析出を線上のみに集中させる何らかの手立てが必要である。
- ⑧ 酸化処理等の試験条件について検討され、基板の酸化処理は必ずしも必要ではないことが示された。また MBD にはフィルタの処理が最も重要であり、フィルタ内の微生物が強く関与しているとされた。

表 3.7 過去の研究結果一覧表（試験海水 400mL）

試験法		試験片条件	試験片表面	試験海水	クランプ	フィルタ浸漬		酸化処理		試験		結果	
						枚数	温度	日数	温度	日数	温度		日数
M B D 試験	有菌・滅菌試験	有菌	圧延面	有菌海水	絶縁	1	—	—	—	0日	25℃	14日	×
		有菌	圧延面	有菌海水	絶縁	1	—	—	—	2日	25℃	14日	○
		有菌	圧延面	有菌海水	絶縁	0	—	—	—	2日	25℃	14日	×
		有菌	研磨面	有菌海水	絶縁	1	—	—	—	2日	25℃	14日	×
		有菌	圧延面	有菌海水	絶縁	1	—	—	—	2日	25℃	150日	○
		有菌	圧延面	有菌海水	絶縁	1	—	—	—	0日	30℃	20日	×
		有菌	圧延面	有菌海水	絶縁	1	—	—	—	5日	30℃	20日	○
		有菌	研磨面	有菌海水	絶縁	1	—	—	—	5日	30℃	20日	×
		有菌	圧延面	有菌海水	絶縁	1	—	—	—	5日	15℃	20日	×
		滅菌	圧延面	滅菌海水	絶縁	1	—	—	—	5日	30℃	20日	×
		有菌	圧延面	有菌海水	絶縁	1	—	—	—	5日	—	28日	○
		滅菌	圧延面	滅菌海水	絶縁	1	—	—	—	5日	—	28日	×
		有菌	圧延面	有菌海水	絶縁	1	—	—	—	1日	—	28日	○
		有菌	圧延面	有菌海水	導電	1	—	—	—	5日	—	28日	×
		滅菌	圧延面	滅菌海水	絶縁	1	—	5日	30℃	5日	室温	28日	×
		有菌	圧延面	有菌淡水	絶縁	1	—	5日	30℃	5日	室温	28日	×
		滅菌	圧延面	有菌海水	絶縁	1	—	5日	30℃	5日	室温	28日	○
		有菌	圧延面	有菌海水	絶縁	1	—	5日	30℃	5日	室温	21日	○
		有菌	圧延面	有菌海水	絶縁	1	—	5日	30℃	5日	5℃	14日	×
		有菌	圧延面	有菌海水	絶縁	1	—	5日	30℃	5日	10℃	14日	×
		有菌	圧延面	有菌海水	絶縁	1	—	5日	30℃	5日	15℃	14日	○
		有菌	圧延面	有菌海水	絶縁	1	—	5日	30℃	5日	20℃	14日	○
		有菌	圧延面	有菌海水	絶縁	1	—	5日	30℃	5日	25℃	14日	○
		有菌	圧延面	有菌海水	絶縁	1	—	5日	30℃	5日	30℃	14日	×
		有菌	圧延面	有菌海水	絶縁	1	—	5日	30℃	5日	35℃	14日	×
		有菌	圧延面	有菌海水	絶縁	1	—	5日	30℃	5日	室温	28日	○(4/4枚)
		有菌	圧延面	有菌海水	絶縁	2	—	5日	30℃	5日	室温	28日	○(4/4枚)
		有菌	圧延面	有菌海水	絶縁	4	—	5日	30℃	5日	室温	28日	△(3/4枚)
		有菌	圧延面	有菌海水	絶縁	8	—	5日	30℃	5日	室温	28日	△(2/4枚)
		有菌	圧延面	有菌海水	絶縁	1	32~34℃	5日	32~34℃	1日	32~34℃	2~5週間	○
		有菌	圧延面	有菌海水	絶縁	1	25~27℃	5日	25~27℃	1日	24~27℃	2~5週間	○
		滅菌	圧延面	滅菌海水	絶縁	1	33~35℃	5日	33~35℃	1日	33~35℃	2~5週間	×*1
		有菌	圧延面	有菌海水	絶縁	1	24~26℃	5日	24~26℃	1日	24~26℃	2~5週間	○
		有菌	圧延面	有菌海水	絶縁	1	20~23℃	5日	20~21℃	1日	18~24℃	2~5週間	○
		有菌	圧延面	有菌海水	絶縁	1	25~27℃	5日	25~27℃	1日	22~27℃	2~5週間	○
		有菌	圧延面	有菌海水	—	1	27℃	5日	27℃	1日	25~27℃	2~5週間	○

マスク板：圧延面

試験片は明記しない限り 30×30mm²

*1：8 枚中 7 枚から析出なし

*2：再試験は 3~5 週間で析出

表 3.8 過去の研究結果一覧表 (試験海水 400mL)

試験法		試験片条件	試験片表面	試験海水	クランプ	フィルタ浸漬			酸化処理		試験		結果
						枚数	温度	日数	温度	日数	温度	日数	
M B D 試験	サイズ効果試験	20×20mm ² 有菌	圧延面	有菌海水	絶縁	1	23～25℃	5日	23～25℃	1日	23～25℃	2～5週間	×
		15×15mm ² 有菌	圧延面	有菌海水	絶縁	1	24～26℃	5日	24～26℃	1日	24～26℃	2～5週間	×
		(30×15mm ²) ×2 有菌	圧延面	有菌海水	絶縁	1	26～27℃	5日	26～27℃	1日	25～29℃	2～5週間	○
		(15×15mm ²) ×4 有菌	圧延面	有菌海水	絶縁	1	24～26℃	5日	24～26℃	1日	24～26℃	2～5週間	△ (3～5週間)
		15×15mm ² 有菌	圧延面	有菌海水	絶縁	1	22～25℃	5日	—	0日	18～24℃	2～5週間	×
		15×15mm ² 有菌	圧延面	有菌海水	絶縁	1	26～27℃	5日	26～27℃	1日	26～29℃	2～5週間	×
		15×15mm ² 有菌	圧延面	有菌海水	—	1	18～22℃	5日	—	0日	18～24℃	2～5週間	×
		15×15mm ² 有菌	圧延面	有菌海水	—	1	22～25℃	5日	22～23℃	1日	18～24℃	2～5週間	×
		基板(15×15mm ²), マスク板(30×30mm ²) 有菌	圧延面	有菌海水	—	1	27℃	5日	27℃	1日	25～27℃	2～5週間	×
	嫌気性試験	15×15mm ² 有菌(包有)	圧延面	有菌海水	絶縁	1	26～27℃	5日	26～27℃	1日	26～29℃	2～5週間	×
	真鍮試験	有菌	圧延面	有菌海水	絶縁	1	33～35℃	5日	33～35℃	1日	33～35℃	2～5週間	×
		有菌	圧延面	有菌海水	絶縁	1	23～25℃	5日	23～25℃	35日	22～26℃	2～5週間	×
		有菌	圧延面	有菌海水	絶縁	1	26℃	5日	26℃	1日	24～27℃	2～5週間	×
		基板酸化処理無 有菌	圧延面	有菌海水	絶縁	1	26℃	5日	—	—	24～27℃	2～5週間	×
	りん青銅試験	有菌	圧延面	有菌海水	絶縁	1	24～25℃	5日	24～25℃	1日	24～27℃	2～5週間	○
		有菌	圧延面	有菌海水	絶縁	1	23～24℃	5日	24℃	1日	22～25℃	2～5週間	○
		15×15mm ² 有菌	圧延面	有菌海水	絶縁	1	26℃	5日	26℃	1日	25～26℃	2～5週間	○
		基板酸化処理無 有菌	圧延面	有菌海水	絶縁	1	26℃	5日	—	0日	23～25℃	2～5週間	○
		滅菌	圧延面	有菌海水	絶縁	1	33～34℃	5日	33～34℃	1日	33～34℃	2～5週間	○
		滅菌	圧延面	有菌海水	絶縁	1	33～34℃	5日	33～34℃	1日	33～34℃	2～5週間	○

マスク板：圧延面

試験片は明記しない限り 30×30mm²

*1：8枚中7枚から析出なし

*2：再試験は3~5週間で析出

表 3.9 過去の研究結果一覧表 (試験海水 400mL)

試験法		試験片条件	試験片表面	試験海水	クランプ	フィルタ浸漬			酸化処理		試験		結果
						枚数	温度	日数	温度	日数	温度	日数	
M B D 試験	研磨試験	有菌	Rz=0.2μm研磨面	有菌海水	絶縁	1	25~27℃	5日	25~26℃	1日	24~26℃	2~3週間	○
		有菌	Rz=0.2μm研磨後 十字ケガキ	有菌海水	絶縁	1	25~27℃	5日	25~26℃	1日	23~26℃	2~3週間	○
		有菌	十字ケガキ後 Rz=0.2μm研磨	有菌海水	絶縁	1	23~25℃	5日	23~25℃	1日	22~26℃	2~3週間	○
		有菌	#240サンドペーパー Rz=3μm研磨面	有菌海水	絶縁	1	23~25℃	5日	23~25℃	1日	23~25℃	2~3週間	○
		(15×15mm ²) ×4 有菌	1枚のみ Rz=0.04μm研磨面	有菌海水	絶縁	1	23~25℃	5日	23~25℃	1日	23~25℃	2~5週間	△*2
		(15×15mm ²) ×4 有菌	すべて Rz=0.04μm研磨面	有菌海水	絶縁	1	23.5~24.5℃	5日	23.5~24.5℃	1日	21~25℃	2~5週間	○
	銅イオン濃度	有菌	圧延面	有菌海水 銅イオン濃度 2.2mgCu/L	絶縁	1	24~26℃	5日	24~26℃	1日	24~28℃	1~3週間	△ (2,3週間)
		有菌	圧延面	有菌海水 銅イオン濃度 10mgCu/L	絶縁	1	23~25℃	5日	23~25℃	1日	23~25℃	1~3週間	△ (2,3週間)
	処理条件による考察	基板酸化処理なし 有菌	圧延面	有菌海水	絶縁	1	23~25℃	5日	—	0日	23~25℃	2~3週間	○
		基板酸化処理なし 有菌	圧延面	有菌海水	絶縁	1	24~26℃	5日	—	0日	24~26℃	2~5週間	○
		フィルタ処理なし 有菌	圧延面	有菌海水	絶縁	0	—	0日	23~25℃	1日	23~25℃	2~3週間	△ (3週間)
		フィルタ処理なし 有菌	圧延面	有菌海水	絶縁	0	—	0日	20~21℃	1日	18~24℃	2~5週間	○
		基板酸化処理5日 有菌	圧延面	有菌海水	絶縁	1	23~25℃	5日	23~25℃	5日	23~25℃	2~3週間	△ (3週間)
		基板酸化処理なし マスク板酸化処理 有菌	圧延面	有菌海水	絶縁	1	23~25℃	5日	—	0日	23~25℃	2~3週間	○
		基板酸化処理なし フィルタ処理無 有菌	圧延面	有菌海水	絶縁	1	—	0日	—	0日	22~27℃	2~5週間	○

マスク板：圧延面

試験片は明記しない限り 30×30mm²

*1：8 枚中 7 枚から析出なし

*2：再試験は 3~5 週間で析出

表 3.10 過去の研究結果一覧表 (試験海水 400mL)

試験法		試験片条件	試験片表面	試験海水	クランプ	フィルタ浸漬			酸化処理		試験		結果										
						枚数	温度	日数	温度	日数	温度	日数											
M B D 試験	異種金属試験（基板酸化処理有）	基板(りん青銅)	圧延面	有菌海水	絶縁	1	26℃	5日	26℃	1日	26～29℃	2～5週間	○（マスク板）										
		マスク板(無酸素銅)有菌																					
		基板(無酸素銅)											圧延面	有菌海水	絶縁	1	23～25℃	5日	24℃	1日	23～26℃	2～5週間	○（マスク板）
		マスク板(りん青銅)有菌																					
	基板(真鍮)マスク板(無酸素銅)有菌	圧延面	有菌海水	絶縁	1	24～25℃	5日	24～25℃	1日	21～25℃	2～5週間	○											
	基板(無酸素銅)マスク板(真鍮)有菌																						
	異種金属試験（基板酸化処理無）	基板(りん青銅)	圧延面	有菌海水	絶縁	1	24～26℃	5日	—	0日	26～29℃	2～5週間	○										
		マスク板(無酸素銅)有菌																					
		基板(無酸素銅)マスク板(りん青銅)有菌	圧延面	有菌海水	絶縁	1	24～26℃	5日	—	0日	26～29℃	2～5週間	○										
		基板(真鍮)マスク板(無酸素銅)有菌																					
基板(無酸素銅)マスク板(真鍮)有菌		圧延面	有菌海水	絶縁	1	21～23℃	5日	—	0日	18～24℃	2～5週間	○											
基板(無酸素銅)マスク板(真鍮)有菌																							
促進試験	ガラス法	有菌	圧延面	有菌海水	絶縁	1	—	—	—	5日	—	28日	×										
	Cuイオンの環境	有菌	圧延面	有菌海水	絶縁	1	—	—	—	5日	—	21日	○										
	Feイオンの環境	有菌	圧延面	有菌海水	絶縁	1	—	—	—	5日	—	28日	○										
	イオン化傾向	有菌	圧延面	有菌海水	絶縁	1	—	—	—	5日	—	28日	×										

マスク板：圧延面

*1：8枚中7枚から析出なし

試験片は明記しない限り 30×30mm²

*2：再試験は3～5週間で析出

表 3.11 過去の研究結果一覧表 (試験海水 80mL)

試験法		試験片条件	試験片表面	試験海水	クランプ	フィルタ浸漬			酸化処理		試験		結果
						枚数	温度	日数	温度	日数	温度	日数	
M B D 試験	有菌・減菌試験	有菌	圧延面	有菌海水	絶縁	1	26～27℃	5日	26～27℃	1日	27～28℃	2～5週間	○
		15×15mm ² (基板酸化処理無) 有菌	圧延面	有菌海水	絶縁	1	25～27℃	5日	—	0日	23～26℃	2～5週間	×
		15×15mm ² (基板酸化処理無) 有菌	圧延面	有菌海水	—	1	25～27℃	5日	—	0日	23～26℃	2～5週間	○

マスク板：圧延面

試験片は明記しない限り 30×30mm²

以上の結果から、室温で行う簡易条件での MBD の再現性は十分にある。そこで本研究では試験片サイズ $15 \times 15 \text{ mm}^2$ での、MBD の最適条件を確認するとともに、MBD 生成メカニズムの検討のために以下の実験を行った。また、新たに試験片サイズ $15 \times 15 \text{ mm}^2$ での基板表面粗さの影響も検討した。

- ① 試験片サイズ $15 \times 15 \text{ mm}^2$ において、簡易条件での MBD 試験を行う。
- ② 基板酸化処理、クランプの影響についてさらに検討し、試験片サイズ $15 \times 15 \text{ mm}^2$ における MBD の最適な処理条件を調べる。
- ③ 試験海水量を変化させその影響を調べる。
- ④ 滅菌試験を行い、微生物が MBD の発現に関与しているかどうかを調べる。
- ⑤ 試験海水中のイオン濃度を高め、銅イオン濃度が MBD の発現に与える影響を調べる。
- ⑥ 試験片の表面状態を変化させ、表面状態が MBD の発現に与える影響を調べる。
- ⑦ MBD 生成メカニズムを調べるため、実験前後の pH および溶存酸素濃度の変化を調べる。
- ⑧ 画像処理装置を用いて、得られた結晶粒子の粒子数と粒子面積を調べる。

第4章 実験方法

4.1 観察および測定装置

4.1.1 観察および測定装置の概要

本研究では海水の塩分濃度を測定するため、図 4.1 に示す電気伝導率計（東亜電波工業製 CM-14P）を使用した。pH および溶存酸素濃度の測定には、図 4.2 に示す pH メータ（東興化学研究所製 TPX-999i）および図 4.3 に示す溶存酸素メータ（東興化学研究所製 TOX-999B）を使用した。また、海水の銅イオン濃度の測定には図 4.4 に示すパックテスト（共立理化学研究所製 WAK-Cu）を使用した。



図 4.1 電気伝導率計の外観写真



図 4.2 pH メータ計の外観写真

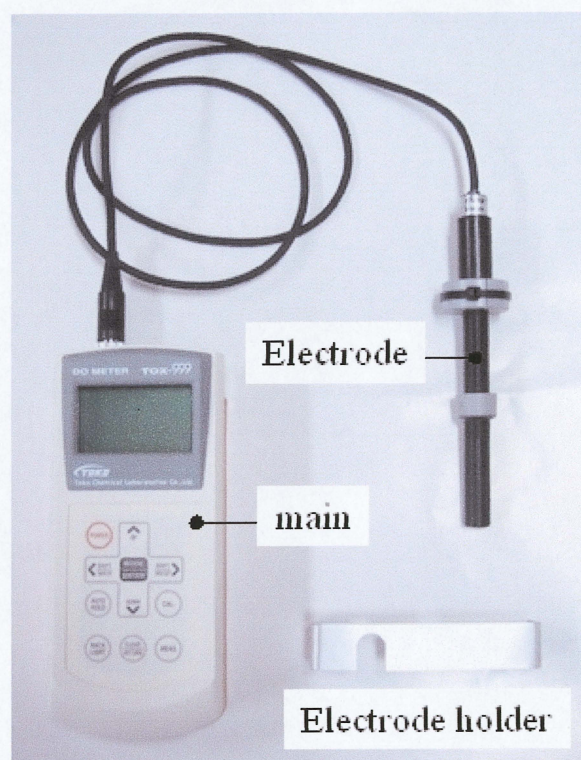


図 4.3 溶存酸素メータの外観写真



図 4.4 パックテストの外観写真

微生物および金属試験片表面の観察および分析には、図 4.5 に示す生物顕微鏡（オリンパス製 BHS-323）、図 4.6 に示す金属顕微鏡（オリンパス製 BH2-UMA）、図 4.7 および図 4.8 に示す走査型電子顕微鏡 SEM（日本電子製 JSM-T330A）を使用した。また試験片表面の凹凸を測定するため、図 4.9 に示す表面粗さ計（ミットヨ製 サーフテスト SJ-400）を使用した。

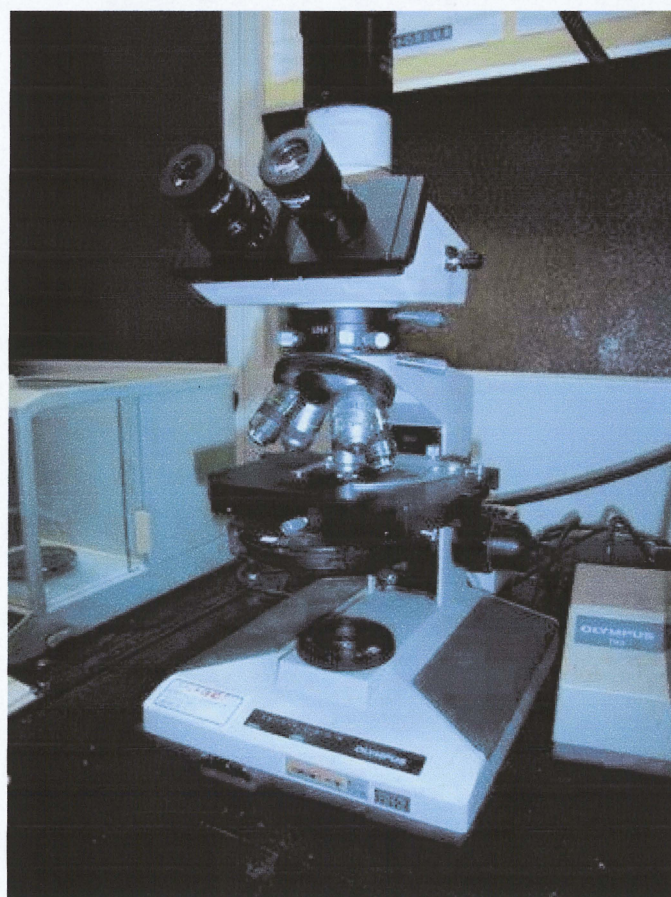


図 4.5 生物顕微鏡の外観写真

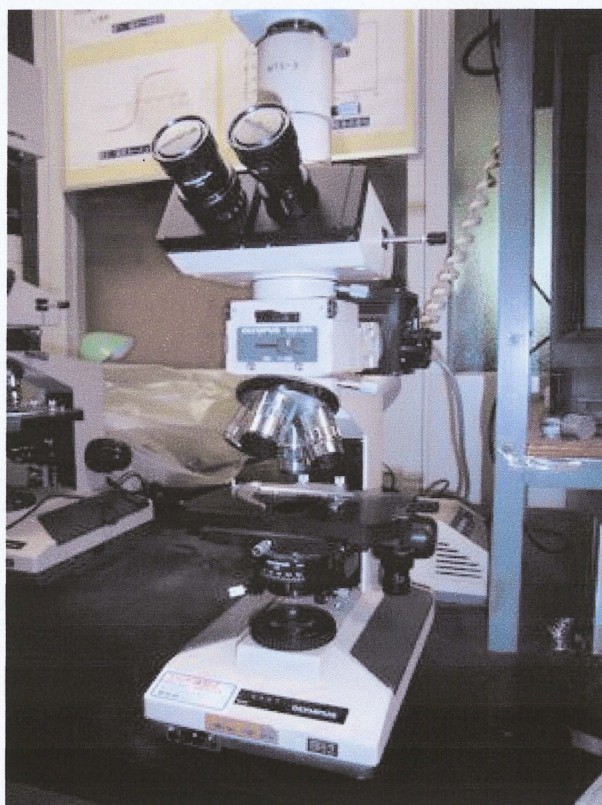


図 4.6 金属顕微鏡の外観写真



図 4.7 SEM の外観写真



- | | |
|----------------------------------|------------------------------------|
| ① 札 | ② 電源キー |
| ③ カメラ | ④ ケーブルスイッチ |
| ⑤ 状態ランプ | ⑥ [VENT] ・ [PUMP DOWN] |
| ⑦ [HT] | ⑧ [FILAMENT] |
| ⑨ [LSP] ・ [SPOT] ・ [YMD] ・ [PIC] | ⑩ [EXP] ・ [SLOW1] ・ [SLOW2] ・ [TV] |
| ⑪ [BRIGHTNESS] ・ [CONTRAST] | ⑫ [ACB] ・ [ASD] ・ [AFD] ・ [AFT] |
| ⑬ [ALIGN] ・ [RESET] ・ [DFU] | ⑭ [STIGMATOR] |
| ⑮ [FOCUS] | ⑯ [IMAGE SHIFT] |
| ⑰ [MAGNIFICATION] | ⑱ [SHUTTER] |
| ⑲ [PHOTO TIME] | |

図 4.8 SEM 各部の説明図

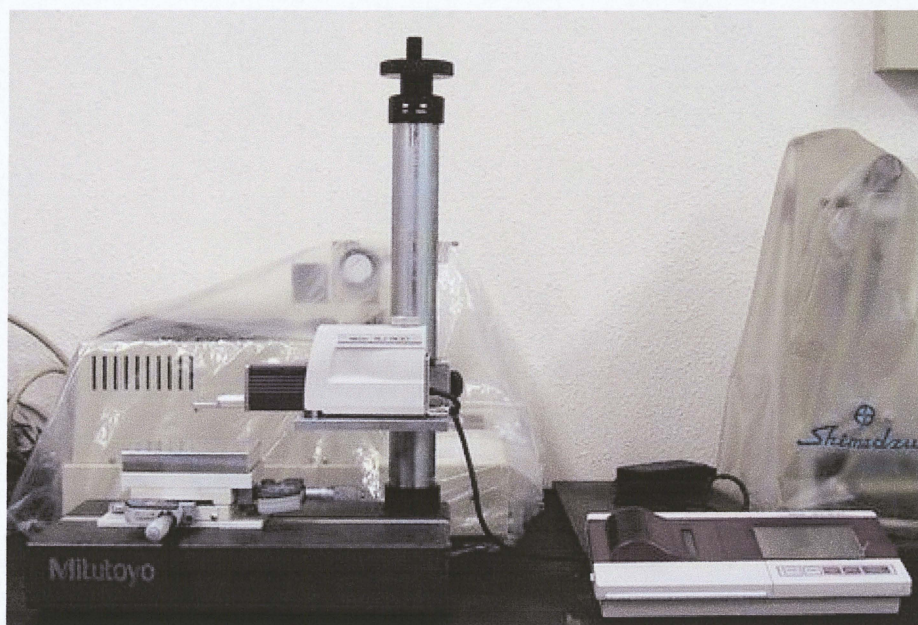


図 4.9 表面粗さ計の外観写真

図 4.10 に生物顕微鏡による観察システムの系統図を示す。生物顕微鏡で得られた映像を CCD カメラ（オリンパス製 CS520MD）で電気信号に変換して転送し、TV モニタ（ソニー製 PVM-2042Q）で映像化して観察した。また、同時にそれを DVD レコーダ（Panasonic 製 DMR-EH50-S）へ入力して DVD-RAM ディスクに記録した。映像の写真はパーソナルコンピュータ（EPSON 製 Endeavor AT920C）の DVD-VR 編集ソフト DVD-Movie Album SE Ver.3.0（Panasonic 製）より得た。

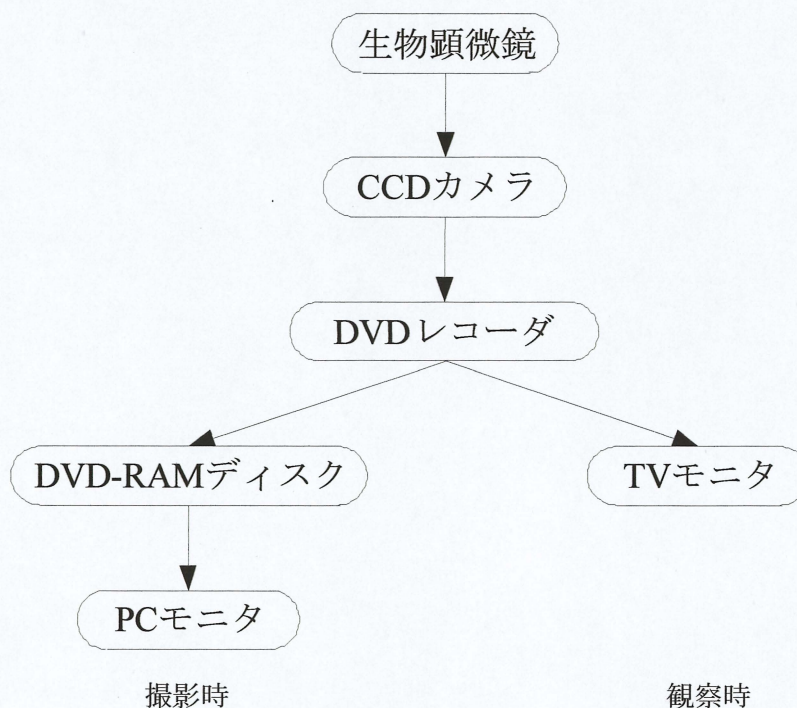


図 4.10 生物顕微鏡による観察システムの系統図

図 4.11 に金属顕微鏡による観察システムの系統図を示す。このシステムは金属顕微鏡, CCD カメラ (Nikon 製 DS-5M), カメラコントロールユニット (Nikon 製 DS-L1), パーソナルコンピュータによって構成されている。パーソナルコンピュータの画像解析ソフト WinROOF Ver.5.04 (三谷商事製) を用いることによって画像処理を行うことができる。

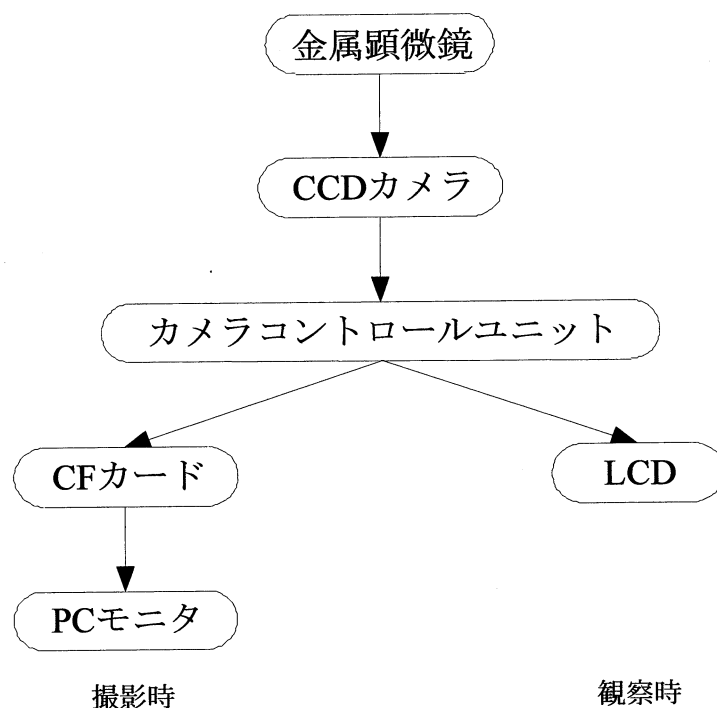


図 4.11 金属顕微鏡による観察システムの系統図

4.1.2 観察および測定装置の使用法

本研究で海水の成分分析のために使用した pH メータ, 溶存酸素メータ, また微生物の観察および金属表面の測定に使用した SEM, EPMA, 金属顕微鏡, 表面粗さ計の使用法を以下に示す。

4.1.2.1 pH メータの使用法

(1) 電極の準備

- ① 電極の保護キャップをはずし, 補充口ゴム栓をはずす。
- ② 電極の先端を精製水でよく洗い, 水分を柔らかい生地で吸い取る。

(2) 校正の消去

- ① **【MODE/ENTER】** キーを押しデータ機能を選択, **【DOWN】** キーを 2 回押しデータ消去へ移動, **【DOWN】** キーを 1 回押し全消去を選択, 全消去を実行する。

(3) pH 校正

- ① **【CLEAR/RETURN】** キーを押しながら, **【CAL.】** キーを押す。

- ② 100mL ビーカに中性リン酸塩 pH7 標準液 (pH6.86) を 80mL 注ぎ入れ、電極の液絡部が十分に浸るくらいビーカに入れ、2, 3 度揺り動かす。
- ③ **【CAL】** キーを押し、1 点目校正の開始 (AUTO マークが点灯する)。
- ④ 測定値が安定すると AUTO, HOLD が点灯し、pH7 標準液の校正値がホールドされ、pH7 標準液の校正ボトルマークが点灯し、1 点目校正は終了する。
- ⑤ pH7 標準液より電極を取り出し、電極先端を精製水でよく洗い、電極に付いた水分を柔らかい生地で吸い取る。
- ⑥ 100mL ビーカにフタル酸塩 pH4 標準液 (pH4.01) を 80mL 注ぎ入れ、電極の液絡部が十分に浸るくらいビーカに入れ、2, 3 度揺り動かす。
- ⑦ **【CAL.】** キーを押し、2 点目校正の開始 (AUTO マークが点灯する)。
- ⑧ 測定値が安定すると AUTO, HOLD が点灯し、pH4 標準液の校正値がホールドされ、pH4 標準液の校正ボトルマークが点灯し、2 点目校正が終了する。
- ⑨ **【MEAS.】** キーを押し (測定画面に移行) 校正の終了。

(4) 測定

- ① 電極先端を精製水でよく洗い、電極に付いた水分を柔らかい生地で吸い取る。
- ② 100mL ビーカにサンプル溶液を 80mL 注ぎ入れ、電極の液絡部が十分に浸るくらいビーカに入れ、2, 3 度揺り動かす。
- ③ 本体の画面の上部に AUTO, HOLD が点灯している場合は **【AUTO/HOLD】** キーを押し、測定値を表示させる。測定は電源が入っている限り随時行われている。
- ④ 指示値が一定になるまで測定し、その指示値を読み取る。

4.1.2.2 溶存酸素メータの測定方法

(1) 電極隔膜の交換

- ① 隔膜に電解液を約 1mL 注入する。(隔膜の縁から約 2cm が目安 ; 図 4.12) 膜表面に気泡が残らないように注意する。

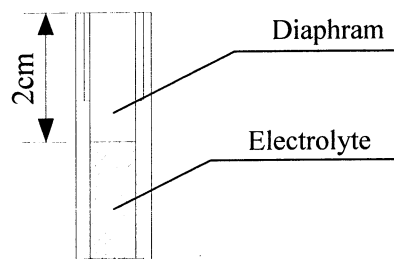


図 4.12 電解液注入量の目安

- ② 隔膜を電極本体に取り付ける。取り付ける際は、ゆっくりとねじ込み、強く締め付ける。
※ 電解液の量が多すぎると膜が膨らんでしまうので注意する。
- ③ 電極のウォーミングアップを行うため、電極を本体に取り付け、電源を入れて 30 分ほど放置する。このとき、オートパワーオフになっている場合は解除する。

※ 隔膜の交換は、測定値が安定しなくなったときや異常な値が出たとき、または3～4ヶ月毎に交換する。

※ 電解液は測定することで徐々に消耗されるので、隔膜内部の電極に気泡が付着しているときは電解液の交換を行う。隔膜を取り外し古い電解液を捨て、電極隔膜の交換手順どおりに新しい電解液を補充する。

(2) 校正

① 初めに、ゼロ標準液とスパン標準液（大気飽和水）を作る。

※ ゼロ標準液の作り方

1. 付属のゼロ標準液用ボトルに精製水を 50mL 入れる。
2. 無水亜硫酸ナトリウムを 12g 添加し、ふたを閉めて 20～30 秒振って完全に溶解させる。
3. 完全に溶解していたら無水亜硫酸ナトリウムを少し加え、粉末が少しとけ残るようにする。

※ スパン標準液の作り方

1. 500mL ビーカに純水を 400mL 入れ、スターラに設置する。
2. エアポンプでエアレーションを行いながら、回転数を 750rpm に設定して攪拌する。
3. 攪拌開始から 15 分で大気飽和水が出来上がる。

② 本体の画面が測定画面であることを確認し、【CLEAR/RETURN】キーを押しながら【CAL.】キーを押す。

③ 「ゼロ標準液またスパン標準液に電極をつけて CAL」の表示が出たら、ゼロ標準液に電極を入れ、【CAL.】キーを押す。CAL マークと校正ボトルマーク C が点灯し、AUTO マークが点滅してゼロ標準液の校正が始まる。

④ AUTO, HOLD が点灯し、校正ボトルマーク C の表示が Z に代わるとゼロ標準液校正が終了し、画面に校正值「0.00 mg/L」が表示される。

⑤ ゼロ標準液校正終了から 2 秒後に「スパン標準液に電極をつけて CAL」の表示が出るので、電極を純水で十分に洗浄し、付着した水分をふき取る。スパン標準液に電極を入れ、【CAL.】キーを押す。CAL マークと校正ボトルマーク Z が点灯し、AUTO マークが点滅してスパン標準液の校正が始まる。

※ ゼロ標準液が電極に付着しているとスパン標準液の酸素濃度が低下するので十分注意する。

⑥ AUTO, HOLD と校正ボトルマーク S が点灯するとスパン標準液校正が終了し、画面に校正温度における大気飽和水の理論溶存酸素濃度値が表示される。

⑦ スパン標準液校正終了から 2 秒後に「校正 OK MEAS キーで測定へ」の表示が出るので、【MEAS.】キーを押すと測定画面に移る。

(3) 測定

① 試料溶液を 500mL ビーカに入れる。試料が海水である場合は、塩分濃度計を用いて塩分濃度を測定する。

- ② ビーカ中に攪拌子を入れ、スターラ上に置く。スターラの電源を入れ、回転数を 250rpm に設定して攪拌する。
- ③ DO 電極を純水で洗浄し、付着した水分をふき取る。
- ④ 試料溶液中に、水温センサが浸かるように電極を入れ、電極を固定台に固定する。
- ⑤ 本体の画面の上部に AUTO, HOLD が点灯している場合は【AUTO/HOLD】キーを押し、測定値を表示させる。測定は電源が入っている限り随時行われている。
- ⑥ 測定中に本体の上下ボタンを押すと塩分濃度の設定を変更することができるので、先程測定した値に設定する。現在の塩分濃度の設定値は本体画面左下に表示されている。
- ⑦ 5～10 分で測定値が安定するので、安定した値を読み取る。
- ⑧ 続けて他の試料を測定する場合は①～⑦を繰り返す。
- ⑨ 測定が終了したら本体の電源を切り、電極を純水で洗浄する。隔膜の乾燥と傷を防ぐため、電極は純水で満たしたフラン瓶に差し込んで保管する。また、電極は本体に接続したままにしておく。(次回測定時に電極のウォーミングアップを省略できる)

(4) 電極の長期の保管

- ① 隔膜を取り外し、電解液を捨てる。
- ② 純水で電極内部をよく洗浄し、純水を振り切り隔膜を外した状態で保存する。
- ③ 隔膜は再利用できないので捨てる。

4.1.2.3 パックテストの使用法

- ① チューブの先端のラインを引き抜き、穴を上にして、指でチューブの下半分をつまみ、中の空気を追い出す。
- ② そのまま①の状態、穴を測定した液の中に入れ、つまんだ指をゆるめ、半分くらい水を吸い込むまで待つ。
- ③ かるく 5～6 回振り混ぜて、1 分後に標準色の上ののせて比色する。

4.1.2.4 SEM の使用法

- ① 観察したい試料を用意する。試料が実験後の試験片の場合、試験片を精製水につけ、2, 3 度揺り動かして表面の塩を除去する。試料がフィルタの場合は、 $9 \times 9 \text{mm}^2$ に切ったアルミ板（公称板厚 0.8mm）上にカーボンテープで固定し、表面をカーボン蒸着によりコーティングする。
- ② 試料をカーボンテープで試料台に固定する。
- ③ SEM を起動し、試料の交換を行い「PUMP DOWN」を押す。
- ④ 「HT READY」が点灯したのを確認した後、「HT」を押し、「FILAMENT」を 12 時まで回す。
- ⑤ 「MAGNIFICATION」を 10000 倍にし、「MODE (LSP)」, 「SPEED (SLOW1)」にする。
- ⑥ 「BRIGHTNESS」で波形を画面の下から 1/4 に調整する。
- ⑦ 「FILAMENT」を調整し、波形が第 2 ピーク手前になるように設定する。波形の概要図を図 4.13 に示す。

- ⑧ 「MODE (PIC)」, 「SPEED (EXP)」にし, 「MAGNIFICATION」を 50 倍にする.
- ⑨ 「FOCUS」を調整し, ピントを合わせる.
- ⑩ 「MAGNIFICATION」を 500 倍にし, 「CONTLAST」, 「BRIGHTNESS」を図 4.14 のように中心の 3 目盛りが凸部に入るよう調整する. (CONTLAST は凸の幅, BRIGHTNESS は凸の位置を調整できる)
- ⑪ 任意の倍率で観察を開始する.

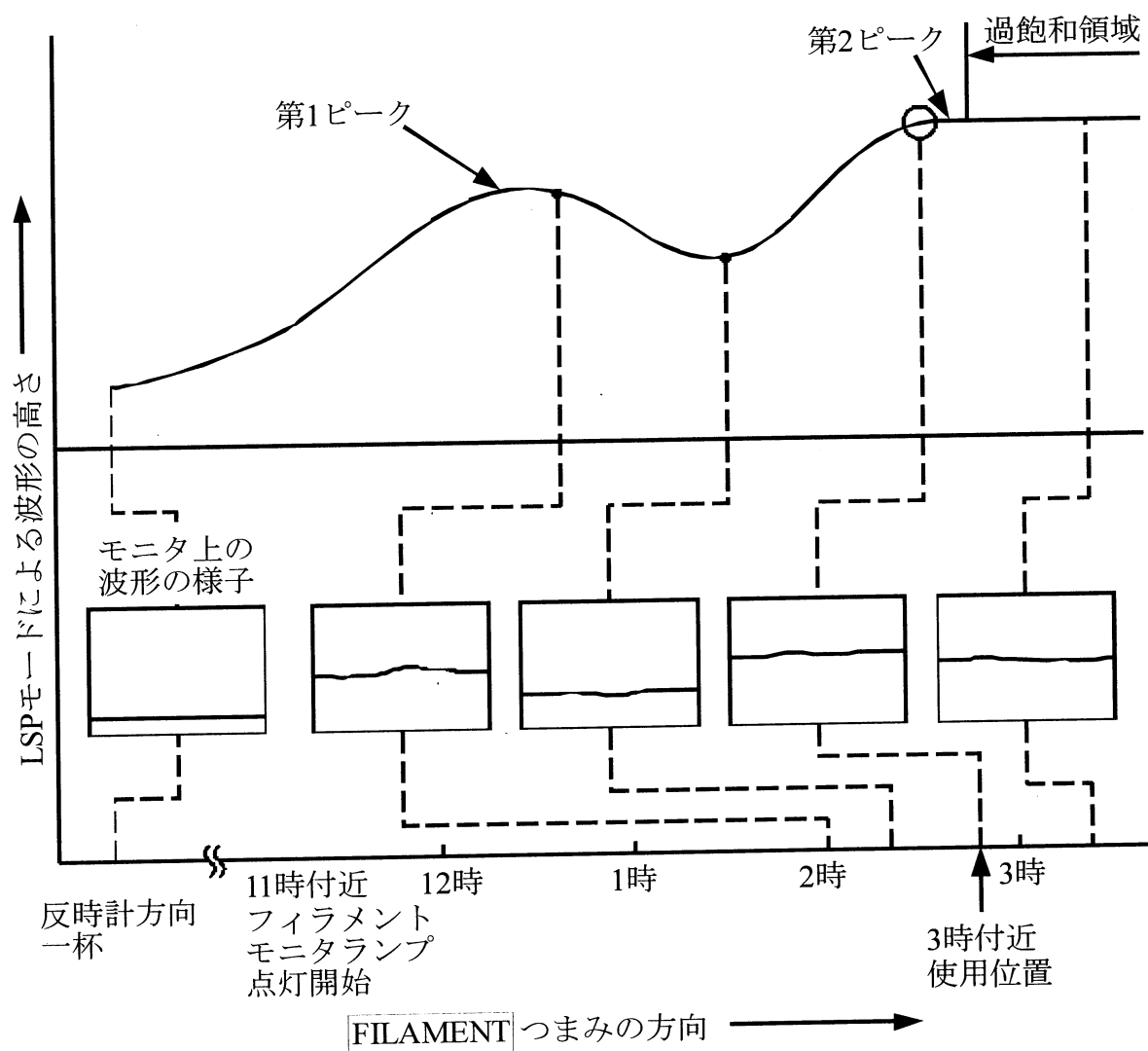


図 4.13 モニタ上に現れる波形変化の説明図

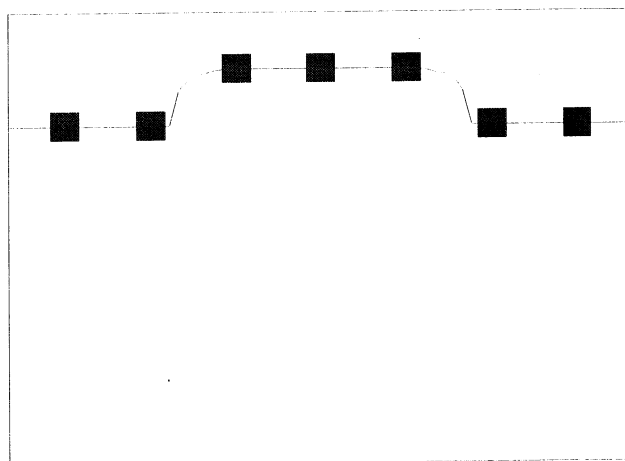


図 4.14 CONTRAST, BRIGHTNESS 調整目安


4.1.2.5 金属顕微鏡の使用法




- ① 金属顕微鏡, カメラコントロールユニット (Nikon 製 DS-L1) の電源を入れる.
- ② 試料台の中央に測定したい基板を置き, 対物レンズを 10 倍にセットする.
- ③ 照明装置の光量調節ツマミを 10 まで回し, 顕微鏡の絞りと光量を最大にする.
- ④ マウスを右クリックして撮影メニューを表示させ, 「CAM」タグをクリックして CAM メニューを表示させる.
- ⑤ 試験片を撮影する場合は「Easy」タグをクリックし, 撮影条件の中から「Metal Ceramic」を選択する. フィルタの場合は「Advn.」タグをクリックし, 「表示モード」, 「露出モード」, 「電子シャッター速度」, 「トーン」をそれぞれ, 「1.3Mi」, 「MANU」, 「1/1000s」, 「TON5」に指定する.
- ⑥ 「REC」タグをクリックし, REC メニューを表示させる.
- ⑦ メニューの中の「撮影ソース」, 「ファイル形式」, 「画像サイズ」, 「圧縮率」をそれぞれ, 「s1.3M」, 「JPEG」, 「640×480」, 「JPEG Normal」に指定する.
- ⑧ 粗動ねじおよび微動ねじを回し, ピントを合わせる.
- ⑨ ステージに取り付けられているマイクロメータを利用して, 撮影箇所がモニタ上の中心にくるようにステージを調整する.
- ⑩ REC メニューの「CF」アイコンをクリックすると撮影し, コンパクトフラッシュに画像が保存される.

4.1.2.6 表面粗さ計の使用法

- ① 電源を入れる. バッテリー残量が少ないときは AC アダプタを接続する.
- ② 試料表面をアルコールで洗浄し, 計測したい場所の左端が触針の下に来るようにする.
- ③ 測定条件を変更する. 現在の設定条件は画面左上に表示されている.
 - ・ 測定レンジ (測定分解能) を変更する場合, 画面の「測定条件」→「Page1/3」→「Page2/3」→「レンジ」の順にタッチし, 任意のレンジを選択する. レンジは「800(μm)」, 「80」, 「8」の順に感度が上がり, デフォルトは「800」である. 表面が粗いものや表面粗さが未知の試料を測定する場合は「800」を選択し, 測定結果に応じてより高感度の測定レンジに変更する. 「レンジ」

をタッチすると変更が決定される。

- ・ 測定曲線を変更する場合、画面の「測定条件」→「曲線」の順にタッチし、測定したい曲線を選択する。Pは断面曲線、Rは粗さ曲線（断面曲線からうねり成分を除去したもの）。通常はRを選択する。「曲線」をタッチすると変更が決定される。
- ・ 基準長さを変更する場合、画面の「測定条件」→「 λ_c 」（測定曲線 R）または「L」（測定曲線 P）の順にタッチし、任意の基準長さに設定する。「 λ_c 」または「L」をタッチすると変更が決定される。
- ・ 評価長さを変更する場合は、区間数を変更することで評価長さを変更することができる（例：基準長さ 0.8mm，区間数 5 → 評価長さ 1.25mm）。画面の「測定条件」→「N」の順にタッチし、任意の区間数を選択する。また、「L」をタッチすると評価長さを任意の値で指定することができる。「N」をタッチすると変更が決定される。
- ・ カットオフ値は基準長さに応じて自動で変更されるが、基準長さが 0.08mm または 0.25mm の場合のみ変更することができる。変更する場合は、画面の「測定条件」→「 λ_s 」の順にタッチし、カットオフ値を指定する。「 λ_s 」をタッチすると変更が決定される。
- ・ 変更が終了したら、画面左下の （ホーム）をタッチしてホーム画面に戻しておく。

- ④ ホーム画面の （DAT）をタッチして DAT 画面にする。スタンドの上下ハンドルを回し、触針を試料に接触させる。画面のスタイラス位置表示が 0 付近のところでハンドルを固定し、本体の上下ツマミで $0.0\mu\text{m}$ になるように調整する。（上下位置決め）
- ⑤ （対象切り換え）をタッチする。表示が「***** 回転」であることを確認し、「START」ボタンを押すと、水平出しが開始される。測定終了後、画面に「〇〇 回転」と表示されるので、一度触針を試料から離し、本体の斜傾ツマミを表示回転数だけ回す。（表示が正の場合は時計回り、負の場合は反時計回り）
- ⑥ 水平出し後の表示が 0.00 回転になるまで⑤を繰り返す。
- ⑦ 校正を行う（次ページ参照）。校正は検出器（触針等）を着脱した場合に行い、それ以外では定期的に行えばよい。従って、普段はこの工程を行わなくてもよい。
- ⑧ 画面左下の （ホーム）をタッチしてホーム画面に戻す。ホーム画面で「START」ボタンを押すと計測が開始される。計測が終了すると、画面に計測結果が表示される。
- ⑨ 計測結果の R_a （または P_a ）を確認し、基準長さが適切であるかどうかを確認する。③の基準長さを変更する場合を参考に、基準長さの設定画面を表示する。画面には設定値の横に、適応する R_a の範囲が表示されているため、計測結果からその範囲内にある基準長さを選択する。基準長さを変更した場合は、そのまま再度計測する。
- ⑩ 計測終了後、「PRINT」ボタンを押すと計測結果がプリントされる。

4.2 供試材および試験片

4.2.1 供試材

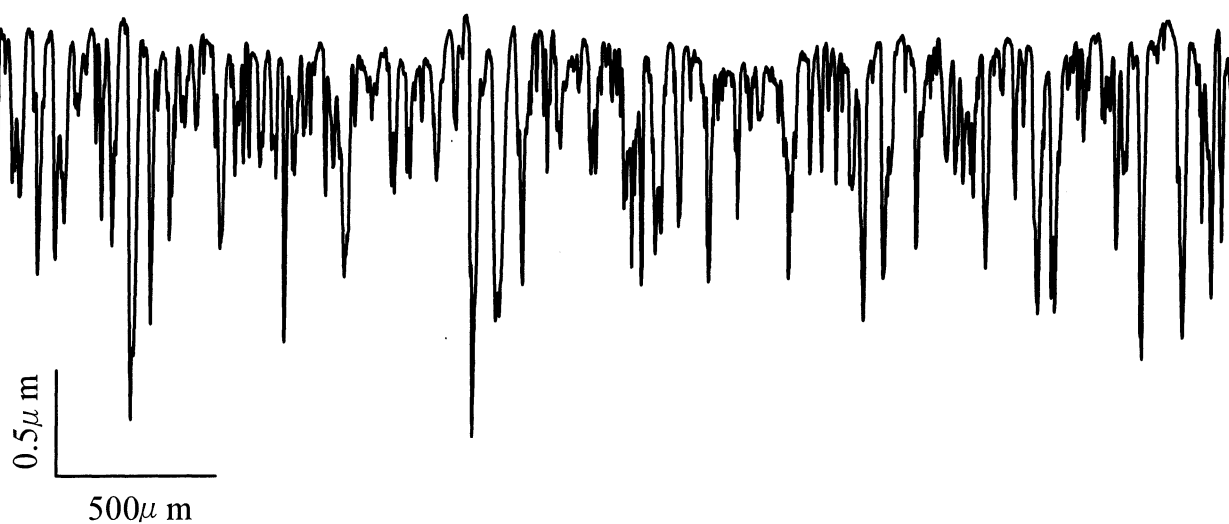
本研究で用いた材料は、市販の無酸素銅板（C1020P-H 材）である。無酸素銅の公称板厚は 0.8mm である。供試材の化学的性質を表 4.1 に、機械的性質を表 4.2 に示す。また、供試材の表面粗さ（圧延面）の測定結果を図 4.15、図 4.16 に示す。

表 4.1 供試材の化学的性質

成分 材質	P/%	S/%	Fe/%	Cu/%	Zn/%	Cd /%	Sn/%	Hg /%	Pb/%	others
C1020P-H	<3ppm	<8ppm		99.99	<1ppm	<1ppm		<1ppm	<10ppm	

表 4.2 供試材の機械的性質

特性 材質	引張り強さ /MPa	全伸び /%	表面粗さ $Rz / \mu m$	
			0°	90°
C1020P-H	288.1	6.8	1.5	1.7

図 4.15 無酸素銅板の表面粗さ測定結果 (0° ; $Rz = 1.5 \mu m$)

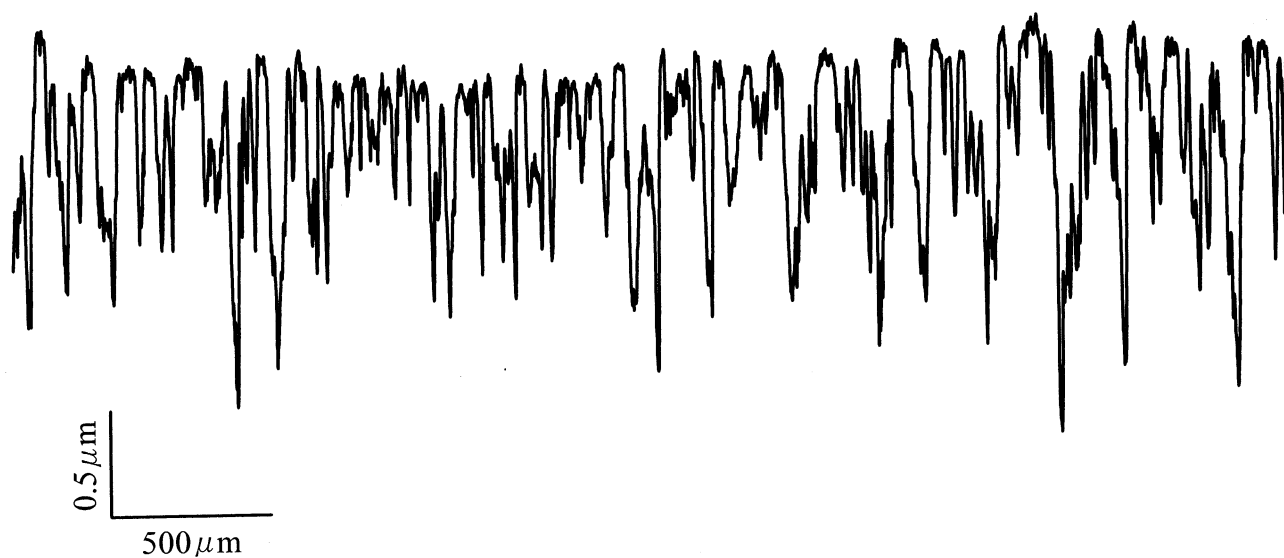


図 4.16 無酸素銅板の表面粗さ測定結果 (90° ; $R_z = 1.7 \mu\text{m}$)

4.2.2 試験片

本研究では、試験片を足踏み式シャーリングカッタ（杉浦製作所 102 型）で切断することにより作成した。無酸素銅基板、マスク板表面はともに圧延面である。本研究で使用した試験片の寸法を図 4.17 に示す。通常は図 4.17(a)に示す寸法で試験を行ったが、一部の試験では図 4.17(b)に示す寸法で試験した。

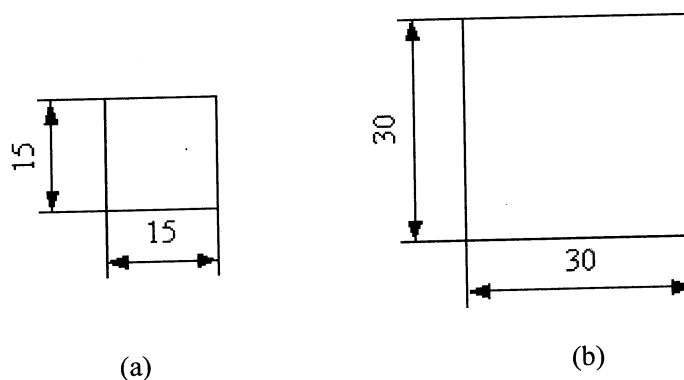


図 4.17 試験片寸法

4.3 試験海水

本研究で用いた海水は、津港阿漕浦中防波堤の堤防上（津興港中道北官周辺）から、水面付近の位置で汲み上げ採取したものである。採取場所を図 4.18 に示す。地図は Mie Click Maps(<http://www.gis.pref.mie.jp/index.html>)、ダウンロード日 2009 年 12 月 21 日)から引用した。その海水成分条件を知るために、三重県科学技術振興センター水産研究部による調査データを基に 1 年の平均値を

求め、これより Stephen C.Dexter⁽¹⁵⁾の提唱した換算式を適用してイオン濃度等を算出した。表 4.4 に三重県科学技術振興センターの調査データ⁽¹⁶⁾（平成 19 年度年間平均値）を示す。



図 4.18 海水の採取場所

表 4.4 三重県科学技術振興センター水産研究部の調査データ（平成 19 年度年間平均値）

水温	(°C)	16.67
塩分	(‰)	31.26
DO	(ppm)	8.63
pH		8.28
COD	(ppm)	0.51
NH ₄ -N	(μ g-at. / l)	0.020
NO _{2,3} -N	(μ g-at. / l)	0.014
DIN	(μ g-at. / l)	3.88
PO ₄ -P	(μ g-at. / l)	0.0088
Turb	(NTU)	0.4

※調査データは 5, 6, 11 月の平均値，調査ポイントは津港沖約 6km の地点
水深はすべて 2m 以下

換算式とは

$$C' = C \times S / 35$$

ただし S : 海水の塩分濃度 (‰)

C : S = 35 (‰) のときのイオン濃度または分子の濃度

C' : 求めるイオンおよび分子の濃度

であり, これにより S がわかればその時の各海水成分値が求まる. この換算式によって算出された海水成分データを表 4.5 に示す. この表より, 海水中に多く含まれているイオンは順に Cl^- , Na^+ , SO_4^{2-} であることがわかる. 参考として塩分濃度が 35‰ のときの海水成分データ⁽¹⁸⁾を表 4.6 示す.

表 4.5 海水の成分表

成分	濃度 (g/kg)
Na^+	9.61
K^+	0.35
Mg^{2+}	1.15
Ca^{2+}	0.37
Sr^{2+}	0.0071
Cl^-	17.28
Br^-	0.060
F^-	0.00089
HCO_3^-	0.13
SO_4^{2-}	2.42
B(OH)_3	0.0036

表 4.6 参考：海水の主要成分の組成（塩分 35‰）

成 分	濃度 (g/kg)	重量百分率 (%)
Cl ⁻	19.35	55.07
Na ⁺	10.76	30.62
SO ₄ ²⁻	2.71	7.72
Mg ²⁺	1.29	3.68
Ca ²⁺	0.41	1.17
K ⁺	0.39	1.10
HCO ₃ ⁻	0.14	0.40
Br ⁻	0.067	0.19
Sr ²⁺	0.008	0.02
B ³⁺	0.004	0.01
F ⁻	0.001	0.01
合計		99.99

4.4 試験方法

微生物の材料生成機能を利用した材料析出法として、嫌気性環境を人工的に作り、ろ過フィルタを通してマスク材料を微生物処理した基板に微細粒子として移着させる方法を MBD（バイオデポジション）と呼ぶ。この粒子析出法の説明を図 4.19 に示す。

今回、MBD の再現性の確認とともに、試験基板およびマスク板の種類の影響について調べた。ここでは、MBD の試験装置の概要と基本的な実験手順を述べる。

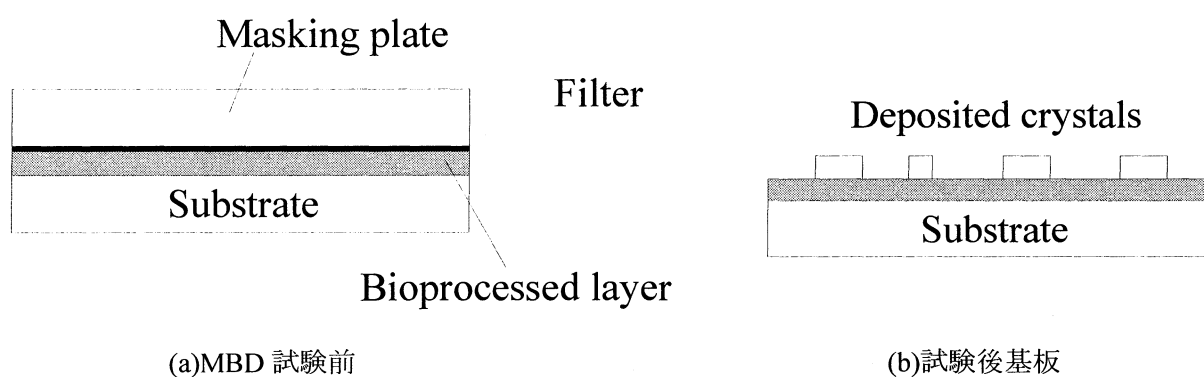


図 4.19 MBD の説明図

4.4.1 試験装置

試験容器には 500mL, 100mL ビーカを用いた。その中に用意した海水を 400mL または 80mL 入れ、試験片をビーカの底に浸漬した。海水の蒸発を防ぐため、ビーカはアルミホイルで蓋をした。試験装置の概略図を図 4.20 に示す。有菌試験ではこれをタグボックス内に置き、滅菌試験ではこれをクリーンベンチ内に置いた。クリーンベンチ内は常に送風し、殺菌灯を点灯した。

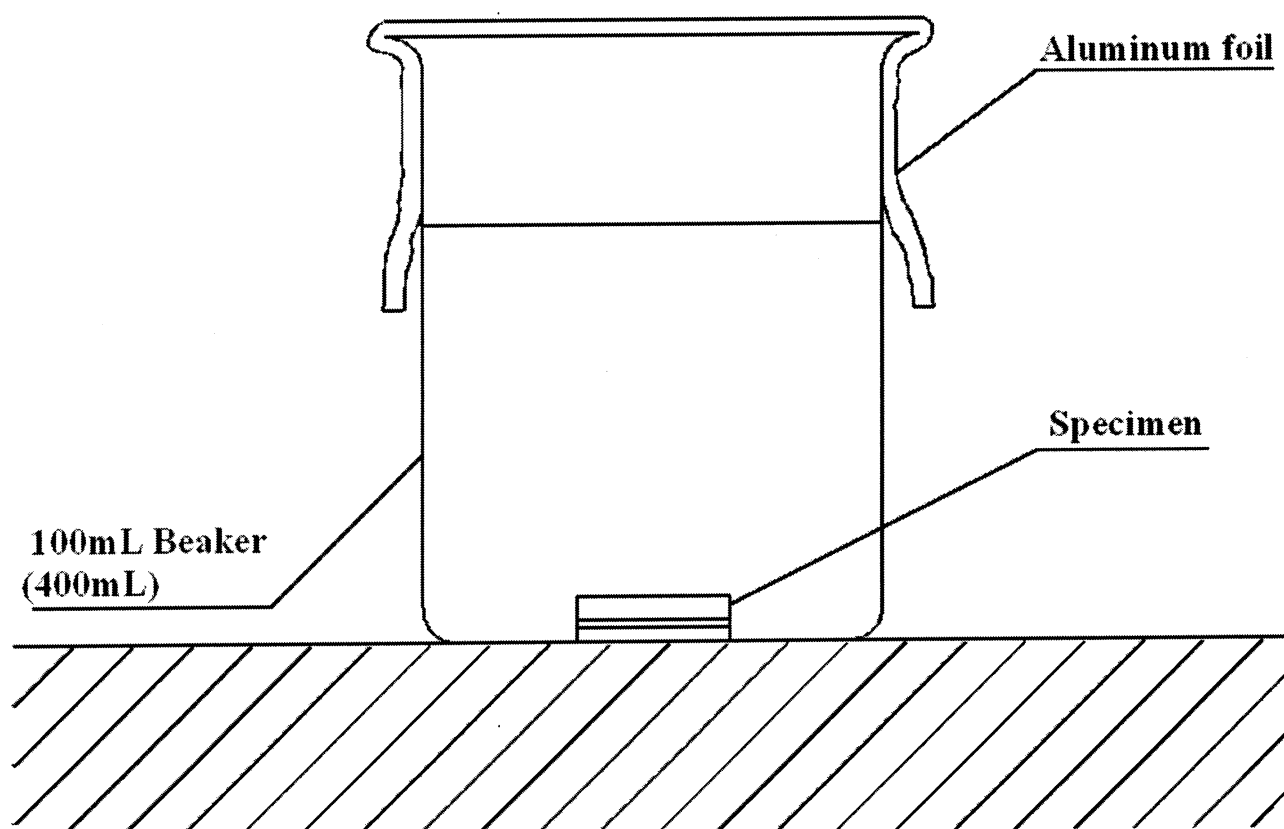


図 4.20 MBD 試験装置外略図

4.4.2 試験記号

試験片の種類や基板の酸化処理の有無など、各実験における試験条件を表すために独自の試験記号を用いた。試験記号の表記方法を以下にまとめる。

例：無酸素銅標準試験の場合



上記が無酸素銅標準試験の場合の試験記号の例である。使用した材料を基板、マスク板の順に示す。無酸素銅は Cu と表記する。このとき基板を酸化処理した試験の場合は、基板の記号の後ろに(O)を、基

板表面を研磨した場合はPを追記する。また、銅イオン濃度を高めた際は記号の一番最後に(ion)と追記する。さらに、試験材料の後にハイフンを挟んでその他の処理条件または実験条件を示す。上記の「F」はフィルタが浸漬処理されていることを示し、「C」はクリップにより絶縁クランプされていることを示す。(フィルタはどの試験でも使用しているので、「F」の記号がない場合は浸漬処理をしていないフィルタを使用していることになる。)試験片サイズは通常 $30 \times 30 \text{ mm}^2$ であるため、 $15 \times 15 \text{ mm}^2$ の試験片を使用した試験では「15」と表記する。これらの処理条件の記号一覧を表 4.7 に示す。

表 4.7 処理条件の記号表記

記号	意味
F	フィルタ浸漬処理有
C	クランプ有
S	滅菌試験
P0.04	基板表面粗さ $R_z=0.04 \mu\text{m}$
P0.05	基板表面粗さ $R_z=0.05 \mu\text{m}$
P3	基板表面粗さ $R_z=3 \mu\text{m}$
P3,0.05	基板表面粗さ $R_z=3 \mu\text{m}$, $R_z=0.05 \mu\text{m}$ (中心を境にそれぞれの表面粗さとする)
15	試験片サイズ $15 \times 15 \text{ mm}^2$

4.4.3 試験手順

- ① 各試験条件につき基板、マスク板をそれぞれ 2 枚用意する。これらをビーカー内に移し、99%アルコールで浸した。
- ② ビーカーを超音波洗浄器 (BRANSON 製 B-12) 内に置き、1 分間超音波洗浄した。洗浄後各試験片を取り出し、新しいアルコールで表面を拭いた。
- ③ 海水は一度ろ紙 (Whatman 製 FILTER PAPER 1) でろ過した。
- ④ フィルタ (MILLIPORE 社製 MEMBRANE FILTERS $0.22 \mu\text{m}$) を浸漬する場合は 5 日間有菌海水中に浸漬し、微生物処理を施した。
- ⑤ 基板を酸化処理する場合は 1 日間有菌海水中に浸漬し、微生物酸化処理を施した。
- ⑥ ②で用意したマスク板、③で用意したフィルタ、④で用意した基板を密着クランプする場合はステンレス製のクリップ (OHTO 製 GGM-7) を使用したため、基板とマスク板が導電されないようにクリップと試験片の間に PP 製のフィルム (LIHIT LAB. 製 F-78-25, サイズ: $18 \times 20 \text{ mm}^2$) を挟み絶縁した。クランプした写真を、図 4.21 に示す。
- ⑦ 有菌試験では 100mL ビーカーに有菌海水を 80mL、または 500mL ビーカーに有菌海水を 400mL 入れ、⑥の試験片を浸漬した。また、滅菌試験では滅菌した海水をクリーンベンチ内で 80mL 入れ、⑥の試験片を浸漬し、オートクレーブで再度滅菌した。
- ⑧ 有菌試験のビーカーはタグボックス内に、滅菌試験のビーカーはクリーンベンチ内に置いて試験を開始した。所定の試験期間経過後、試験片を取り出し観察、測定した。試験後の試験片はデシケータ内

に保存した.

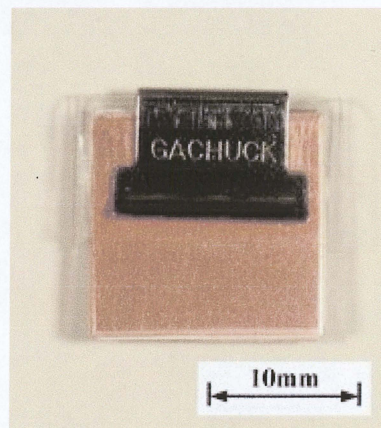


図 4.21 クランプした試験片の外観写真

4.5 滅菌方法

4.5.1 滅菌装置

微生物作用を確認するためには滅菌試験を行う必要があり，それに用いる器具等は全て滅菌しなければならない．本研究ではガラスおよび金属器具の滅菌には乾熱滅菌器（三洋電機製 MOV-202S）を使用し，フィルタや海水などの高温に耐えられないものにはオートクレーブ（三洋電機製 MLS-2400）を使用した．また試験中に外部からの微生物混入を防ぐため，試験中のビーカはクリーンベンチ（三洋電機製 MCV-9BSU）内に保存した．滅菌条件を表 4.8 に示し，各試験装置の外観をそれぞれ図 4.22，図 4.23 および図 4.24 に示す．滅菌する器具は全て事前に洗浄剤を用いて水洗いし，自然乾燥させた．試験中の作業はクリーンベンチ内で行い，実験者も手をアルコールで消毒した．器具や試験片は個別に滅菌したが，試験装置を組み立てた後もう一度その装置をオートクレーブで滅菌した．

表 4.8 各滅菌装置の使用条件

条件	乾熱滅菌器	オートクレーブ	クリーンベンチ
温度(℃)	180	121	31±1
時間(分)	120	60	UV 常時
備考	—	圧力(MPa)：約 0.12	送風
実験器具等	ビーカ ピンセット クリップ等 試験片	海水 フィルタ 試験装置	滅菌後の器具 試験中の試験装置



図 4.22 乾熱滅菌器の外観写真



図 4.23 オートクレーブの外観写真



図 4.24 クリーンベンチの外観写真

4.5.2 滅菌手順

4.5.2.1 乾熱滅菌器の使用方法

- ① 被滅菌物をアルミホイルで2重に包む。
- ② タイマーの動作切換えスイッチが連続になっていることを確認し、電源を入れる。
- ③ 被滅菌物を器内に入れる。
- ④ 設定ボタンを押しながらつまみを回し、設定温度を調節し、滅菌温度を180℃に設定する。
- ⑤ タイマーを調節して滅菌時間を2時間に設定し、タイマー動作切換えスイッチを「入」→「切」に切り替える。
- ⑥ タイマー残時間表示ランプが点灯するのを確認する。(滅菌開始)
- ⑦ 滅菌終了後は被滅菌物の急激な冷却による損傷を防ぐため、デジタル温度計が50℃付近になるまでそのまま放置する。(滅菌を開始してからここまで約6時間)
- ⑧ 扉を開け、被滅菌物をクリーンベンチ内に移す。被滅菌物はアルミホイルに包んだ状態で保存し、必要なときにアルミホイルをはずして使用する。

4.5.2.2 オートクレーブの使用方法

- ①被滅菌物をアルミホイルで2重に包む。
- ②排気タンクの水位レベルが「LOW」と「HIGH」の間にあることを確認する。「LOW」に達していない場合は精製水を注水し、「HIGH」に達している場合は精製水を入れ替える。また、1ヶ月以上使用していない場合は排気タンクを洗浄する。
- ③圧力計でチャンバー内圧力が0kg f/cm²に下がっていることを確認し蓋を開ける。下がっていない場合は下がるまで待つ。
- ④滅菌用水として、ヒーターカバーの水位レベル金具の先端が浸るまで(1.3~1.5L)精製水を入れる。
- ⑤被滅菌物をステンレスカゴに入れてチャンバー内にセットし蓋をする。
- ⑥排気ツマミを時計方向に硬くなるまで回し、排気バルブを閉める(注; 回し過ぎない)。
- ⑦電源スイッチを入れ、滅菌温度(通常121℃)、滅菌時間(通常1h)を設定する。
- ⑧蓋締確認ランプの点灯を確認し、ハンドルが重くなるまで閉める。
- ⑨スタートスイッチを押して滅菌を開始する。チャンバー内が設定温度に達すると滅菌タイマーが動作を開始する(スタートから約20分後)。設定温度はTEMPボタン、設定時間はTIMERボタン、残り時間はTEMPとTIMERを同時に押すと表示される。
- ⑩滅菌終了で「ピー」とブザーが鳴る。
- ⑪チャンバー内圧力が大気圧に復帰すると「ピ・ピー」ブザーが鳴る。(終了から約15分後)。
- ⑫大気圧復帰後、チャンバー内の温度が80℃まで下がると、「ピッ・ピッ・ピッ・・・」と完了のブザーが鳴る(終了から約35分後)。
- ⑬完了後もチャンバー内は高温であるため、十分な時間放置する(30分程度)。
- ⑭蓋と排気バルブを開け、被滅菌物を取り出しクリーンベンチ内に移す。
- ⑮被滅菌物はアルミホイルに包んだ状態で保存し、必要なときにアルミホイルをはずして使用する。
- ⑯滅菌用水が十分冷えてから、排水口キャップを外して排水する(完了から1時間程度)。

4.6 研磨方法

試験片表面状態を変化させるため、試験片を研磨台（ $\phi 42\text{mm}$ ）に両面テープで接着し、研磨装置（笠井商工製 JEWEL）を用いて研磨を行った。研磨装置の回転数はすべて 140rpm で行った。なお、圧延表面の表面粗さは圧延方向で $R_z=1.5\ \mu\text{m}$ 、 90° 方向で $R_z=1.7\ \mu\text{m}$ であった。

4.6.1 研磨装置

研磨装置を図 4.25 に示す。



図 4.25 研磨装置

4.6.2 研磨手順

それぞれの研磨手順を以下に記す。

① バフ研磨, $R_z=0.04, 0.05\ \mu\text{m}$

- (1) 研磨装置に#1500 サンドペーパーをセットし、表面の粗い傷がなくなるまで約 15 分間研磨する。
- (2) 研磨装置にセットした研磨バフ（リファインテック製）に、精製水で 10 倍に薄めた砥粒径 $1\ \mu\text{m}$ アルミナ懸濁液を少量たらしバフ研磨し、 $R_z=0.2\ \mu\text{m}$ の鏡面に仕上げる。
- (3) 研磨装置にセットした研磨バフに、精製水で 10 倍に薄めた砥粒径 $0.05\ \mu\text{m}$ アルミナ懸濁液を少量たらし(2)と同様に約 15 分間バフ研磨し、 $R_z=0.04\ \mu\text{m}$ または 10 分間バフ研磨し、 $R_z=0.05\ \mu\text{m}$ の鏡面に仕上げた。

② #240 サンドペーパー, $R_z=3\ \mu\text{m}$

#240 サンドペーパーで約 15 分間研磨して荒らし、 $R_z=3\ \mu\text{m}$ の表面に仕上げた。

③ $R_z=0.05\ \mu\text{m}$, $R_z=3\ \mu\text{m}$ 表面

- (1) ①を行った基板の半分にセロテープを貼り付け保護する。
- (2) 保護していない面を②と同様に研磨して荒らし、 $R_z=0.05\ \mu\text{m}$, $R_z=3\ \mu\text{m}$ の表面に仕上げた。

第5章 析出粒子の評価法

MBD による析出粒子生成量を定量的に評価するため、次の評価法を使用した。析出粒子と基板との色調差（濃度）に注目し、2 値化画像処理を行なうことで生成量を求めるものである。撮影には図 5.1 に示す金属顕微鏡（オリンパス製 BH2-UMA，対物レンズ 10 倍，接眼レンズ 10 倍）を使用し、画像解析ソフト WinROOF Ver.5.04（三谷商事製）を利用して粒子数と粒子面積（投影面積）を測定した。

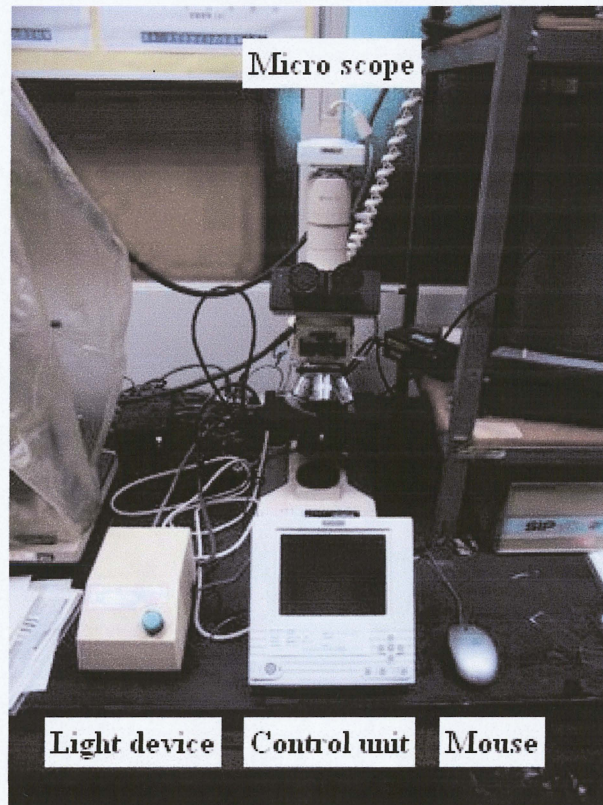


図 5.1 画像処理システムの外観写真

5.1 金属顕微鏡像の撮影方法

図 5.2 に示す基板表面上の 5 箇所得られた金属顕微鏡像を画像解析ソフトに取り込む。これまでの研究⁽¹³⁾では、基板表面の任意の 5 箇所得られた金属顕微鏡像を使用していたが、場所の選定によるばらつきが大きいため、測定箇所を固定した。写真は 640×480 画素で撮影し、実寸は $1143 \times 857 \mu\text{m}^2$ （1 画素は $1.79 \times 1.79 \mu\text{m}^2$ ）。検鏡総面積は 4.90mm^2 である。

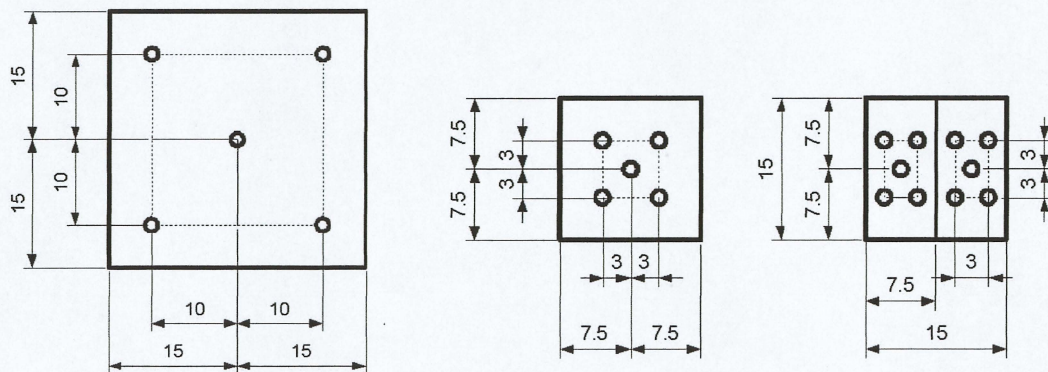


図 5.2 析出粒子測定箇所

5.2 画像処理法

画像は通常1画素の輝度を8ビット(0~255)の階調で表現しているが、その輝度を1ビット(0または1)の階調に変換することを2値化という。本研究では画像を2値化して析出粒子と背景に分離するため、その基準となるしきい値(0~255)を決める必要がある。しきい値の決定には、モード法(画像の濃度ヒストグラムを求めそのヒストグラムの谷を検出し、それをしきい値とする)や判別分析法(画像の濃度値の集合を2つのクラスに分割したと仮定したとき、2つのクラスの平均値の分散と各クラスの分散の比を最大にするようにしきい値を求める)などの自動2値化処理を利用することが一般的であるが、撮影した基板やマスク板の写真には酸化膜のむらがありまた材質によって酸化膜の状態にも差が表れる。そのため、福島⁽¹²⁾の考案した2値化方法を用いた。

5.2.1 2値化手順

RGB分離したRGB赤画像を、自身の画像同士で足し合わせる「加算」処理を行う。この処理は画像の特徴を明瞭化する働きがあり、結晶と結晶よりもやや薄いさびの部分のコントラストの差をより顕著にすることができる。通常はこの処理を2回行い特徴を明瞭化するが、試験片材料や酸化処理の有無等、試験条件により試験後の酸化膜の状態に違いが見られるため、この処理を1回行う。さらに、2値化画像を収縮した後膨張することで、不必要な像や像の突起部分を消去し、2値化粒子部分の元の大きさを保つ「オープニング」処理を行った。2値化前の画像、2値化した後の画像例を図5.3、図5.4に示す。2値化処理のフローチャートを図5.5に示す。

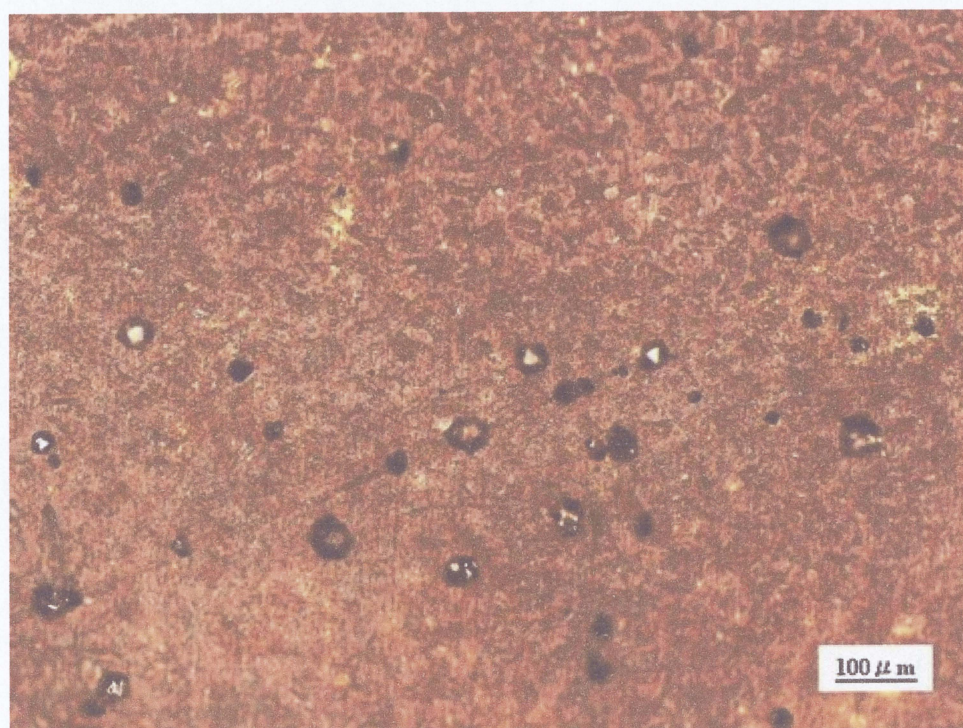


図 5.3 2値化前の無酸素銅の写真例



図 5.4 2 値化後の無酸素銅の写真例

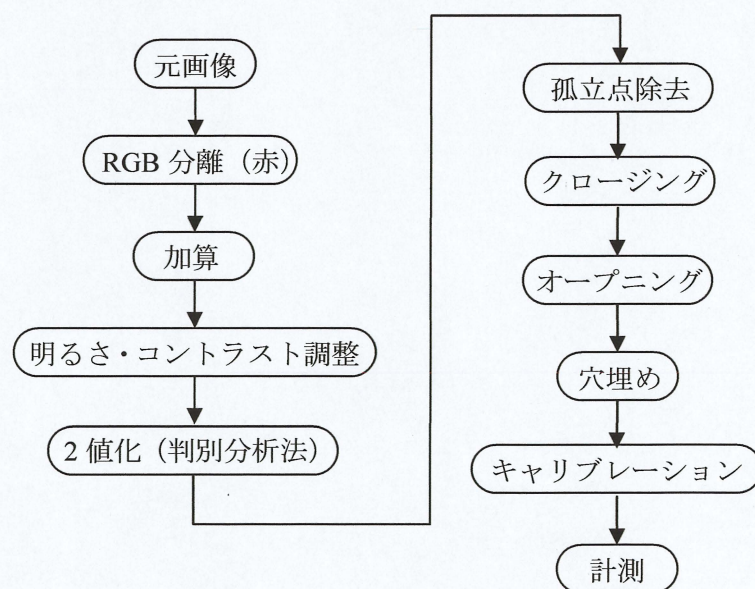


図 5.5 2 値化处理フローチャート

2 値化手順

- ① PC 上で WinROOF を起動する。
- ② 撮影した写真 1 枚を WinROOF に取り込む。取り込まれた画像を図 5.6 に示す。
- ③ メニュー「画像処理」の「RGB 分離」を実行し、写真を赤 (R)・緑 (G)・青 (B) の 3 成分のモノクロ画像に分離する。分離した赤のモノクロ画像を図 5.7 に示す。
- ④ 「編集」の「複製」を実行し、赤のモノクロ画像を複製する。
- ⑤ 「画像処理」の「演算」の中の「加算」を実行し、赤のモノクロ画像と複製した赤のモノクロ画像を加算する。複数回加算する場合は加算された画像にもう一度複製した赤のモノクロ画像を加算し、必要な回数だけ加算する。加算処理後の画像を図 5.8 に示す。
- ⑥ 「画像処理」の「強調」の中の「明るさ・コントラスト」を実行し、明るさ+10、コントラスト+70 に調節する。調節後の画像を図 5.9 に示す。
- ⑦ 「2 値処理」の「自動 2 値処理」を実行し、「条件設定」の「抽出領域の明暗」を「暗い領域」に、「対象濃度範囲」を「0~255」(全範囲)に設定する。「しきい値決定方法」の中から「判別分析法」を選び実行すると 2 値化される。図 5.10 に 2 値化した画像を示す。
- ⑧ 「2 値処理」の「孤立点除去」、「クロージング」(実行回数 1 回)、「オープニング」(実行回数 1 回)、「穴埋め」を順に実行する。画像処理後の画像を図 5.11 に示す。
- ⑨ 「環境」の「キャリブレーション」を実行し、1 画素あたりの実際の長さを登録、設定する。登録は 1 度行えば、2 回目以降は設定するだけでよい。
- ⑩ 「計測」の「形状特徴」を実行し、粒子数と粒子面積を測定する。

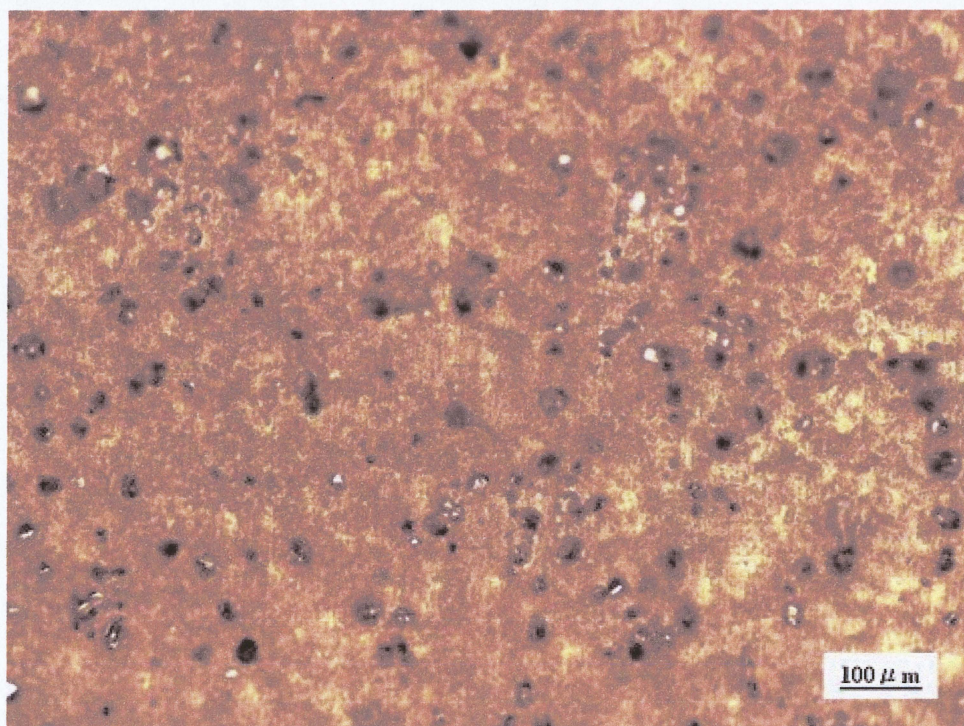


図 5.6 無酸素銅の元画像

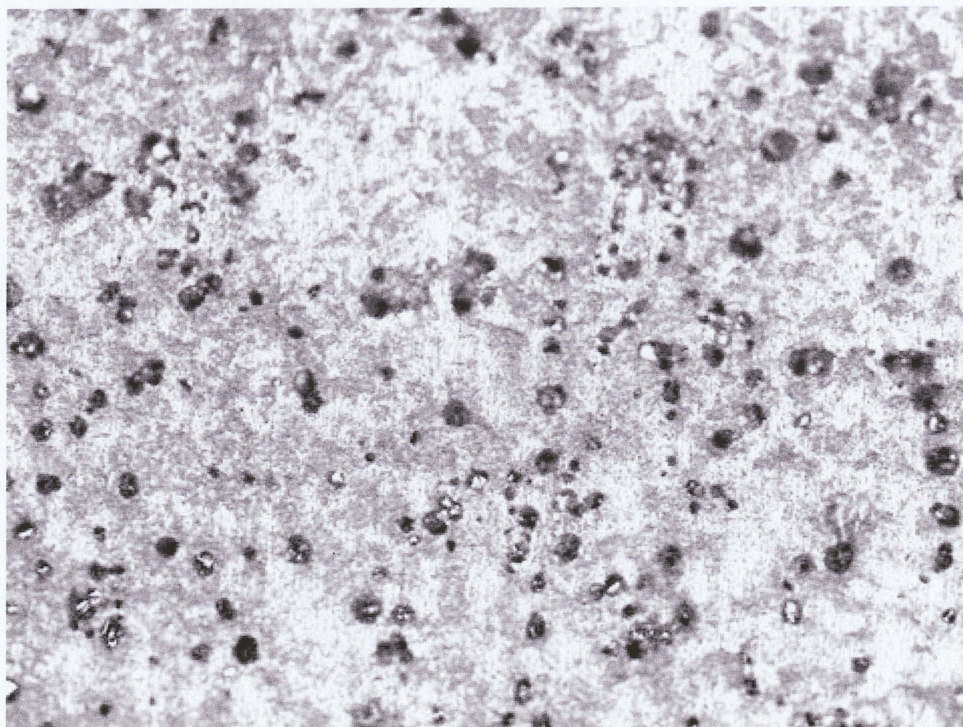


図 5.7 RGB 分離後の赤のモノクロ画像

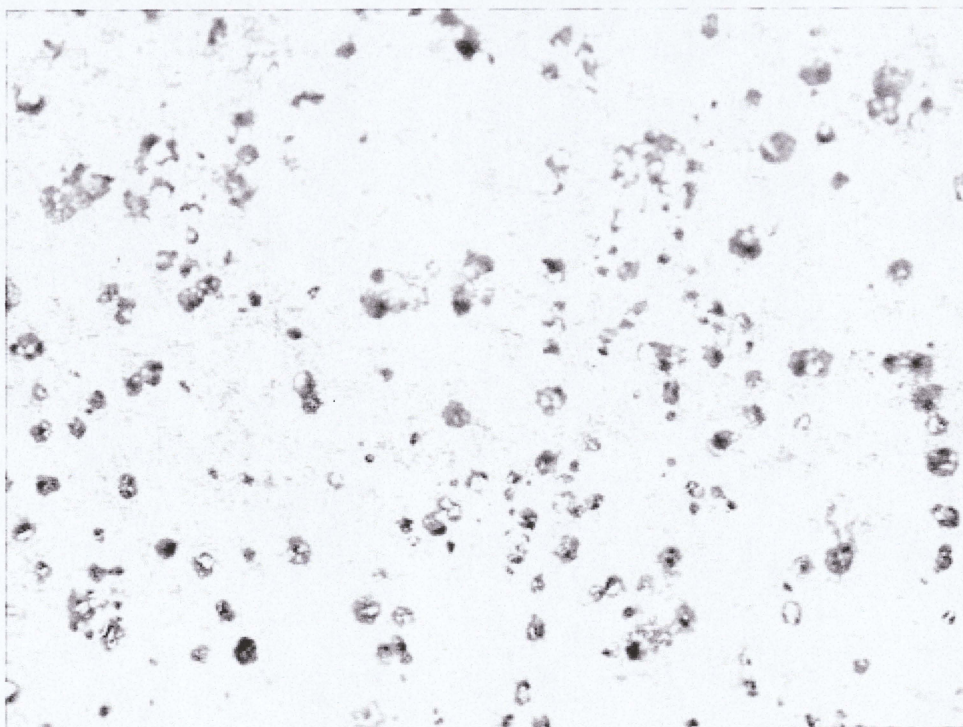


図 5.8 加算 1 回後の画像

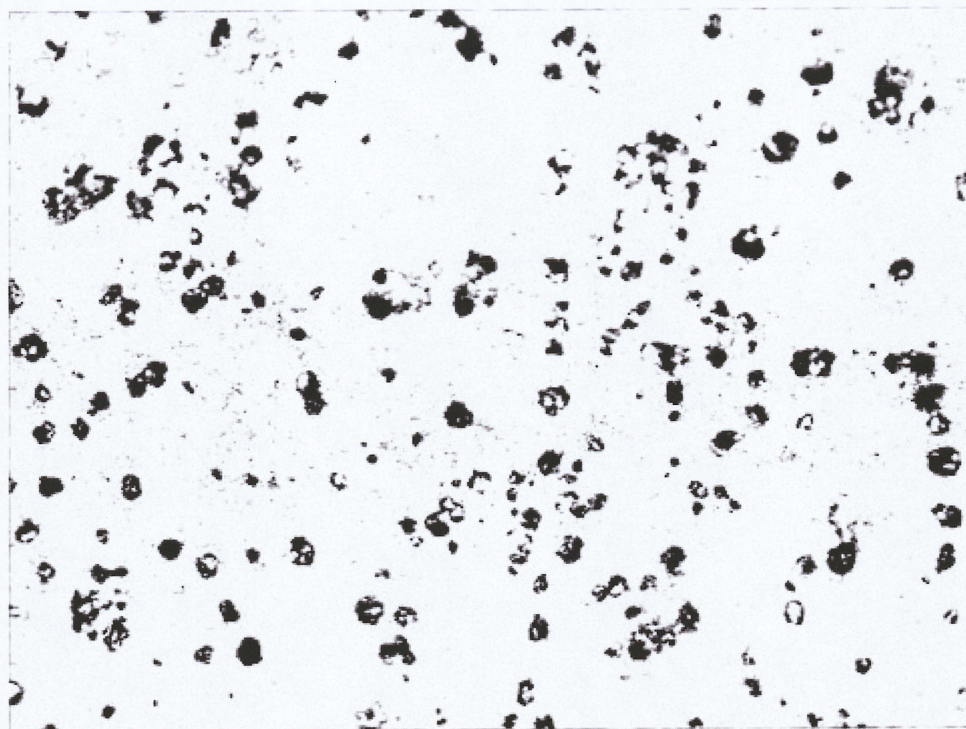


図 5.9 コントラスト調整後の画像

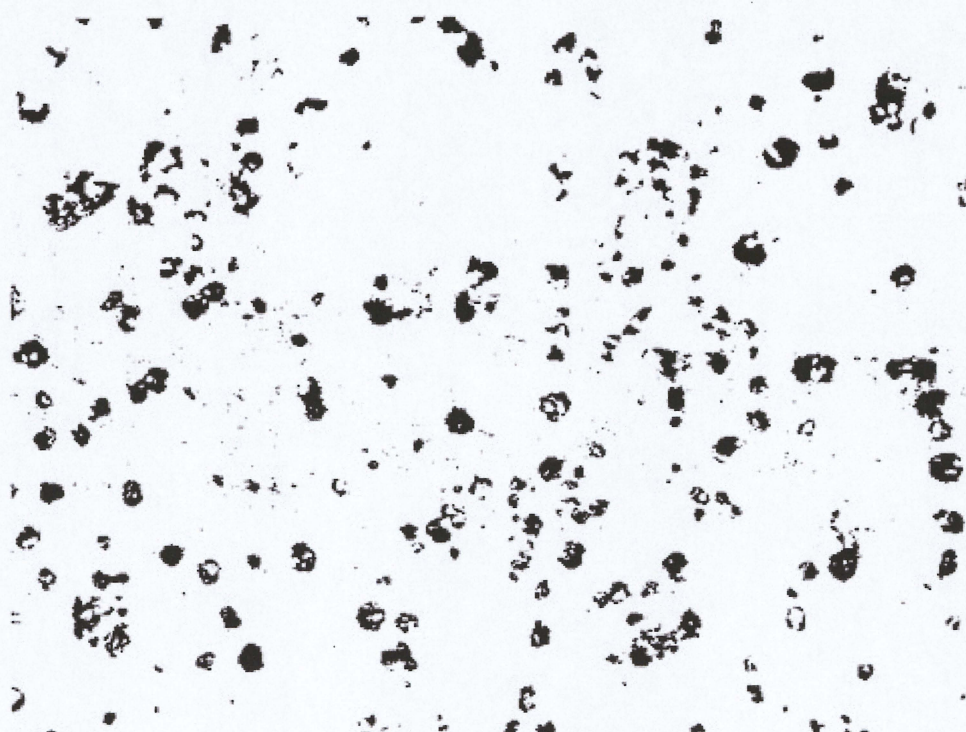


図 5.10 2 値化した画像 (判別分析法)



図 5.11 画像処理後の画像

5.2.2 フィルタの2値化

フィルタの撮影写真は、結晶からの反射光が強く各画像のしきい値に大きな差が生じてしまう。そのため、フィルタでは背景がほぼ白色一色になることを利用し、WinRoofの「自動選択ツール」を利用して結晶と背景の分離を行う。これは、指定した画像情報と似ている領域をWinRoofが自動的に認識し、輪郭を選択する機能である。この機能を使用して背景を選択すると、背景領域を自動的に選択するため、反転することで全結晶領域を選択することができる。計測には画像を2値化する必要があるため、選択した結晶領域をしきい値255(最大値)で2値化し、背景と分離した。フィルタの写真の例を図5.12に、2値化した画像の例を図5.13に示す。また、フィルタの画像処理のフローチャートを図5.14に示す。

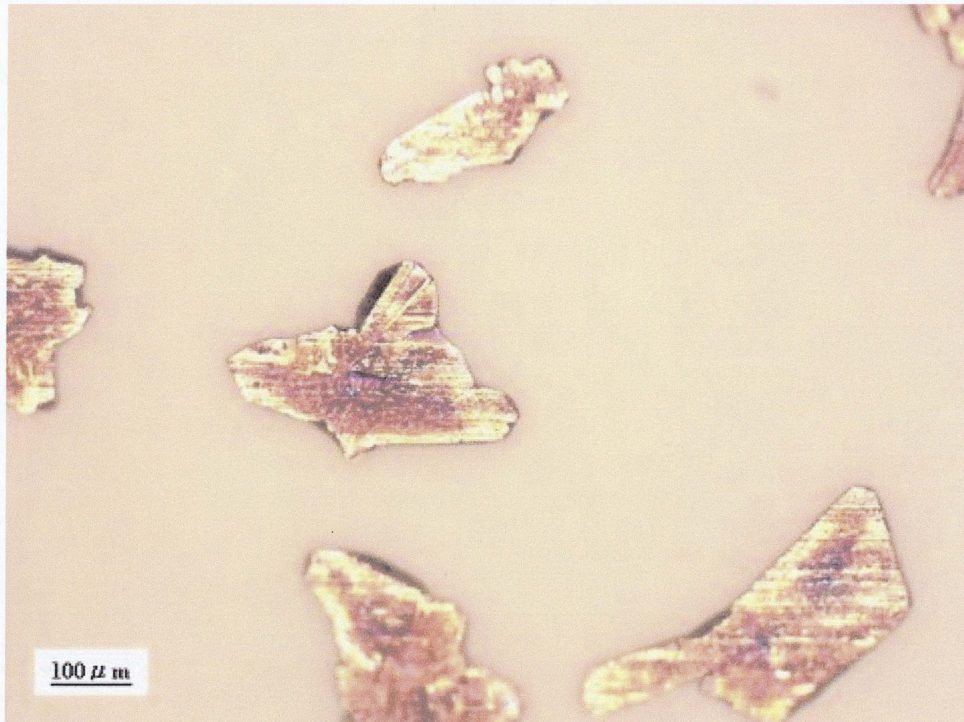


図 5.12 フィルタの写真の例

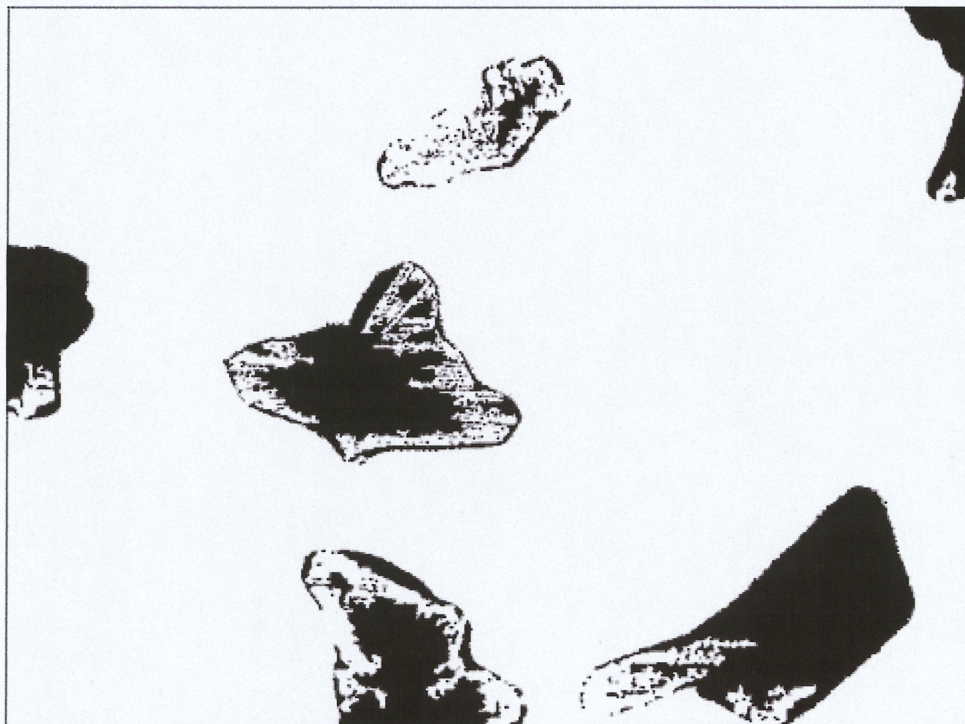


図 5.13 フィルタを 2 値化した画像

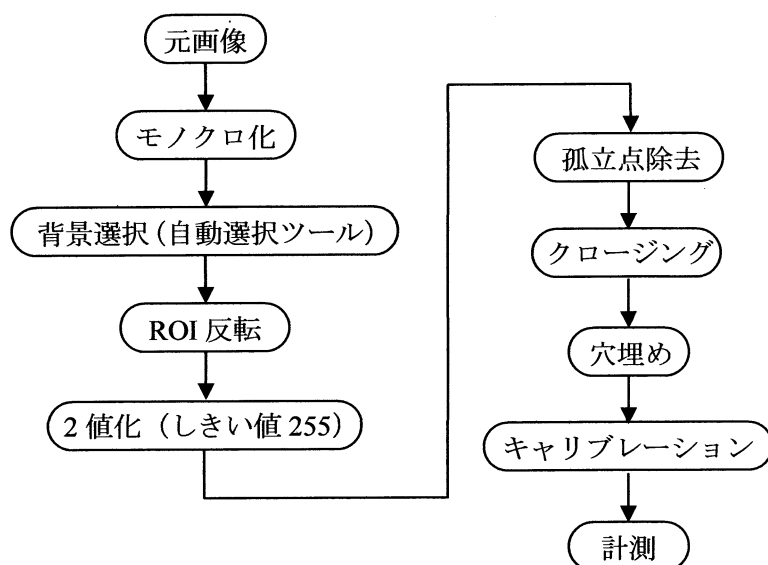


図 5.14 フィルタの画像処理フローチャート

フィルタの画像処理手順

- ① PC 上で WinROOF を起動する。
- ② 撮影した写真 1 枚を WinROOF に取り込む。取り込まれた画像を図 5.15 に示す。
- ③ メニュー「画像処理」の「モノクロ画像化」を実行し、写真をモノクロ化する。モノクロ画像を図 5.16 に示す。
- ④ 画像ツールバーにある「自動選択ツール」を利用し、背景部分をクリックする。結晶を除く背景部分が選択されるので、「環境」の「ROI を反転する」を実行し、結晶を選択する。図 5.17 に結晶を選択した画像を示す。
- ⑤ 「2 値処理」の「2 つのしきい値による 2 値化」を、しきい値 255 (0~255) に指定して実行する。図 5.18 に 2 値化した画像を示す。
- ⑥ 「2 値処理」の「孤立点除去」、「クロージング」(実行回数 1 回)、「穴埋め」を順に実行する。画像処理後の画像を図 5.19 に示す。
- ⑦ 「環境」の「キャリブレーション」を実行し、1 画素あたりの実際の長さを登録、設定する。登録は 1 度行えば、2 回目以降は設定するだけでよい。
- ⑧ 「計測」の「形状特徴」を実行し、粒子数と粒子面積を測定する。

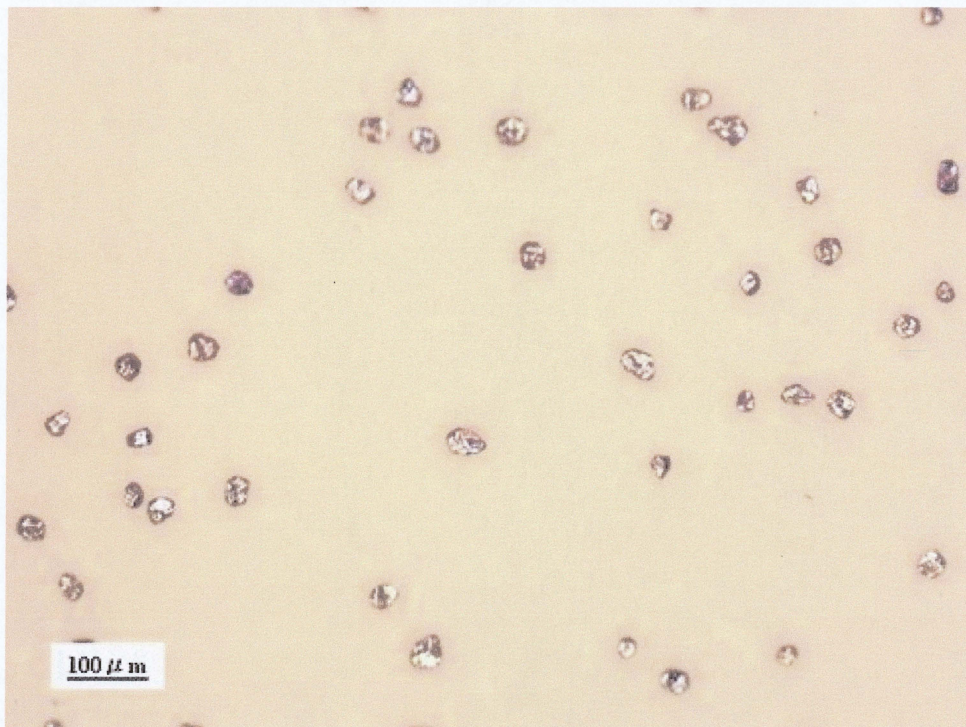


図 5.15 フィルタの元画像

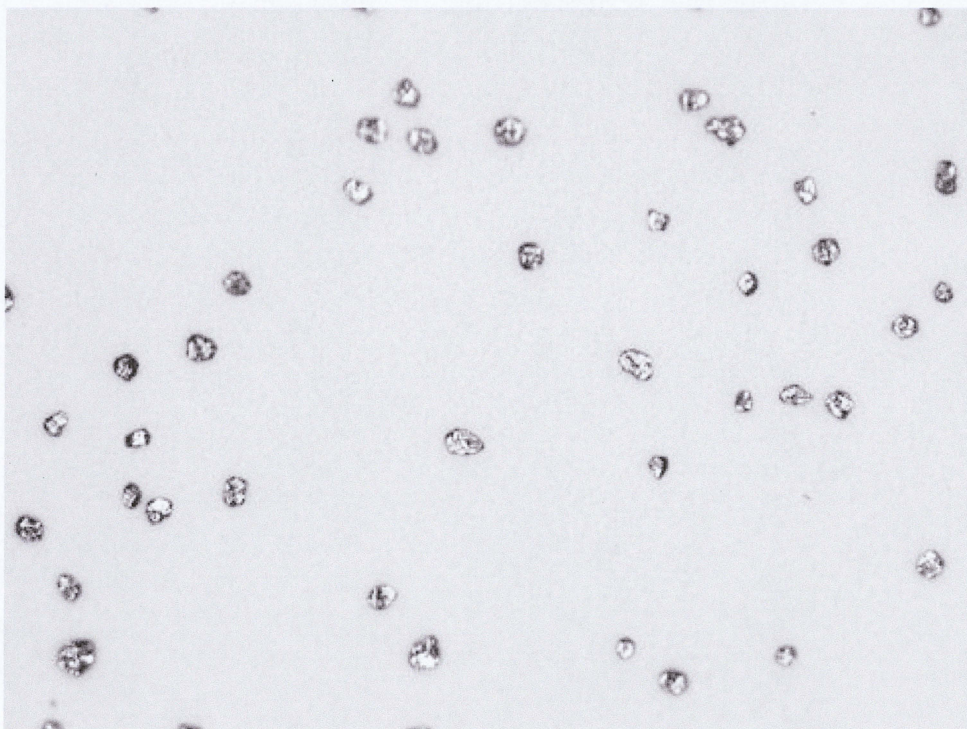


図 5.16 モノクロ画像

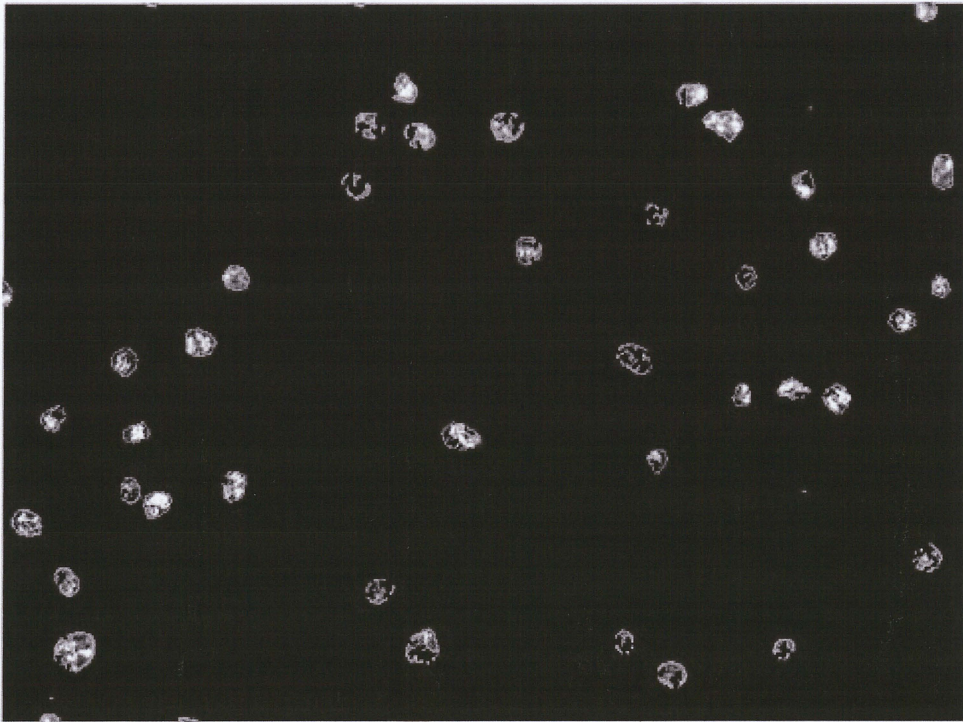


図 5.17 結晶選択画像

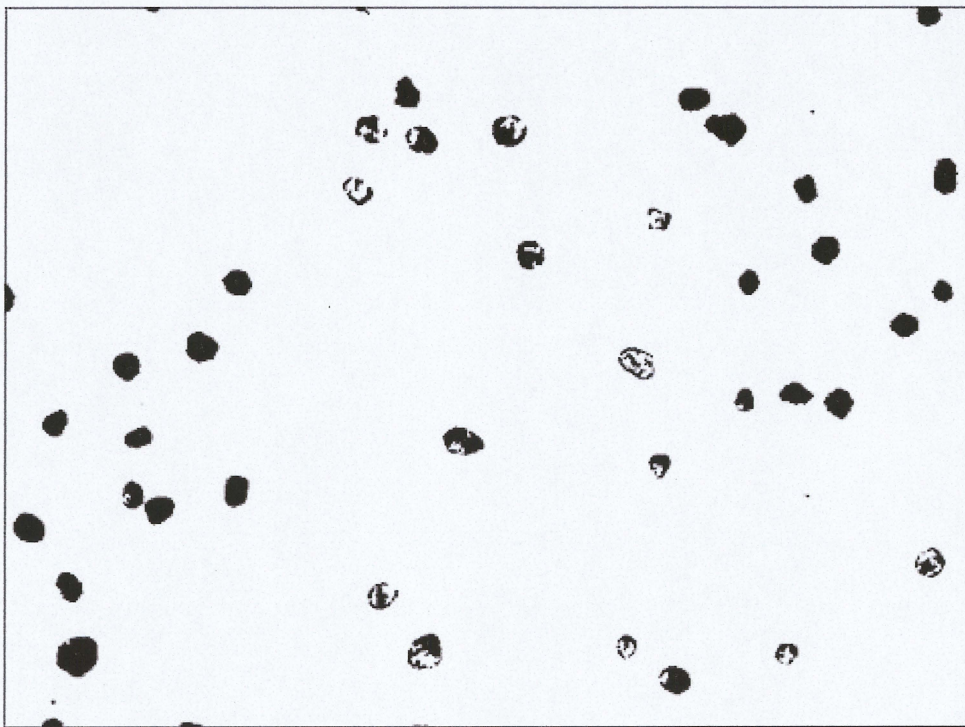


図 5.18 2 値化した画像

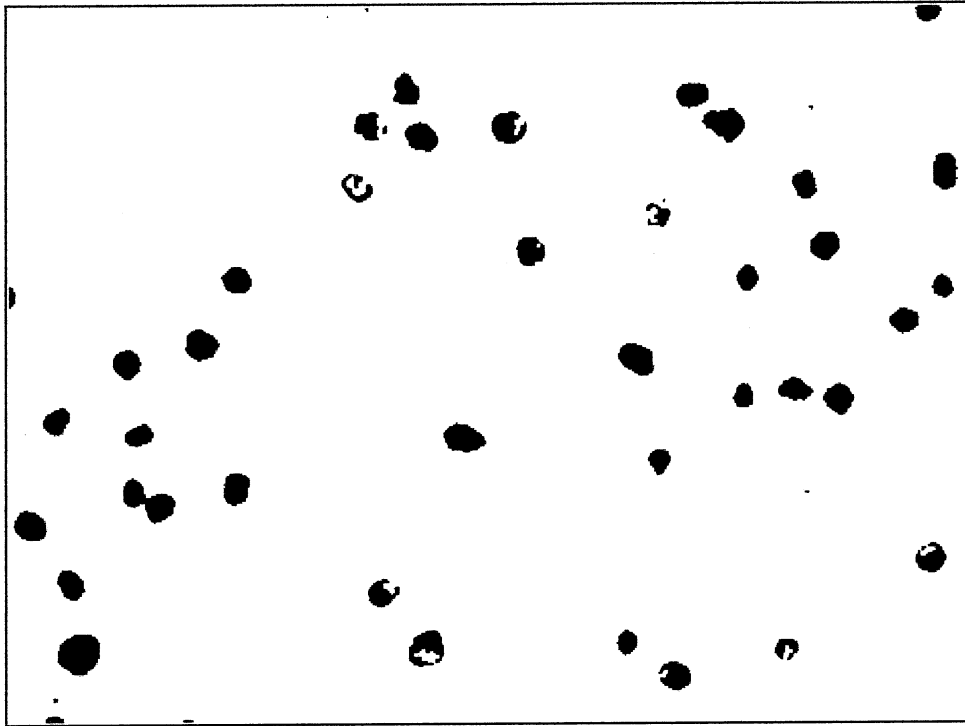


図 5.19 画像処理後の画像

第6章 実験結果および考察

6.1 基板酸化処理, クランプの影響

福島の研究⁽¹²⁾では, MBD が発現しないとされてきた無酸素銅の, 試験片サイズ $15 \times 15 \text{ mm}^2$ での試験でも試験条件によっては MBD が発現することが確認された. そのため本研究では従来から検討されている無酸素銅を用い, 試験片サイズ $15 \times 15 \text{ mm}^2$ において様々な試験条件のもと MBD 試験を行った.

6.1.1 80mL, $15 \times 15 \text{ mm}^2$ 酸化無クランプ無試験

基板に酸化処理を施さず, クランプをせず, 試験海水量を 80mL にすることで $15 \times 15 \text{ mm}^2$ の試験片サイズでも MBD が発現することが福島の研究で確認されている. そのため, MBD の再現性を確認するため, 本研究において標準試験となる以下の試験を行った. なお, 本実験では試験装置内に浸漬した状態で下側に位置するものを基板, 上側に位置するものをマスク板とする.

6.1.1.1 実験条件

試験片に $15 \times 15 \text{ mm}^2$ 無酸素銅を用い, 試験海水 80mL, 試験装置にはタグボックスを用意した. 基板およびフィルタの酸化・浸漬処理をタグボックス内で行い, 試験温度 (試験室内外気温) は室温とした. 試験期間は 2 週間から 5 週間とし, 同条件の試験片を 2 枚ずつ用意した. また, 各試験容器にはそれぞれ 1 枚ずつ試験片を浸漬した. 標準試験の試験条件を表 6.1 に示す. フィルタは全ての試験において 1 枚とした.

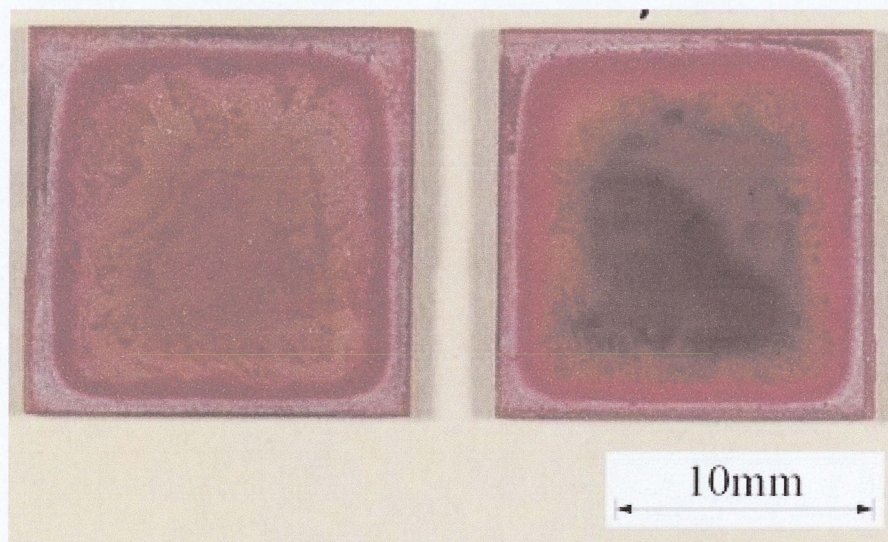
6.1.1.2 実験結果および考察

酸化処理無クランプ無試験(以後標準試験とする)の試験後の基板, マスク板の写真を図 6.1 に示す. 2～5 週間の試験の結果, ほとんどの試験において基板上に銅結晶粒子の析出が見られた. 基板上に見える小さな粒子が MBD により析出した銅結晶粒子である. 基板上に析出した銅粒子の金属顕微鏡写真の例を図 6.2 に示す.

析出粒子の評価法により測定した粒子面積および粒子数を図 6.3 に示す. これより 2 週間で析出し, おおむね試験期間に従って析出量が増えることがわかる.

表 6.1 80mL, $15 \times 15 \text{ mm}^2$ 酸化無クランプ無試験の試験条件

試験種別			基板酸化 処理条件		フィルタ 処理条件			試験条件	
試験記号	試験 海水	試験場所	酸化 温度	酸化 期間	枚数	浸漬 温度	浸漬 期間	試験 温度	試験 期間
CuCu-F15	有菌 海水	タグボッ クス内	—	—	1 枚	24.～ 25℃	5 日	24～ 28℃	2～5 週間



(a) 基板

(b) マスク板

図 6.1 標準試験後の試験片写真（試験期間 28 日）

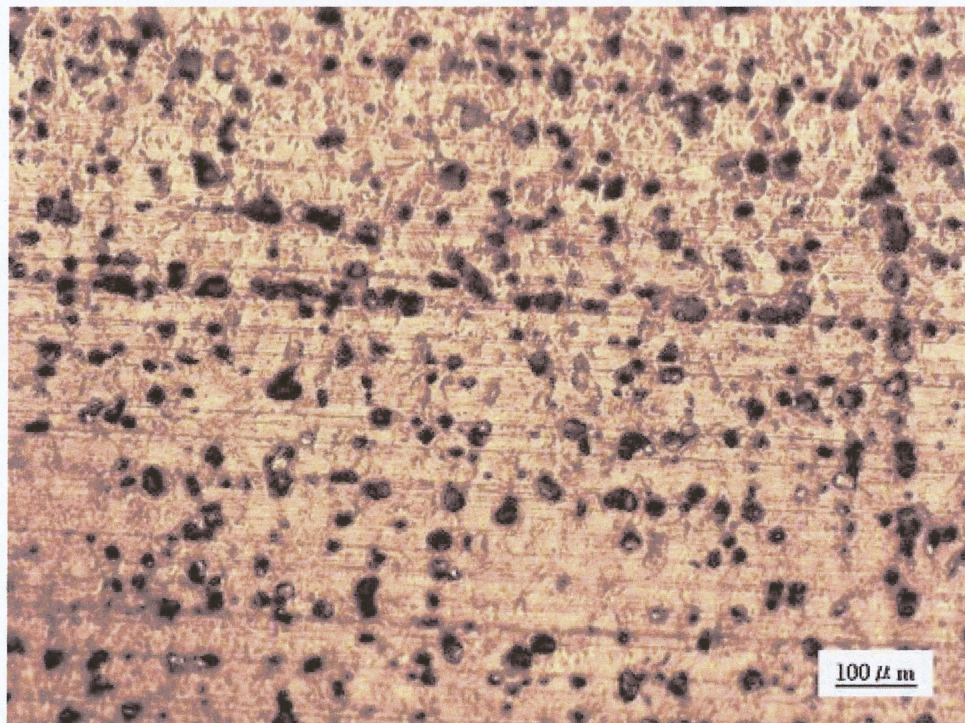


図 6.2 析出した銅結晶粒子の例（試験期間 28 日）

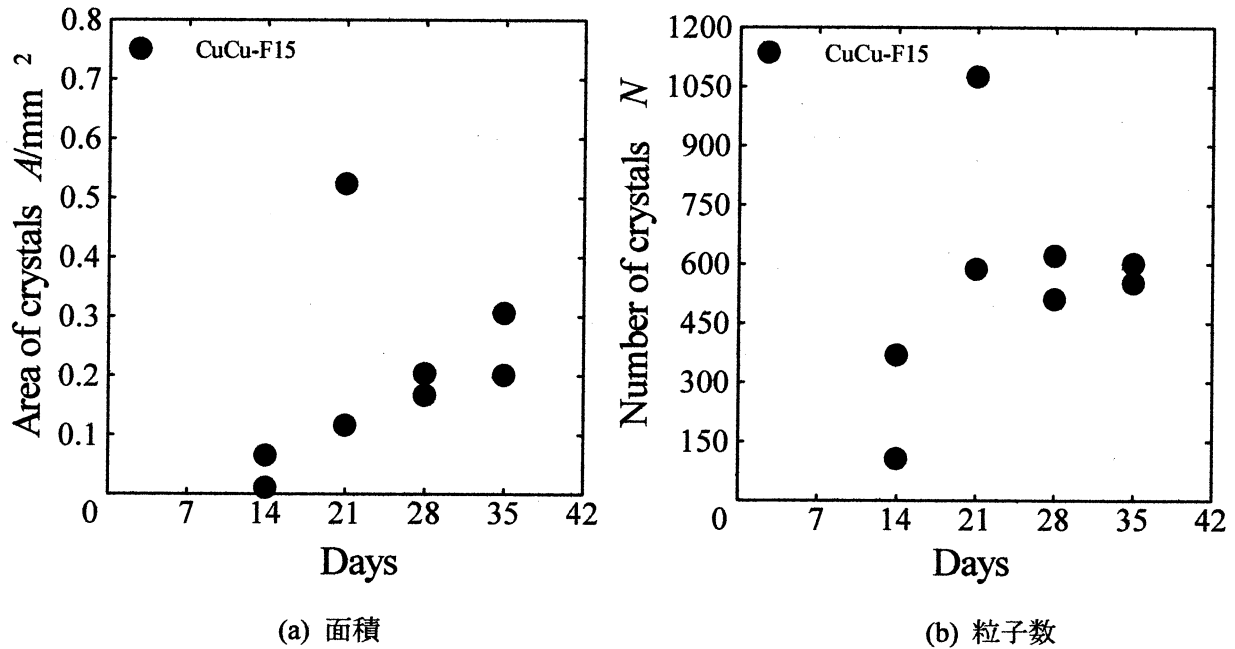


図 6.3 酸化処理無試験の粒子面積および粒子数

6.1.2 80mL, 15×15 mm² 酸化有クランプ有試験

6.1.2.1 実験条件

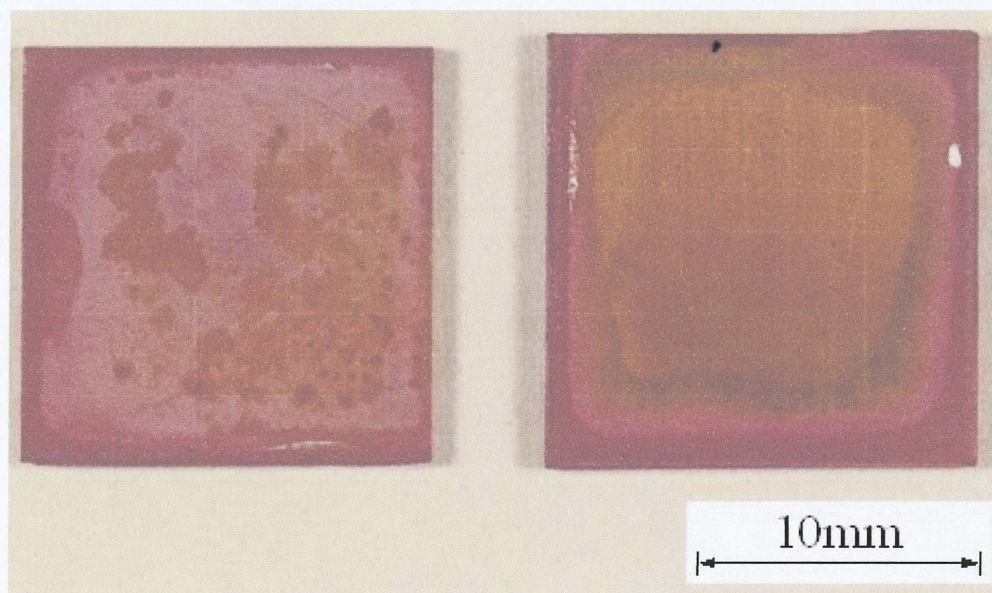
80mL, 15×15 mm² 酸化無クランプ無試験同様, 80mL, 15×15 mm² 酸化有クランプ有試験についても予備実験として福島⁽¹²⁾により研究されており, MBD は発現しないと報告されている. 本研究では標準試験と同時に行い, 析出量を比較した. フィルタ処理無試験および標準試験の試験条件をまとめたものを表 6.2 に示す.

6.1.2.2 実験結果および考察

15×15 mm² 酸化有クランプ有試験後の試験片の写真を図 6.4 に示し, 測定した粒子面積および粒子数を図 6.5 に示す. 2~5 週間の試験の結果, 酸化有クランプ有試験では析出がみられず, 同時に行った標準試験では 3 週目以降すべての試験において基板上に銅結晶粒子の析出が見られた. 15×15 mm² 試験片における試験では酸化処理, クランプの片方もしくは両方が MBD 発現の阻害要因になっていることがわかる.

表 6.2 80mL, 15×15 mm² 酸化有クランプ有試験の試験条件

試験種別			基板酸化 処理条件		フィルタ 処理条件			試験条件	
試験記号	試験 海水	試験場所	酸化 温度	酸化 期間	枚数	浸漬 温度	浸漬 期間	試験 温度	試験 期間
Cu(O)Cu-FC15	有菌 海水	タグボッ クス内	24～ 25℃	1 日	1 枚	24～ 25℃	5 日	24～ 28℃	2～5 週間
CuCu-F15	有菌 海水	タグボッ クス内	—	—	1 枚	24～ 25℃	5 日	24～ 28℃	2～5 週間



(a) 基板

(b) マスク板

図 6.4 15×15 mm² 酸化有クランプ有試験後の試験片写真 (試験期間 28 日)

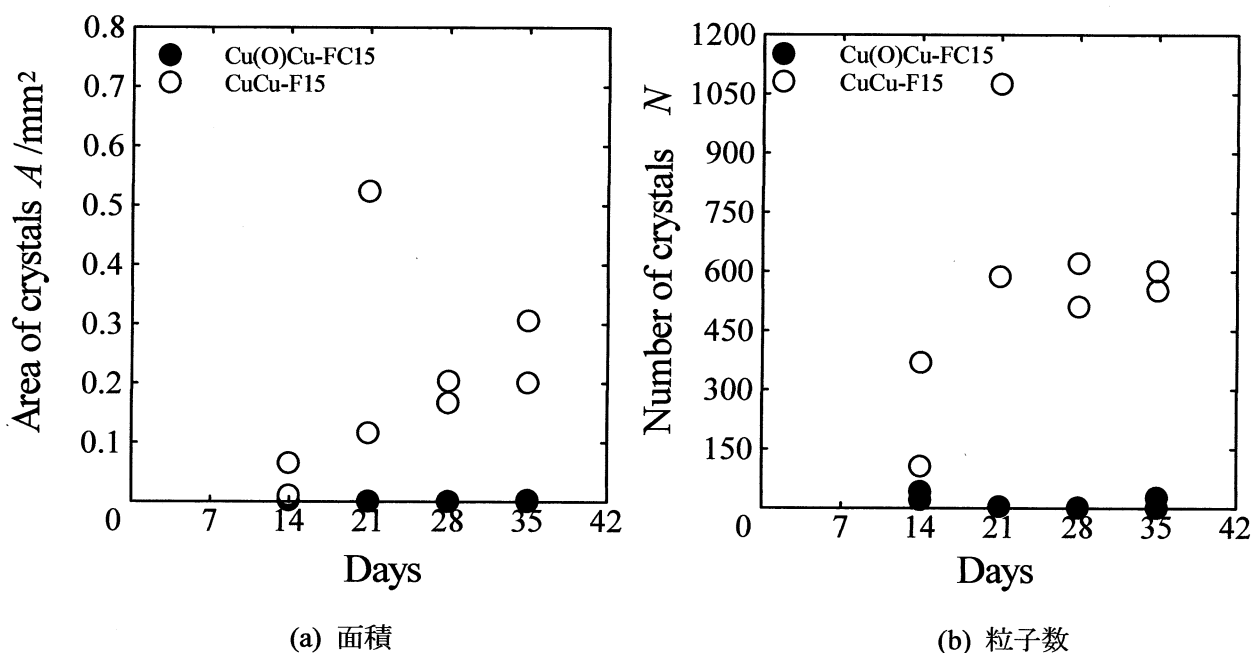


図 6.5 $15 \times 15 \text{ mm}^2$ 酸化有クランプ有試験の粒子面積および粒子数

6.1.3 80mL, $15 \times 15 \text{ mm}^2$ 酸化無クランプ有試験

6.1.3.1 実験条件

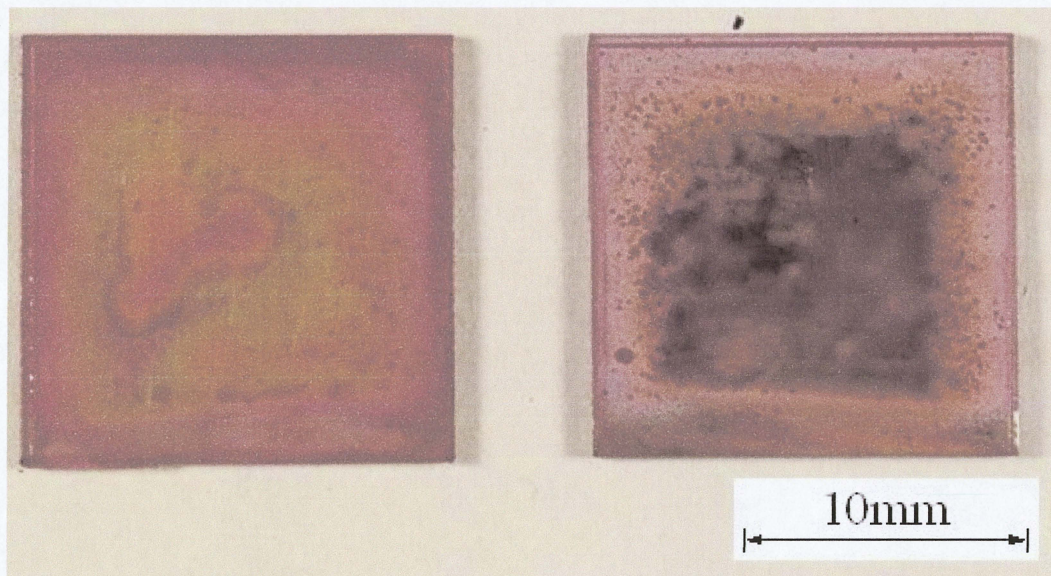
試験海水 80mL における酸化処理無クランプ無試験と酸化処理有クランプ有試験を個別に検討した結果、酸化処理有クランプ有試験では MBD が発現しないことがわかった。ここでは、酸化処理無クランプ有の条件で MBD 試験を検討する。

6.1.3.2 実験結果および考察

$15 \times 15 \text{ mm}^2$ 酸化無クランプ有試験後の試験片の写真を図 6.6 に示す。2～5 週間の試験の結果、酸化無クランプ有試験では析出がないことがわかった。また、同時期に行った $15 \times 15 \text{ mm}^2$ 酸化無クランプ無試験においては析出がみられたため、 $15 \times 15 \text{ mm}^2$ 試験片における試験ではクランプが MBD 発現の阻害要因になっていることがわかった。これは、クランプをすることで基板とマスク板が密着しすぎ丁度良い嫌気条件でなくなってしまうと考えられる。

表 6.3 80mL, 15×15 mm² 酸化無クランプ有試験の試験条件

試験種別			基板酸化 処理条件		フィルタ 処理条件			試験条件	
試験記号	試験 海水	試験場所	酸化 温度	酸化 期間	枚数	浸漬 温度	浸漬 期間	試験 温度	試験 期間
CuCu-FC15	有菌 海水	タグボッ クス内	—	—	1 枚	26.5～ 27.5℃	5 日	22～ 27℃	2～5 週間
CuCu-F15	有菌 海水	タグボッ クス内	—	—	1 枚	26.5～ 27.5℃	5 日	22～ 27℃	2～5 週間



(a) 基板

(b) マスク板

図 6.6 15×15 mm² 酸化無クランプ有試験後の試験片写真（試験期間 21 日）

6.1.4 80mL, 15×15 mm² 酸化有クランプ無試験

6.1.4.1 実験条件

酸化処理有クランプ有試験では MBD が発現しないことがわかっているため，ここでは酸化処理有，クランプ無の条件での MBD 試験を試みた．前述において，酸化処理無，クランプ有試験においても MBD が発現しないことがわかったため，この実験によって酸化処理が阻害要因になっているのが確認できる．80mL, 15×15 mm² 酸化有クランプ無試験の試験条件を表 6.4 にまとめる．

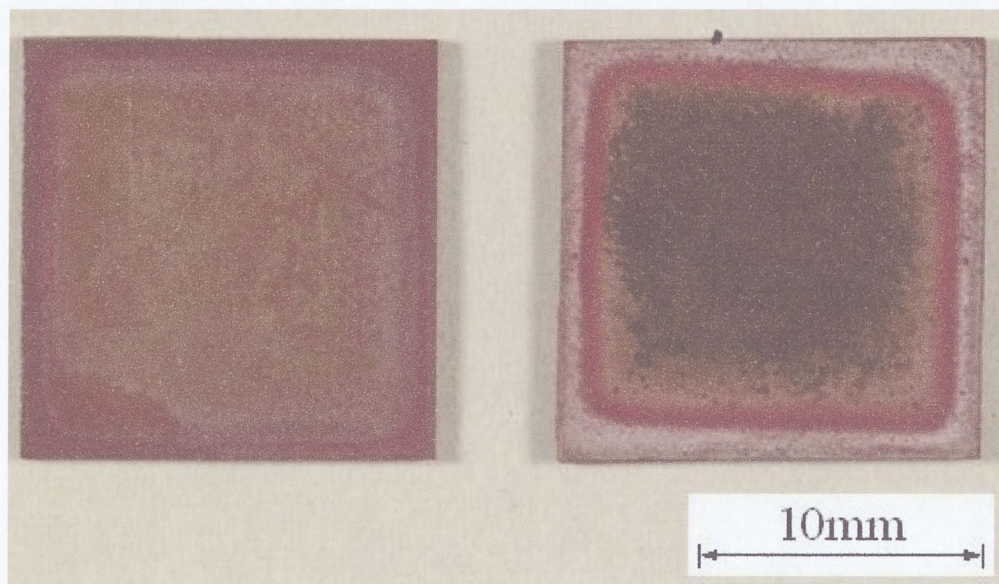
6.1.4.2 実験結果および考察

15×15 mm² 酸化有クランプ無試験の試験片の写真を図 6.7 に示し，測定した粒子面積および粒子数を図 6.8 に示す．3～5 週間の試験の結果 15×15 mm² 酸化有クランプ無試験では析出はみられないが，15

×15 mm² 酸化無クランプ無試験では析出がみられた。そのため、15×15 mm² 試験片における試験では基板酸化処理も MBD 発現の阻害要因であることがわかった。よって、前述の結果も含め 15×15 mm² 試験片における試験では酸化処理、クランプが阻害要因になっていることが確認できた。酸化処理に関して R. F. Decker⁽¹⁷⁾ は微生物がイオンを定着させるような酵素を分泌してイオンを着床しやすいように表面を改善すると指摘している。基板酸化処理を行うことは好気性微生物による表面改善を行うことになり、このことが逆に嫌気性微生物による表面改善の阻害になり、MBD の発現を阻害したのではないかと考えられる。

表 6.4 80mL, 15×15 mm² 酸化有クランプ無試験の試験条件

試験種別			基板酸化 処理条件		フィルタ 処理条件			試験条件	
試験記号	試験 海水	試験場所	酸化 温度	酸化 期間	枚数	浸漬 温度	浸漬 期間	試験 温度	試験 期間
Cu(O)Cu-F15	有菌 海水	タグボッ クス内	21～ 27.5℃	1 日	1 枚	26.5～ 27.5℃	5 日	22～ 27℃	3～5 週間



(a) 基板

(b) マスク板

図 6.7 15×15 mm² 酸化有クランプ無試験後の試験片写真 (試験期間 28 日)

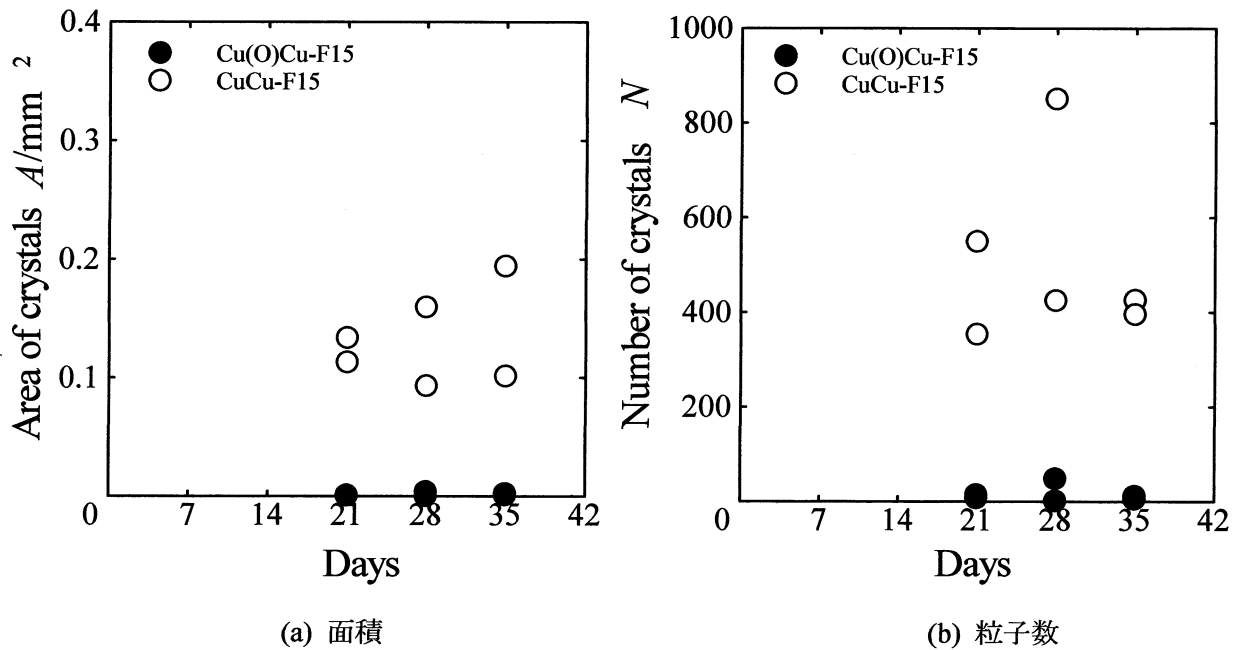


図 6.8 15×15 mm² 酸化有クランプ無試験の粒子面積および粒子数

6.2 400mL 試験

6.2.1 実験条件

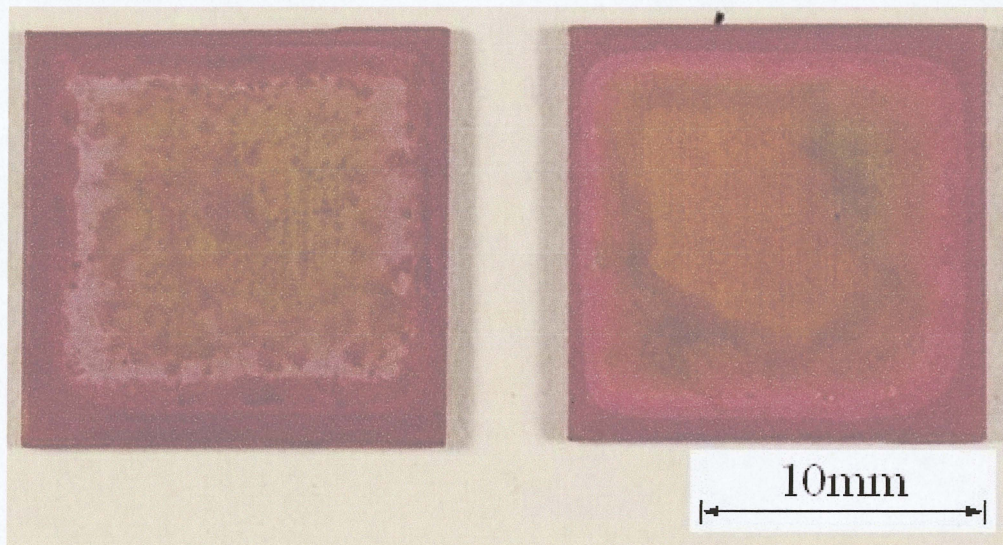
試験片サイズ 15×15 mm²での試験では試験海水 80mL, 酸化処理無, クランプ無にすることで MBD が発現することは確認された. そのため本実験では使用する海水の量のみを 400mL に変更し試験を行った. 400mL 試験の試験条件を表 6.5 にまとめる.

6.2.2 実験結果および考察

400mL 試験後の試験片写真を図 6.9 に示し, 測定した銅イオン濃度を図 6.10 に示す. 2~5 週間の試験の結果, 400mL 試験では析出はみられず, 同時に行った標準試験(試験海水 80mL)では 3 週目に銅結晶粒子の析出が見られた. また 400mL 試験, 標準試験の pH, 溶存酸素には大きな差がないため, 試験片サイズ 15×15 mm²での試験においては試験海水量が析出に影響していることがわかった. 試験海水量 400mL の試験はすべての期間において標準試験よりもイオン濃度が低いため, イオン濃度が MBD 発現に関与していると考えられる.

表 6.5 400mL 試験の試験条件

試験種別			基板酸化 処理条件		フィルタ 処理条件			試験条件	
試験記号	試験 海水	試験場所	酸化 温度	酸化 期間	枚数	浸漬 温度	浸漬 期間	試験 温度	試験 期間
CuCu-F15 400mL sea water	有菌 海水	タグボッ クス内	—	—	1 枚	23～ 27℃	5 日	23～ 27℃	2～5 週間
CuCu-F15	有菌 海水	タグボッ クス内	—	—	1 枚	23～ 27℃	5 日	23～ 27℃	2～5 週間



(a) 基板

(b) マスク板

図 6.9 400mL 試験後の試験片写真 (試験期間 21 日)

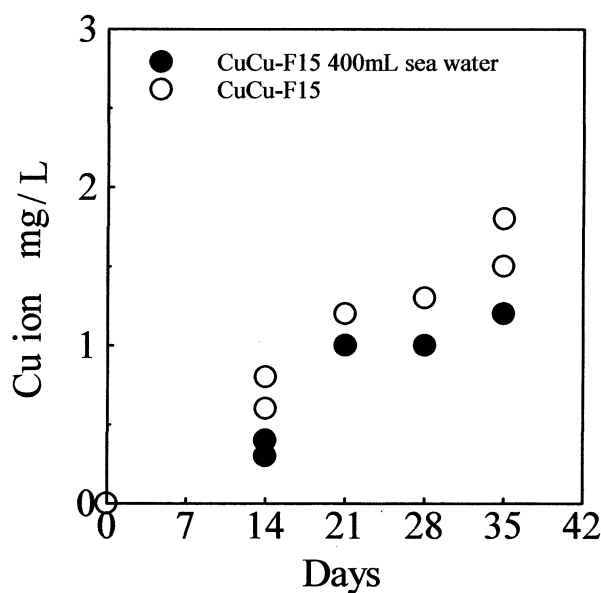


図 6.10 400mL 試験の銅イオン濃度

6.3 微生物作用の確認

6.3.1 滅菌試験

微生物作用を確認するため、滅菌試験を行った。無酸素銅 $30 \times 30 \text{ mm}^2$ では滅菌試験によってほぼ析出しなくなることが報告されているため、今回は無酸素銅 $15 \times 15 \text{ mm}^2$ においてもその効果が得られるかどうかを検証する。試験片や海水、試験器具等をすべて滅菌し、クリーンベンチ内で試験を行った。

6.3.2 実験条件

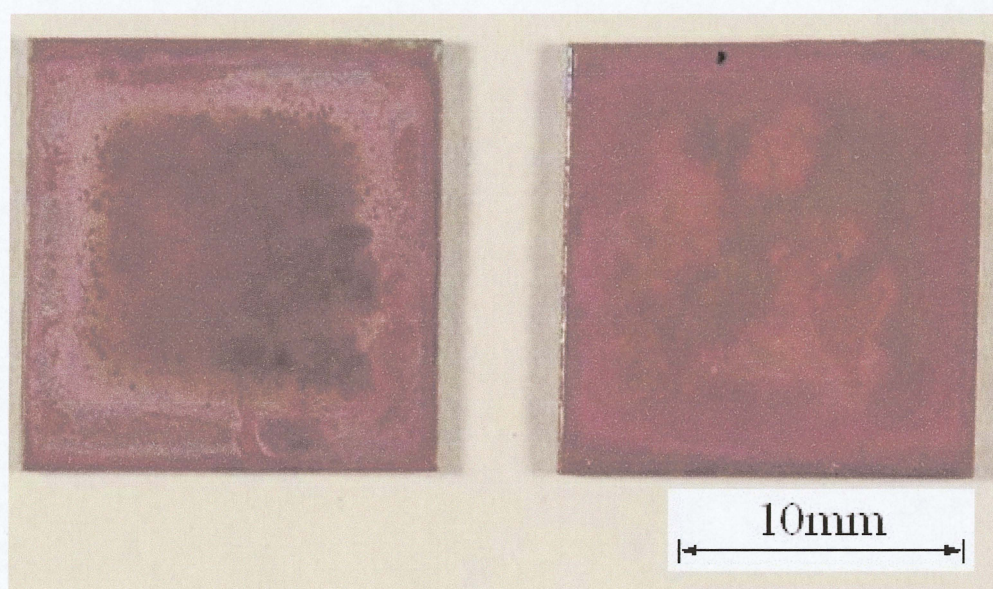
標準試験条件と酸化処理有、クランプ有試験条件における滅菌試験を行った。その際の試験条件をまとめたものを表 6.6 に示す。

6.3.3 実験結果および考察

滅菌試験後の標準試験片写真を図 6.11、酸化有クランプ有試験片を図 6.12 に示す。2～5 週間の試験の結果、どの試験片からも析出は見られなかった。よって、MBD の発現には微生物が関与していると思われる。

表 6.6 滅菌試験の試験条件

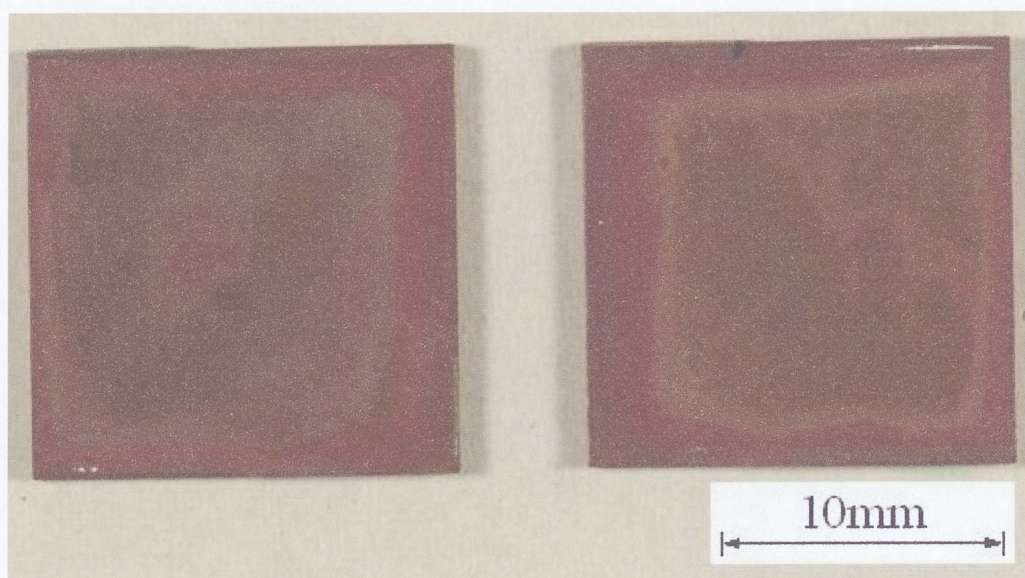
試験種別			基板酸化 処理条件		フィルタ 処理条件			試験条件	
試験記号	試験 海水	試験場所	酸化 温度	酸化 期間	枚数	浸漬 温度	浸漬 期間	試験 温度	試験 期間
CuCu-F15	滅菌 海水	クリーン ベンチ内	—	—	1 枚	33～ 35℃	5 日	33～ 35℃	2～5 週間
Cu(O)Cu-FC15	滅菌 海水	クリーン ベンチ内	33～ 34℃	1 日	1 枚	33～ 35℃	5 日	33～ 35℃	2～5 週間



(a) 基板

(b) マスク板

図 6.11 滅菌標準試験後の試験片写真（試験期間 28 日）



(a) 基板

(b) マスク板

図 6.12 滅菌酸化有クランプ有試験後の試験片写真（試験期間 28 日）

6.4 銅イオン濃度の影響

過去の研究で、あらかじめ海水に銅板を浸漬しておき、通常よりも銅イオンを多く含む環境下で試験する促進法（Cu イオンの環境）が報告されている⁽⁹⁾。また、試験片サイズ $15 \times 15 \text{ mm}^2$ の実験では試験海水量 80mL、酸化処理無、クランプ無の条件でのみ MBD が発現するという結果から、試験海水中に含まれる銅イオン濃度が析出に関係しているのではないかと考え、海水中的銅イオン濃度を变化させて実験を行った。

6.4.1 実験条件

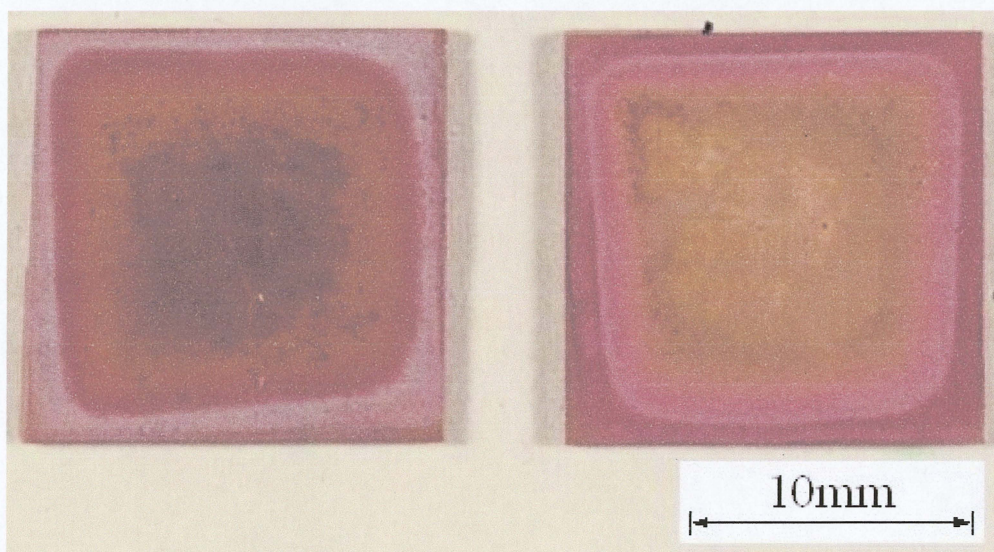
$30 \times 30 \text{ mm}^2$ の銅板をビーカーの底に 10 枚重ねた状態で 5 日間浸漬した 400mL 海水、また同様にしてイオンを高めた海水を 80mL に小分けしたもので実験を行った。銅板浸漬後の海水はパックテストで銅イオン濃度を測定した。銅イオン濃度は通常の海水は 0 mgCu/L 、10 枚重ねた状態で 5 日間浸漬した海水は $4 \sim 6 \text{ mgCu/L}$ であった。試験期間は 2～5 週間とし、試験水以外の条件は有菌試験（タグボックス内）と同じである。試験条件を表 6.7 に示す。

6.4.2 実験結果および考察

銅イオン濃度試験後の試験片写真を図 6.13, 図 6.14 に示し、測定した粒子面積および粒子数を図 6.15, 図 6.16 に示す。試験海水量 400mL での標準試験では銅結晶粒子の析出がみられなかったが、銅イオン濃度を高めることで試験海水量 400mL においても銅微粒子を析出させることが可能だとわかる。また試験海水量 80mL において同時期に銅イオン濃度を高めた試験、標準試験を行い比較をしたが大きな違いはみられない。よって、銅イオン濃度を高めることで試験片サイズ $15 \times 15 \text{ mm}^2$ 、試験海水量が 400mL であっても MBD が発現することが確認された。しかし試験海水量 80mL においては銅イオン濃度による促進効果はみられなかった。

表 6.7 銅イオン濃度試験の試験条件

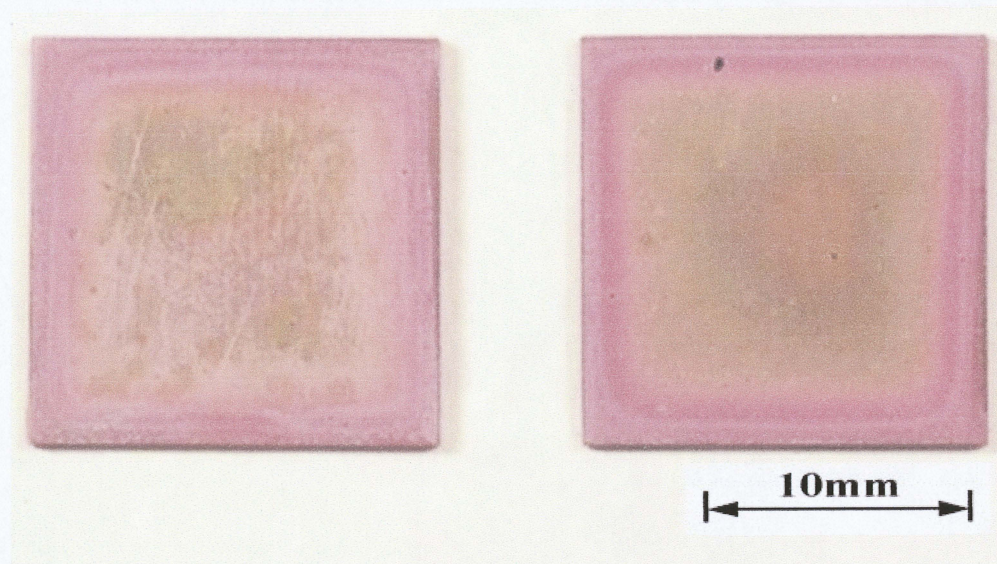
試験種別			基板酸化 処理条件		フィルタ 処理条件			試験条件	
試験記号	試験 海水	試験場所	酸化 温度	酸化 期間	枚数	浸漬温 度	浸漬期 間	試験 温度	試験 期間
CuCu-FC15(ion) 400mL sea water	有菌 海水	タグボッ クス内	—	—	1 枚	20～ 22℃	5 日	20.5～ 24℃	2～5 週間
CuCu-FC15(ion)	有菌 海水	タグボッ クス内	—	—	1 枚	25～ 27℃	5 日	25～ 27.5℃	2～4 週間
CuCu-F15	有菌 海水	タグボッ クス内	—	—	1 枚	26～ 28℃	5 日	26～ 27℃	2～4 週間



(a) 基板

(b) マスク板

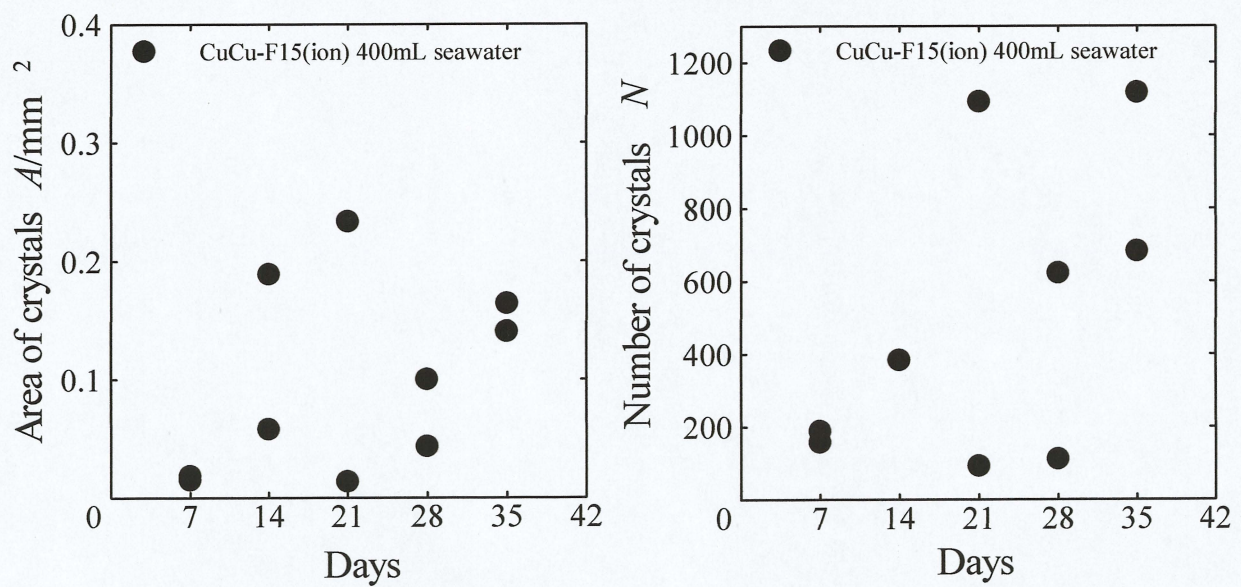
図 6.13 銅イオン濃度試験(400mL)後の試験片写真 (CuCu-F15(ion), 試験期間 28 日)



(a) 基板

(b) マスク板

図 6.14 銅イオン濃度試験(80mL)後の試験片写真 (CuCu-F15(ion), 試験期間 28 日)



(a) 面積

(b) 粒子数

図 6.15 銅イオン濃度試験(400mL)の粒子面積および粒子数

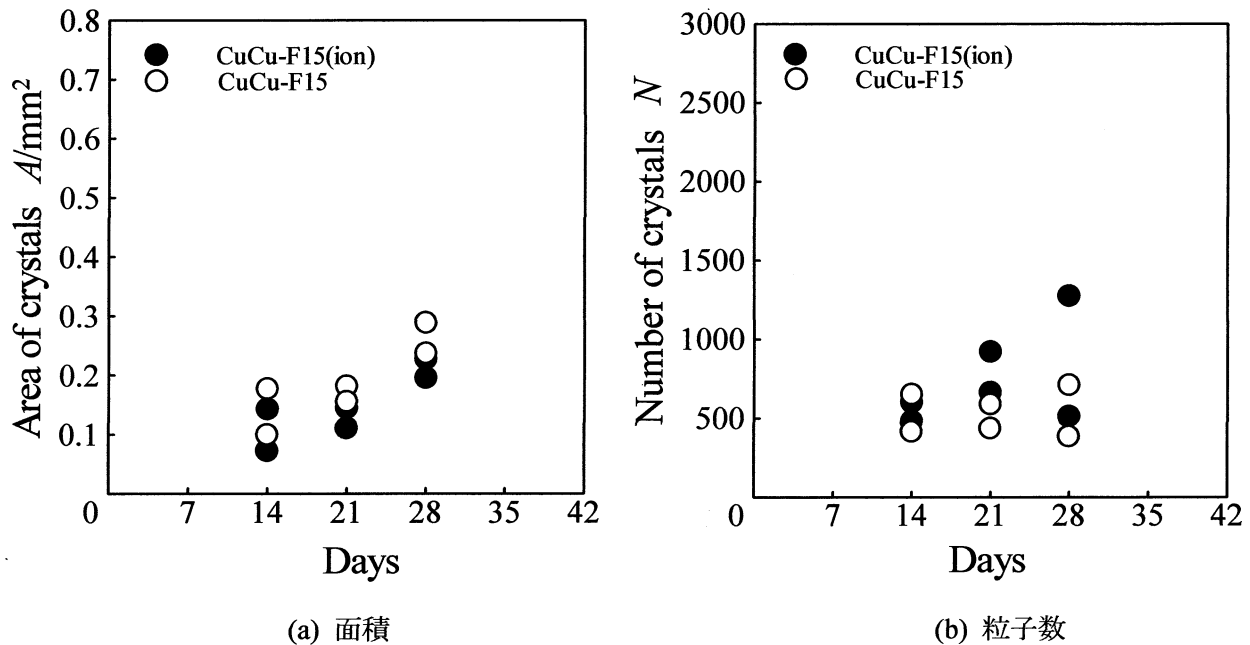


図 6.16 銅イオン濃度試験(80mL)の粒子面積および粒子数

6.5 試験片の表面状態の影響

6.5.1 実験条件

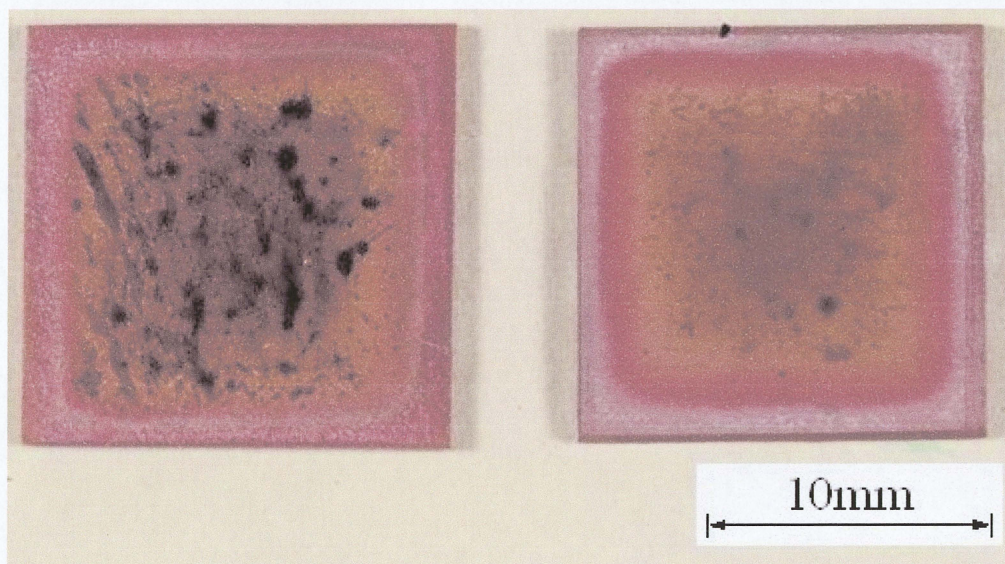
平均粒径 $1\mu\text{m}$ および $0.05\mu\text{m}$ のアルミナ砥粒でバフ研磨を行い、鏡面に仕上げたものと #240 サンドペーパーで荒らしたものを用意し、実験を行った。それぞれの基板表面の表面粗さは $R_z=0.04\mu\text{m}$, $0.05\mu\text{m}$ および $3\mu\text{m}$ である。それぞれの試験条件は表面粗さ以外、標準試験と同じとする。表面状態の影響試験の試験条件を表 6.8 にまとめる。

6.5.2 実験結果および考察

表面粗さ $0.04\mu\text{m}$, $0.05\mu\text{m}$ の試験の試験片の写真を図 6.17, 図 6.18 に示し、測定した粒子面積および粒子数を図 6.19, 図 6.20 に示す。2~5 週間の試験の結果、基板表面粗さ $0.04\mu\text{m}$ での試験、同時に行った標準試験では MBD が発現し、基板表面粗さ $3\mu\text{m}$ での試験では発現しなかった。表面粗さ $0.04\mu\text{m}$ の試験においては 2 週目に、標準試験では 4 週目に片方の基板から銅結晶粒子の析出がみられる。以上の結果から基板表面を研磨し、きれいにすることで今回の実験のように標準試験で MBD が発現しにくい条件であっても、問題なく銅結晶粒子を析出させることができることがわかった。基板研磨をして表面をきれいにすることにより基板表面が一様になることで、微生物による表面改善が行いやすくなり、析出環境が整ったと考えられる。また 2~4 週間行った基板表面粗さ $0.05\mu\text{m}$ での試験においても基板表面粗さ $0.04\mu\text{m}$ と同様に析出がみられたため、研磨試験の簡易化に有効であることがわかった。

表 6.8 表面状態の影響試験の試験条件

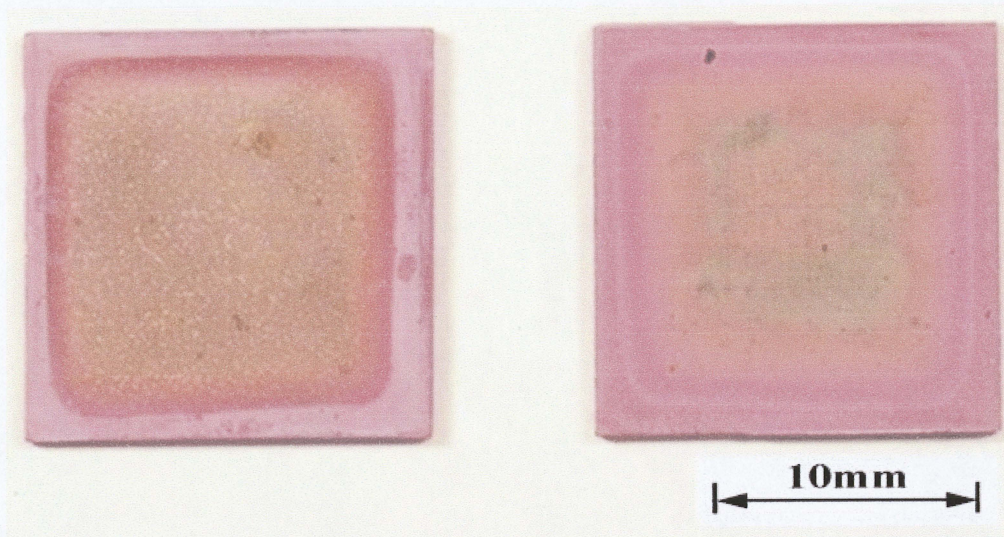
試験種別			基板酸化 処理条件		フィルタ 処理条件			試験条件	
試験記号	試験 海水	試験場所	酸化 温度	酸化 期間	枚数	浸漬 温度	浸漬 期間	試験 温度	試験 期間
CuP0.04Cu-F15	有菌 海水	タグボッ クス内	—	—	1 枚	20～ 21.5℃	5 日	20.5～ 23℃	2～5 週間
CuP3Cu-F15	有菌 海水	タグボッ クス内	—	—	1 枚	20～ 21.5℃	5 日	20.5～ 23℃	2～5 週間
CuCu-F15	有菌 海水	タグボッ クス内	—	—	1 枚	20～ 21.5℃	5 日	20.5～ 23℃	2～5 週間
CuP0.05Cu-F15	有菌 海水	タグボッ クス内	—	—	1 枚	24～ 25℃	5 日	21～ 25℃	2～4 週間



(a) 基板

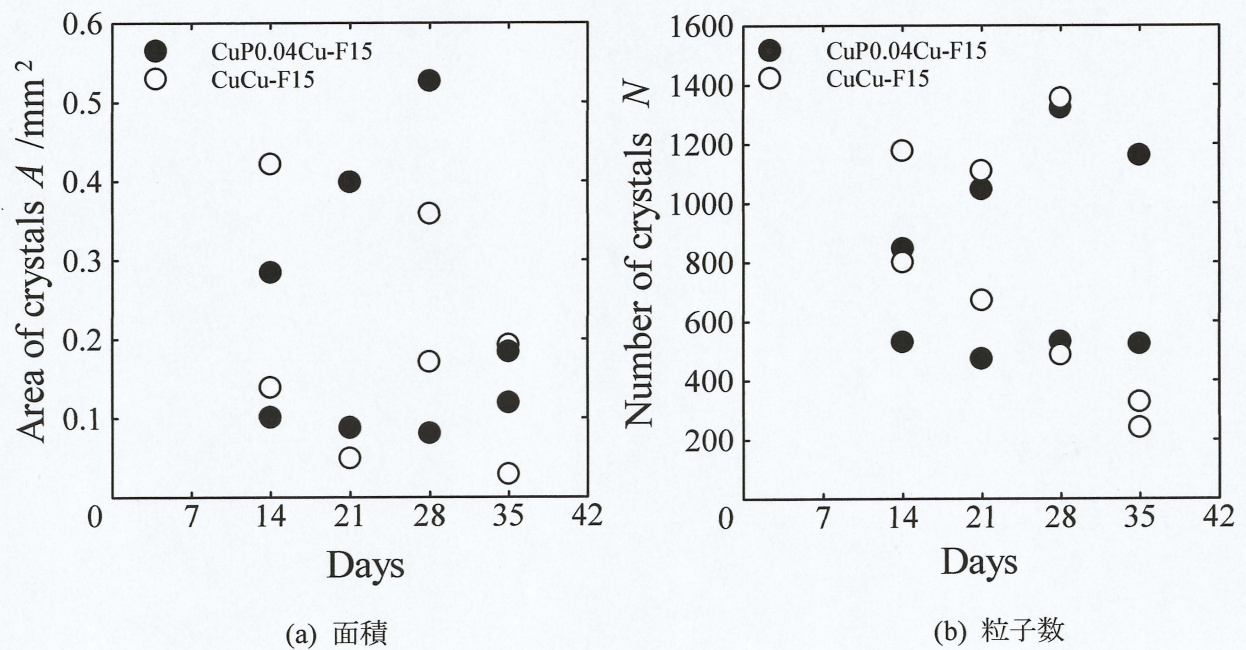
(b) マスク板

図 6.17 研磨($0.04 \mu\text{m}$)試験後の試験片写真 (CuP0.04Cu-F15, 試験期間 28 日)



(a) 基板

(b) マスク板

図 6.18 研磨($0.05\ \mu\text{m}$)試験後の試験片写真 (CuP0.05Cu-F15, 試験期間 28 日)

(a) 面積

(b) 粒子数

図 6.19 研磨($0.04\ \mu\text{m}$)試験の粒子面積および粒子数

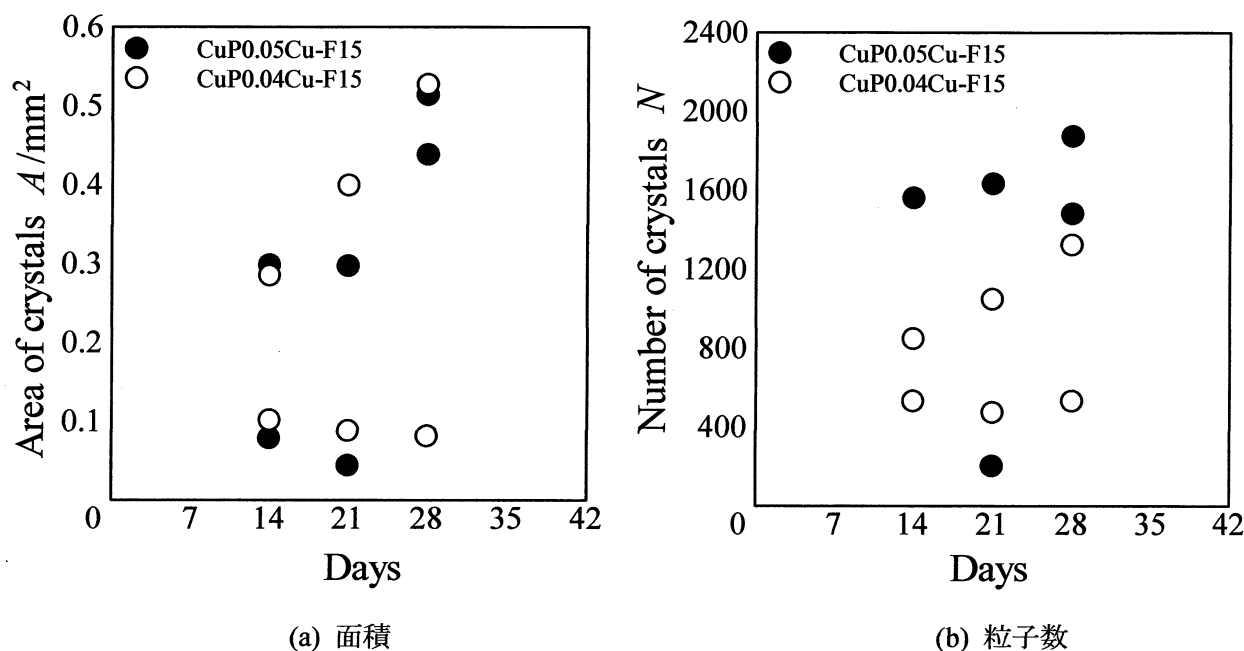


図 6.20 研磨($0.05\ \mu\text{m}$)試験の粒子面積および粒子数

6.6 試験片の表面状態、銅イオン濃度の影響

400mL 試験海水においては銅イオン濃度を高めることでMBDが発現し、また80mL 試験海水では基板表面を研磨しきれいにすることでMBDが発現しにくい条件でも問題なく銅結晶粒子が析出するという結果から、海水中の銅イオン濃度を変化させ基板表面を研磨しきれいにすることで、よりMBD発現に適した条件になるのではないかと考え銅イオン濃度、基板表面を研磨して実験を行った。

6.6.1 実験条件

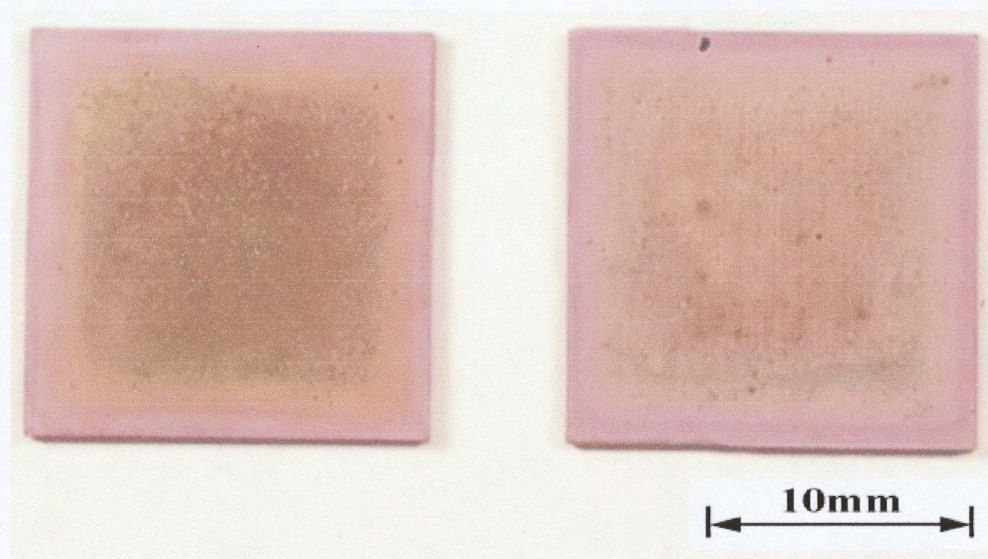
平均粒径 $1\ \mu\text{m}$ および $0.05\ \mu\text{m}$ のアルミナ砥粒でバフ研磨を行い、基板表面の表面粗さ $R_z=0.05\ \mu\text{m}$ に仕上げたものを用意し、 $30\times 30\ \text{mm}^2$ の銅板を400mL 海水の入ったビーカーの底に10枚重ねた状態で5日間浸漬し、銅イオン濃度 $4\sim 6\text{mgCu/L}$ にしたもの80mLで実験を行った。試験期間は1~4週間とし、試験水量以外の条件は銅イオン濃度試験と同じである。試験条件を表6.9に示す。

6.6.2 実験結果および考察

表面状態、銅イオン濃度の影響試験の試験片の写真を図6.21に示し、測定した粒子面積および粒子数を図6.22に示す。試験海水の銅イオン濃度を高め、研磨し基板表面をきれいにすると1週目から少量の析出がみられる。以上の結果から試験海水の銅イオン濃度を高め、基板の研磨を行いきれいにすることで通常ではMBDが発現しない1週目においても発現し、促進効果が得られることが確認できた。標準試験の銅イオン濃度を上げるだけでは促進効果は確認できなかったが、これで銅イオン濃度を上げることにより促進効果があることがわかった。

表 6.9 表面状態, 銅イオン濃度の影響試験の試験条件

試験種別			基板酸化 処理条件		フィルタ 処理条件			試験条件	
試験記号	試験 海水	試験場所	酸化 温度	酸化 期間	枚 数	浸漬 温度	浸漬 期間	試験温 度	試験 期間
CuP0.05Cu-F15 (ion)	有菌 海水	タグボッ クス内	—	—	1 枚	26～ 28℃	5 日	26～ 27℃	1～4 週 間
CuP0.05Cu-F15	有菌 海水	タグボッ クス内	—	—	1 枚	26～ 27℃	5 日	26～ 27.5℃	1～4 週 間



(a) 基板

(b) マスク板

図 6.21 表面状態, 銅イオン濃度の影響試験片写真 (CuP0.05Cu-F15(ion), 試験期間 7 日)

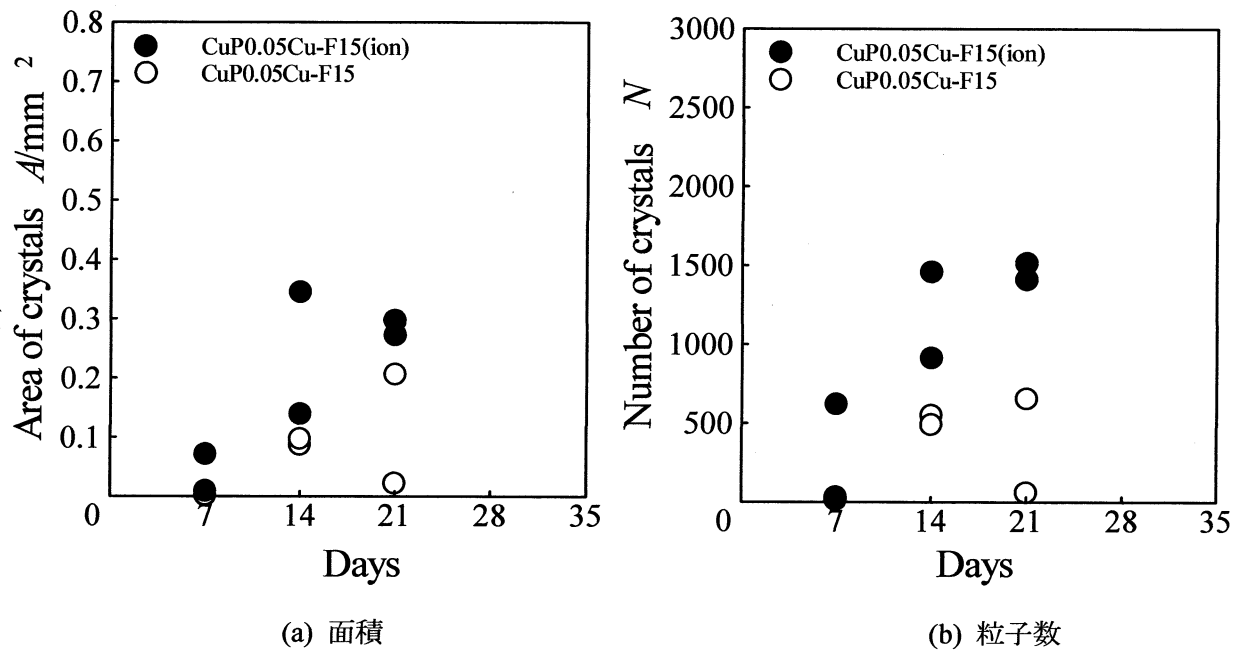


図 6.22 表面状態，銅イオン濃度の影響試験の粒子面積および粒子数

6.7 試験片の表面状態の影響 ($R_z=0.05\mu\text{m}$, $3\mu\text{m}$ 基板)

6.7.1 実験条件

同じ基板上で析出箇所をコントロールする試みとして基板の半分の表面粗さを変えて実験を行った。平均粒径 $1\mu\text{m}$ および $0.05\mu\text{m}$ のアルミナ砥粒でバフ研磨を行い，鏡面に仕上げたものの半分を #240 サンドペーパーで荒らし基板表面粗さ $R_z=0.05\mu\text{m}$, $3\mu\text{m}$ にしたものを用意した。作成した基板を図 6.23 に示す。銅イオン濃度 $4\sim 6\text{mgCu/L}$ にした試験海水 80mL で実験を行った。表面状態の影響試験の試験条件を表 6.10 にまとめる。

6.7.2 実験結果および考察

表面粗さ $0.05, 3\mu\text{m}$ の試験の試験片の写真を図 6.24 に示し，測定した粒子面積および粒子数を図 6.25 に示す。1~4 週間の試験の結果，基板表面粗さ $0.05\mu\text{m}$ 上では MBD が発現したが，基板表面粗さ $3\mu\text{m}$ 上では発現しなかった。以上の結果から同一基板上においても基板表面を研磨しきれいにした部分では MBD が発現し，荒らした部分では MBD が発現せず，きれいにした部分においては 6 章 6.6 と同様に促進効果が得られることも確認できた。表面粗さを変更することで析出箇所制御の可能性が示された。

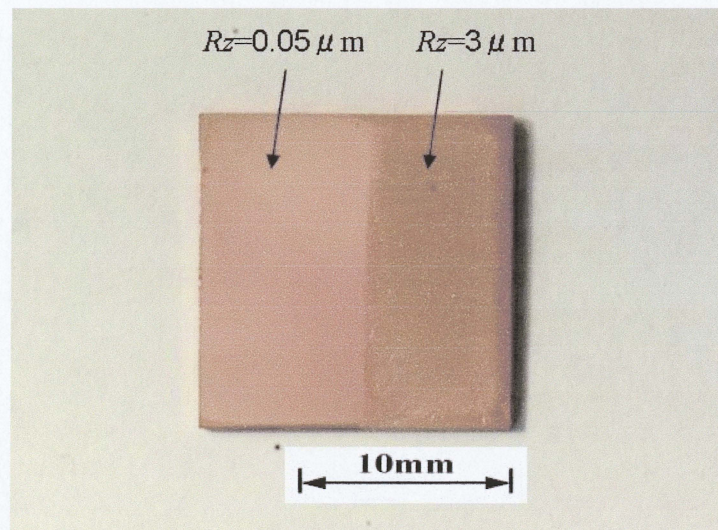


図 6.23 研磨($0.05, 3 \mu\text{m}$)試験前基板写真

表 6.10 表面状態の影響試験 ($R_z=0.05 \mu\text{m}$, $3 \mu\text{m}$ 基板) の試験条件

試験種別			基板酸化 処理条件		フィルタ 処理条件			試験条件	
試験記号	試験 海水	試験場所	酸化 温度	酸化 期間	枚数	浸漬 温度	浸漬 期間	試験温 度	試験 期間
CuP0.05, 3Cu-F15 (ion)	有菌 海水	タグボッ クス内	—	—	1 枚	24.5~ 26.5°C	5 日	24~ 26.5°C	1~4 週間

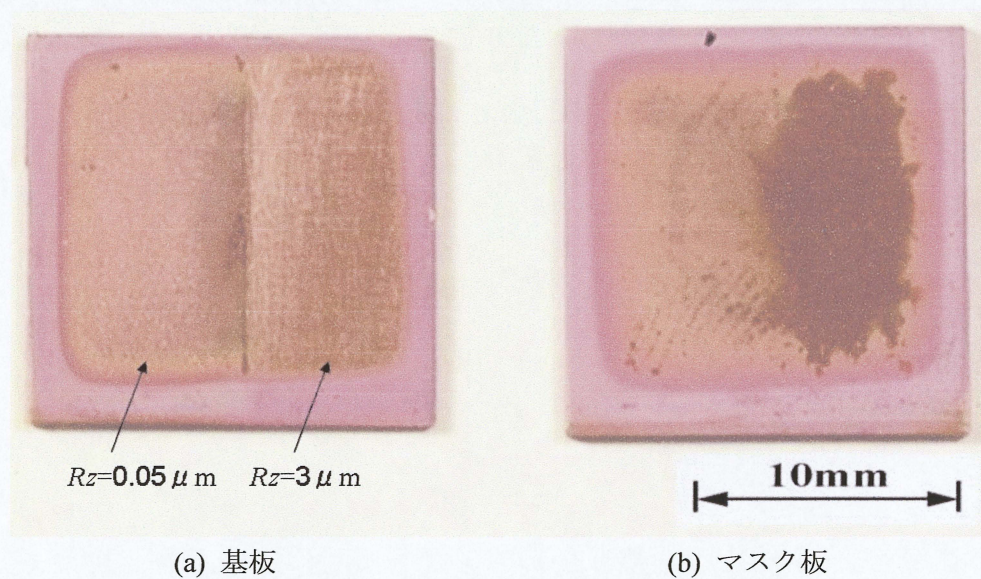


図 6.24 研磨($0.05, 3 \mu\text{m}$)試験後の試験片写真 (CuP0.05,3Cu-F15, 試験期間 21 日)

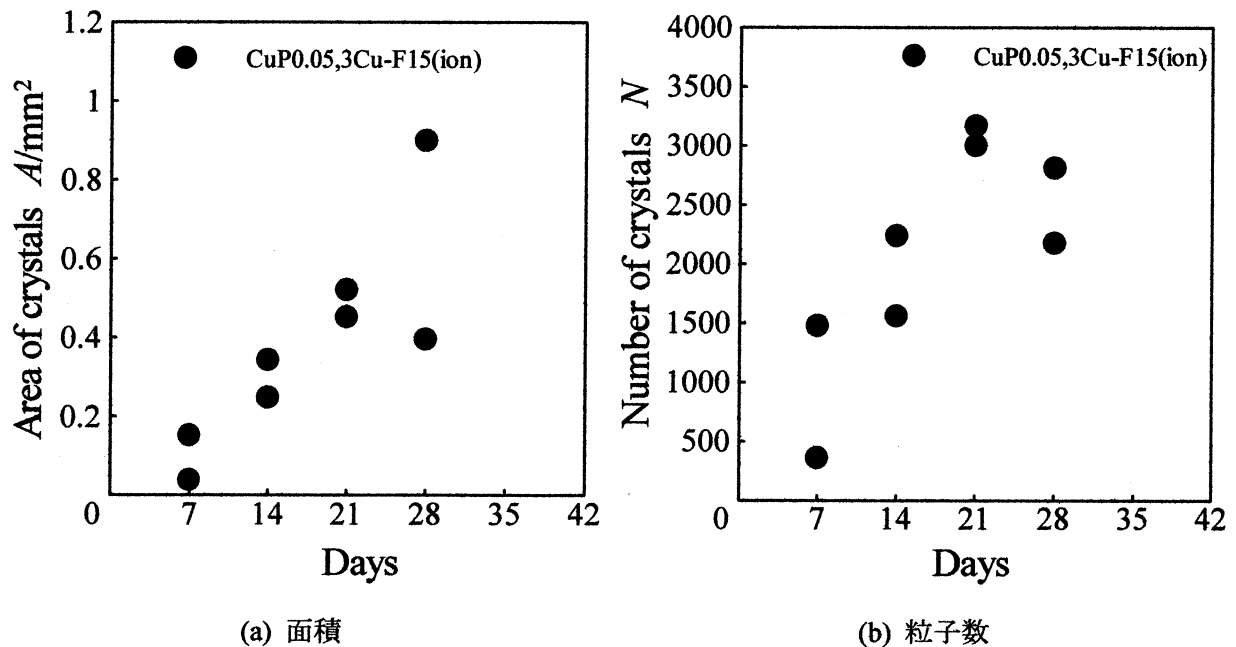


図 6.25 表面状態, 銅イオン濃度の影響試験の粒子面積および粒子数

6.8 pH および溶存酸素濃度の測定

6.8.1 pH 測定結果

MBD 生成プロセスを調べるため, 試験前と試験後の海水の pH の変化を測定した. 測定結果を図 6.26, 図 6.27, 図 6.28, 図 6.29 に示す. グラフからわかるように, pH は試験前と試験後ではあまり変化がなくおよそ $\text{pH}=8.1$ 付近で安定しており, また試験期間による変化も ± 0.1 程度という安定した値を示している. ゆえに, MBD の反応過程では炭酸のような pH を変化させる反応物は生成されないことがわかった. 嫌気性微生物は $\text{pH}=7\sim 8$ 前後の環境下で最も活発に活動するため⁽¹⁹⁾, 測定された pH の値も概ねこの辺りにあることから嫌気性微生物が活動していると思われる.

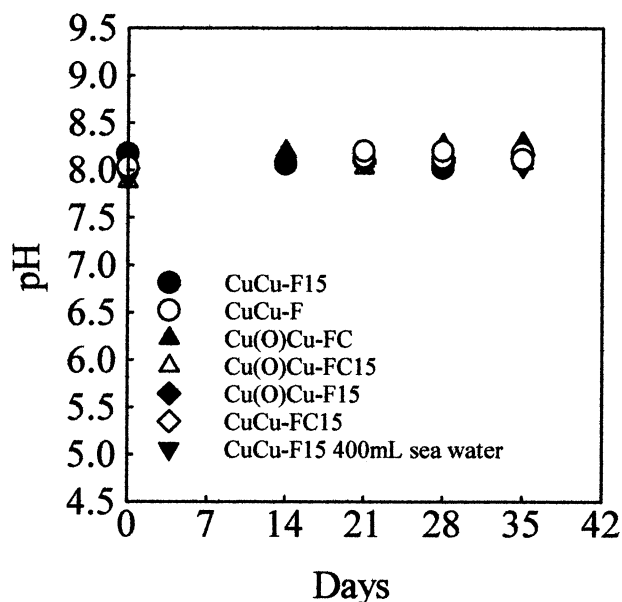


図 6.26 標準試験, 酸化有無, クランプ有無試験 pH 測定結果

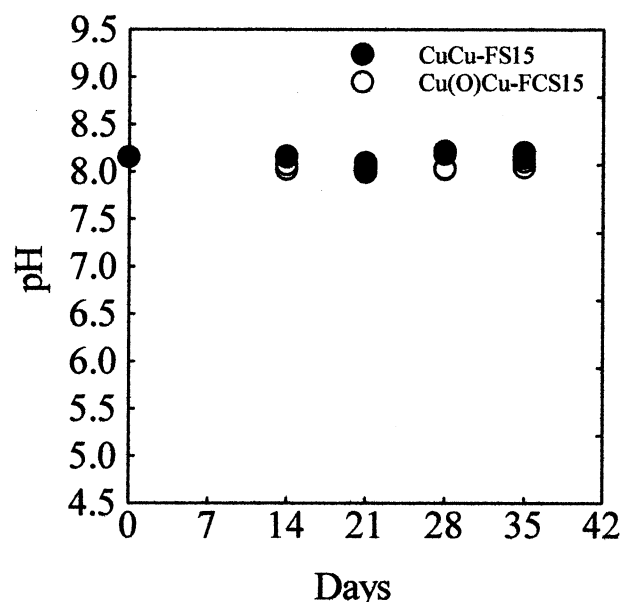


図 6.27 滅菌試験 pH 測定結果

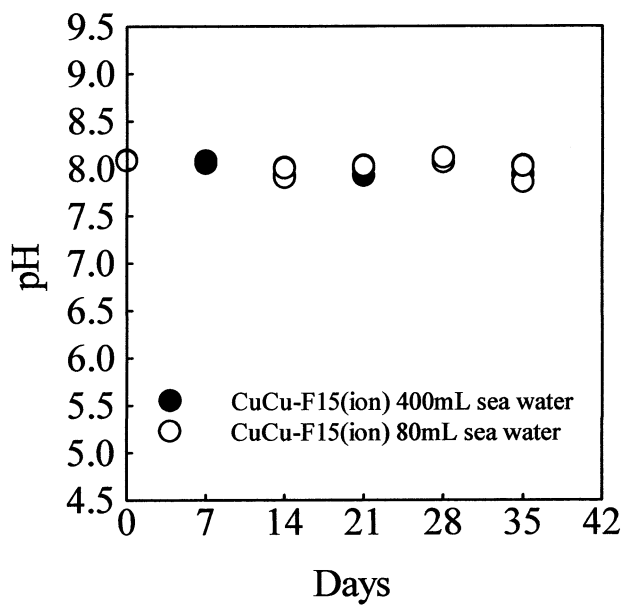


図 6.28 銅イオン濃度試験 pH 測定結果

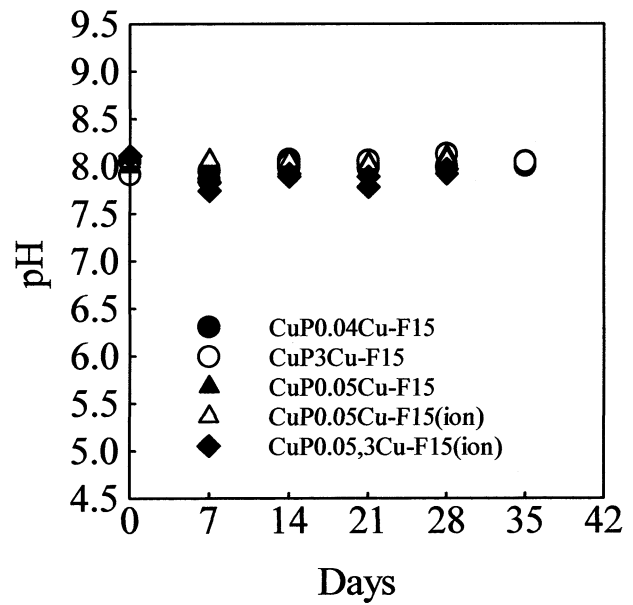


図 6.29 研磨試験 pH 測定結果

6.8.2 溶存酸素濃度測定結果

pHと同様に、溶存酸素濃度(DO)についてもその変化を測定した。図 6.30、図 6.31、図 6.32、図 6.33 に DO の測定結果を示す。試験開始前の DO に差が生じており、測定時期が遅いものほど試験開始前の DO が大きくなる傾向があった。海水の保管中に DO が大きくなった可能性が考えられるが、現在のところははっきりしていない。また、滅菌試験、銅イオン濃度試験は他の試験と比べ DO が小さくなる傾向もみられた。試験期間による変化を見ると、増加・減少の両方の傾向が見られた。濃度の増減には一貫した変化は見られず、MBD と溶存酸素との有意の関係は見られなかった。

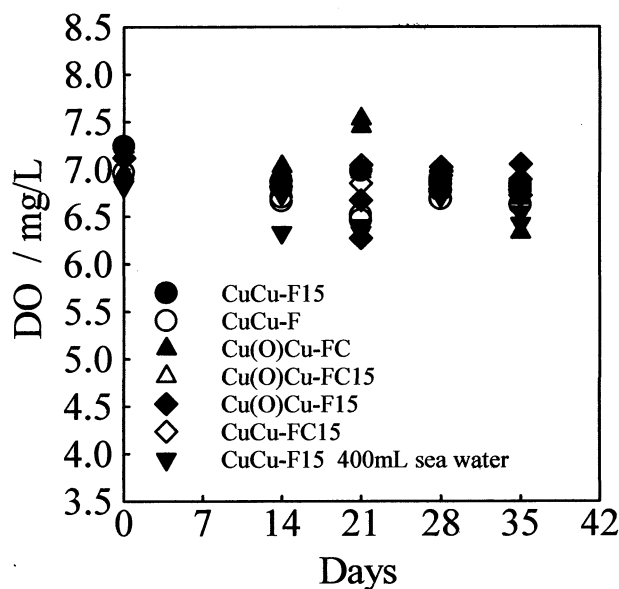


図 6.30 標準試験、酸化有無、クランプ有無試験 DO 測定結果

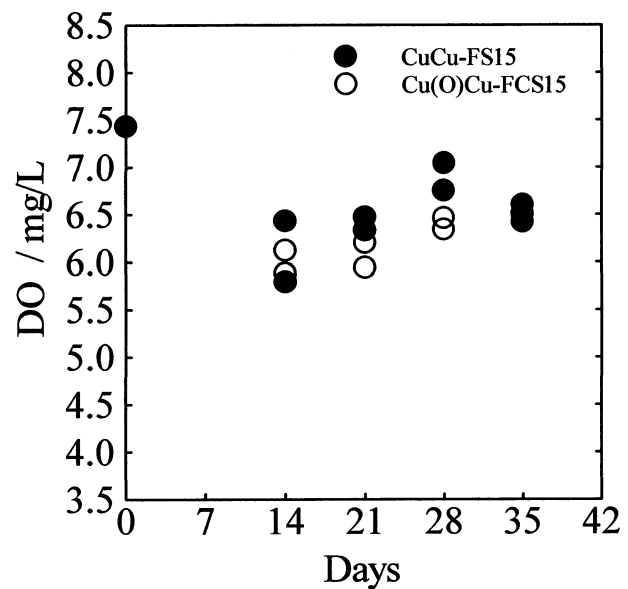


図 6.31 滅菌試験 DO 測定結果

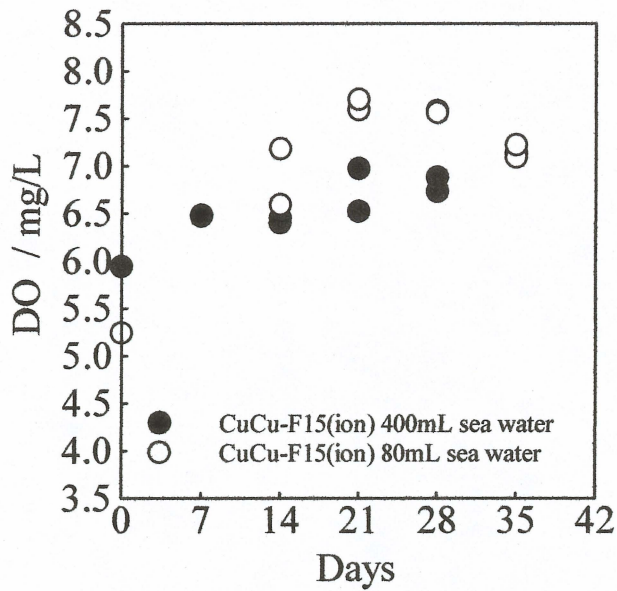


図 6.32 銅イオン濃度試験 DO 測定結果

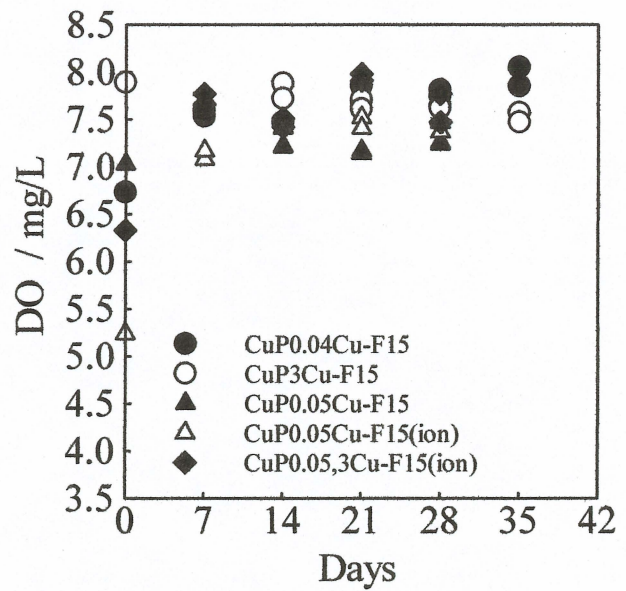


図 6.33 研磨試験 DO 測定結果

6.9 微生物の観察

6.9.1 生物顕微鏡による観察結果

MBD 試験前および試験後の海水を生物顕微鏡で観察した。その観察結果を図 6.34 および図 6.35 に示す。生物顕微鏡では、試験前と試験後の海水中に生息する微生物に差が見られなかった。また観察される微生物の数が少なく、観察された微生物の種類も特定することができなかったため、微生物の観察は主に SEM で行うことにした。

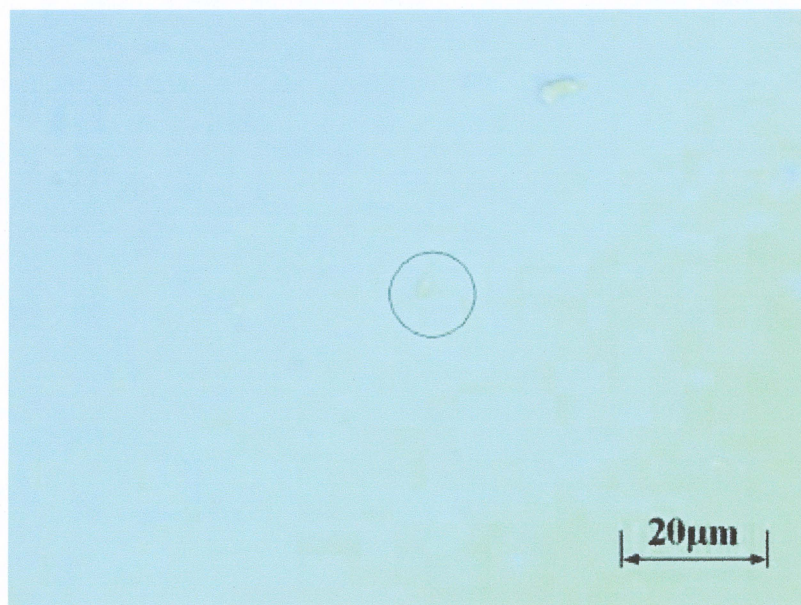


図 6.34 試験前海水の生物顕微鏡による微生物観察結果

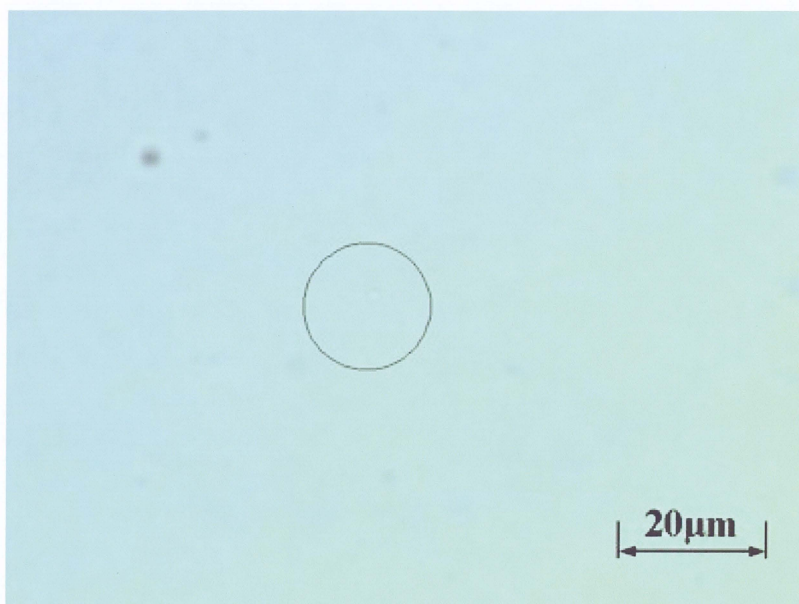


図 6.35 標準試験後の試験海水の生物顕微鏡による微生物観察結果

6.9.2 SEM による観察結果

MBD 試験前および試験後の試験片を SEM で観察した。観察結果を図 6.36～図 6.41 に示す。基板上では桿菌，短桿菌，球菌，双球菌などが観察された。また，滅菌試験でも試験後に微生物が観察されることがあったが，通常の試験で多く確認された球菌や短桿菌はあまり観察されずほとんどがらせん菌であった。



図 6.36 基板上で観察された短桿菌

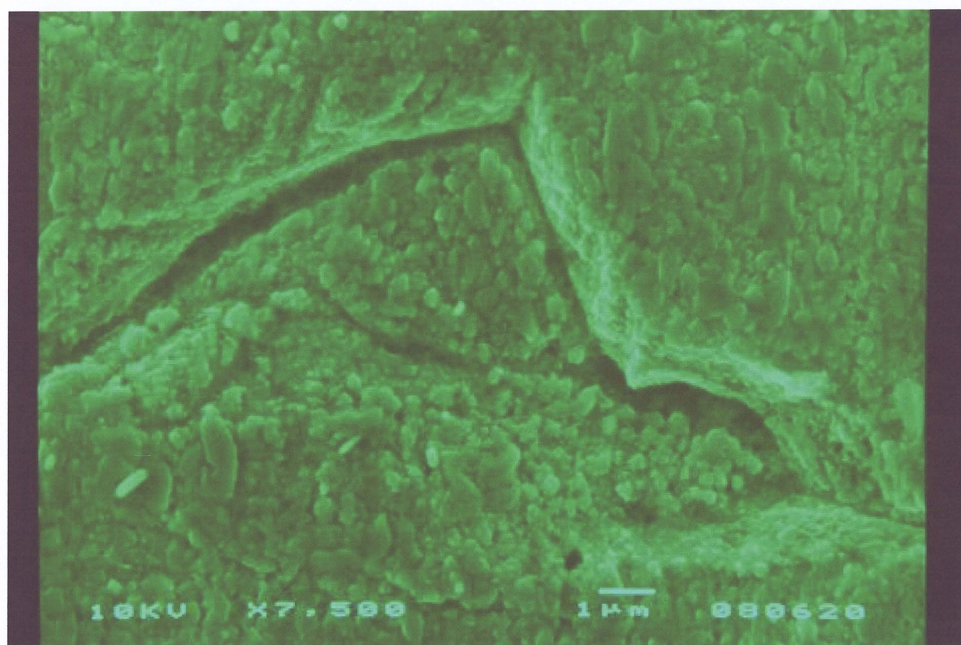


図 6.37 マスク板上で観察された短桿菌

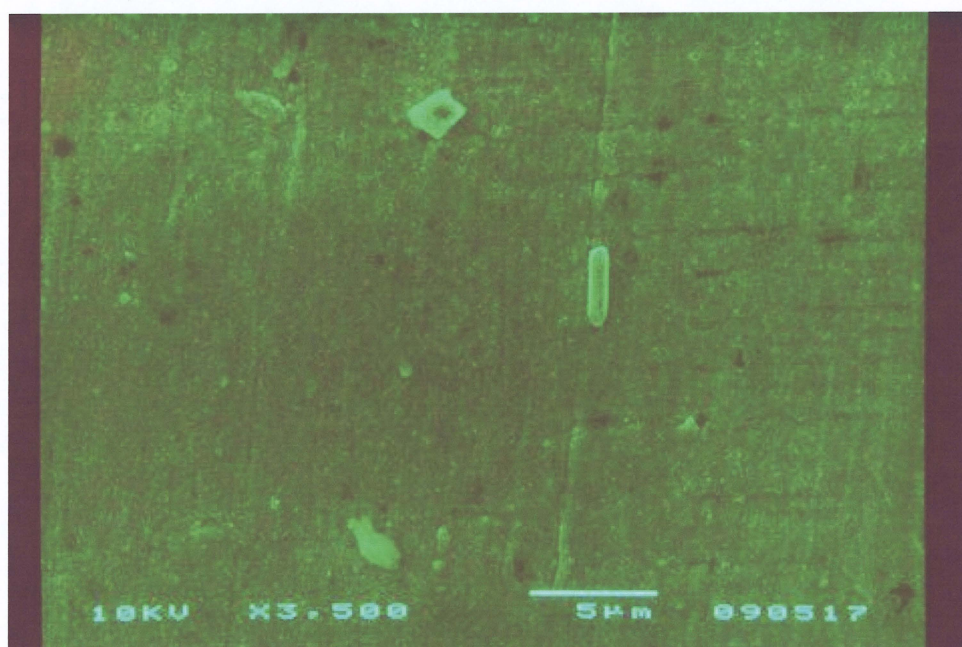


図 6.38 基板上で観察された桿菌

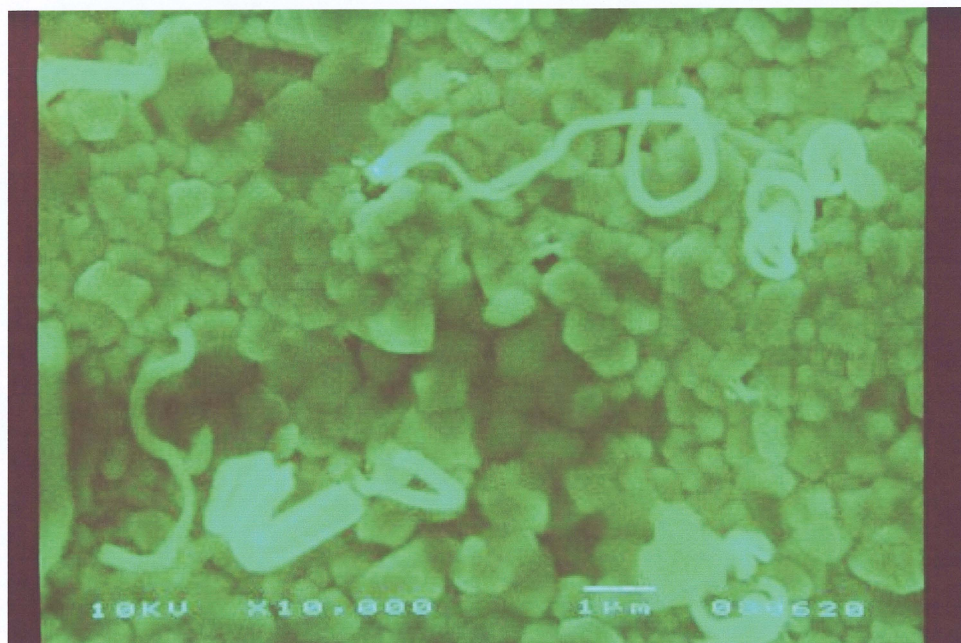


図 6.39 基板上で観察されたらせん菌

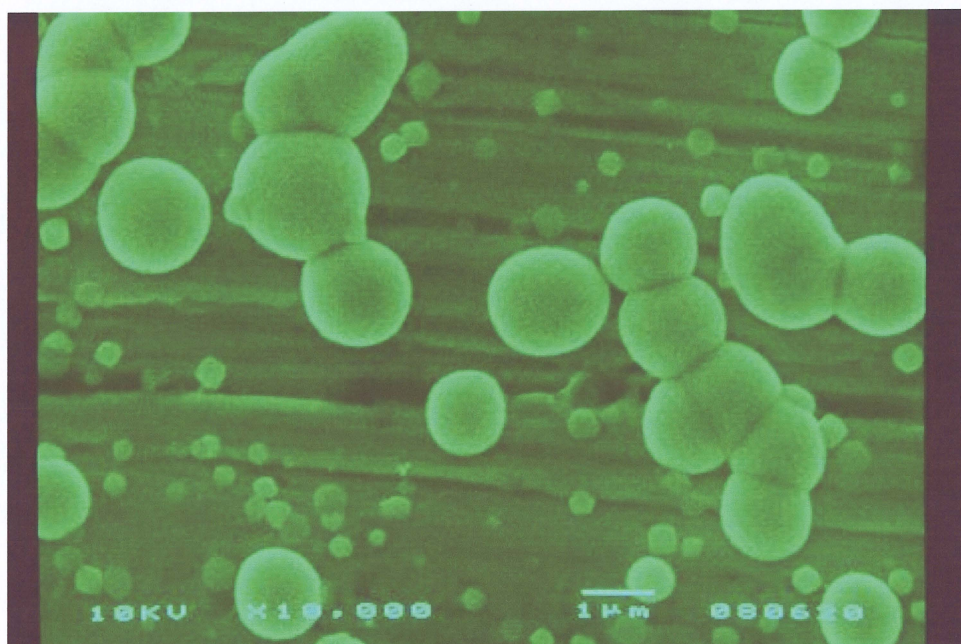


図 6.40 基板上で観察された球菌

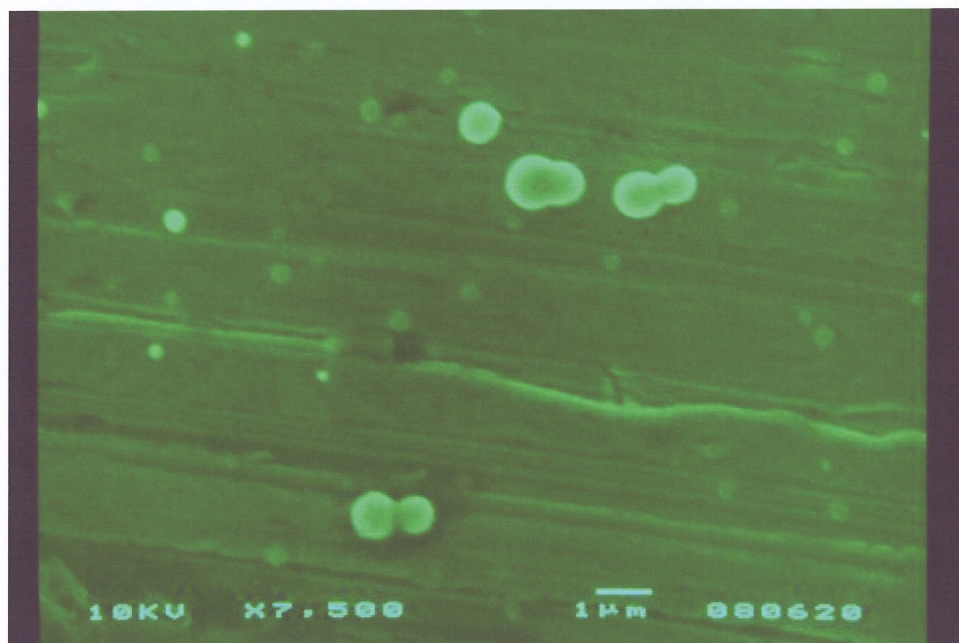


図 6.41 基板上で観察された双球菌

最後に、本研究で得られた結果を表 6.11, 6.12 に示す.

表 6.11 実験結果一覧 (80mL)

試験名	試験記号	基板	マスク板	試験片 条件	試験 水	クランプ	酸化処理		フィルタ濃度		試験条件		結果		
							温度	日数	枚数	温度	日数	温度	日数	析出 箇所	析出 開始日
酸化無クランプ 無試験	CuCu-F15	無酸素銅 圧延面	無酸素銅 圧延面	有面 15×15 mm ²	有面 海水	—	—	0日	1	20～ 23.5℃	5日	20～ 25℃	2～ 5週間	×	—
	CuCu-F15	無酸素銅 圧延面	無酸素銅 圧延面	有面 15×15 mm ²	有面 海水	—	—	0日	1	23～ 27℃	5日	23～ 27℃	3～ 5週間	基板	4週目
	CuCu-F15	無酸素銅 圧延面	無酸素銅 圧延面	有面 15×15 mm ²	有面 海水	—	—	0日	1	24～ 25℃	5日	24～ 28℃	2～ 5週間	基板	3週目
	CuCu-F	無酸素銅 圧延面	無酸素銅 圧延面	有面 30×30 mm ²	有面 海水	—	—	0日	1	24.5～ 26℃	5日	25～ 28℃	2～ 5週間	基板	2週目
	CuCu-F15	無酸素銅 圧延面	無酸素銅 圧延面	有面 15×15 mm ²	有面 海水	—	—	0日	1	24.5～ 26℃	5日	25～ 28℃	2～ 5週間	基板	3週目
	CuCu-F15	無酸素銅 圧延面	無酸素銅 圧延面	有面 15×15 mm ²	有面 海水	—	—	0日	1	25～ 27℃	5日	26～ 27.5℃	2～ 5週間	×	—
	CuCu-F15	無酸素銅 圧延面	無酸素銅 圧延面	有面 15×15 mm ²	有面 海水	—	—	0日	1	26.5～ 28℃	5日	26～ 28.5℃	3～ 5週間	基板	3週目
	CuCu-F15	無酸素銅 圧延面	無酸素銅 圧延面	有面 15×15 mm ²	有面 海水	—	—	0日	1	26.5～ 27.5℃	5日	21～ 27.5℃	3～ 5週間	基板	4週目
	CuCu-F15	無酸素銅 圧延面	無酸素銅 圧延面	有面 15×15 mm ²	有面 海水	—	—	0日	1	26～ 28℃	5日	20～ 25.5℃	1～ 5週間	×	—
	CuCu-F15	無酸素銅 圧延面	無酸素銅 圧延面	有面 15×15 mm ²	有面 海水	—	—	0日	1	24.5～ 26℃	5日	19～ 23℃	1～ 5週間	×	—
	CuCu-F15	無酸素銅 圧延面	無酸素銅 圧延面	有面 15×15 mm ²	有面 海水	—	—	0日	1	21.5～ 23℃	5日	18～ 23.5℃	1～ 5週間	×	—
	CuCu-F15	無酸素銅 圧延面	無酸素銅 圧延面	有面 15×15 mm ²	有面 海水	—	—	0日	1	20.5～ 21.5℃	5日	20～ 21.5℃	2～ 5週間	基板	4週目 *1
	CuCu-F15	無酸素銅 圧延面	無酸素銅 圧延面	有面 15×15 mm ²	有面 海水	—	—	0日	1	20～ 22℃	5日	20.5 ～ 24℃	2～ 5週間	基板	3週目
	CuCu-F15	無酸素銅 圧延面	無酸素銅 圧延面	有面 15×15 mm ²	有面 海水	—	—	0日	1	20～ 21.5℃	5日	20.5 ～ 23℃	2～ 5週間	基板	4週目 *1
	CuCu-F15	無酸素銅 圧延面	無酸素銅 圧延面	有面 15×15 mm ²	有面 海水	—	—	0日	1	23～ 25℃	5日	23～ 26℃	2～ 5週間	基板	3週目
	CuCu-F15	無酸素銅 圧延面	無酸素銅 圧延面	有面 15×15 mm ²	有面 海水	—	—	0日	1	23.6～ 25.6℃	5日	24～ 27.5℃	2～ 5週間	基板	3週目
	CuCu-F15	無酸素銅 圧延面	無酸素銅 圧延面	有面 15×15 mm ²	有面 海水	—	—	0日	1	24～ 25℃	5日	26～ 27℃	2～ 4週間	基板	2週目
	CuCu-F15	無酸素銅 圧延面	無酸素銅 圧延面	有面 30×30 mm ²	有面 海水	—	—	0日	1	26～ 28℃	5日	26～ 27℃	2～ 4週間	基板	2週目
	CuCu-F15	無酸素銅 圧延面	無酸素銅 圧延面	有面 15×15 mm ²	有面 海水	—	—	0日	1	21～ 24.5℃	5日	25～ 28℃	1～ 4週間	基板	週目
酸化有試験	Cu(O)Cu-F0	無酸素銅 圧延面	無酸素銅 圧延面	有面 30×30 mm ²	有面 海水	絶縁	20～ 23.5℃	1日	1	20～ 23.5℃	5日	20～ 25℃	2～ 5週間	基板	2週目
	Cu(O)Cu-F015	無酸素銅 圧延面	無酸素銅 圧延面	有面 15×15 mm ²	有面 海水	絶縁	24～ 25℃	1日	1	24～ 25℃	5日	24～ 28℃	2～ 5週間	×	—
酸化有クランプ 無試験	Cu(O)Cu-F15	無酸素銅 圧延面	無酸素銅 圧延面	有面 15×15 mm ²	有面 海水	—	21～ 27.5℃	1日	1	26.5～ 27.5℃	0日	22～ 27℃	3～ 5週間	×	—
酸化無クランプ 有試験	CuCu-F015	無酸素銅 圧延面	無酸素銅 圧延面	有面 15×15 mm ²	有面 海水	—	—	0日	1	26.5～ 27.5℃	0日	22～ 27℃	3～ 5週間	×	—
減菌試験	CuCu-FS15	無酸素銅 圧延面	無酸素銅 圧延面	減菌 15×15 mm ²	減菌 海水	—	—	0日	1	33～ 35℃	5日	33～ 35℃	2～ 5週間	×	—
	Cu(O)Cu-FCS15	無酸素銅 圧延面	無酸素銅 圧延面	減菌 15×15 mm ²	減菌 海水	絶縁	33～ 35℃	1日	1	33～ 35℃	5日	33～ 35℃	2～ 5週間	×	—
研磨試験 (0.04μm)	CuP0.04Cu-F15	無酸素銅 圧延面	無酸素銅 圧延面	有面 15×15 mm ²	有面 海水	—	—	0日	1	25～ 27℃	5日	26～ 27.5℃	3～ 5週間	基板	3週目
	CuP0.04Cu-F15	無酸素銅 圧延面	無酸素銅 圧延面	有面 15×15 mm ²	有面 海水	—	—	0日	1	24.5～ 26℃	5日	19～ 23℃	1～ 5週間	基板	2週目 *1
	CuP0.04Cu-F15	無酸素銅 圧延面	無酸素銅 圧延面	有面 15×15 mm ²	有面 海水	—	—	0日	1	20～ 21.5℃	5日	20.5 ～ 23℃	2～ 5週間	基板	2週目 *1
研磨試験 (0.05μm)	CuP0.05Cu-F15	無酸素銅 圧延面	無酸素銅 圧延面	減菌 15×15 mm ²	減菌 海水	—	—	0日	1	24.5～ 26.5℃	5日	25～ 27.5℃	2～ 4週間	基板	2週目
	CuP0.05Cu-F15	無酸素銅 圧延面	無酸素銅 圧延面	減菌 15×15 mm ²	減菌 海水	—	—	0日	1	26～ 27℃	5日	26～ 27.8℃	1～ 4週間	基板	2週目
	CuP0.05Cu-F15	無酸素銅 圧延面	無酸素銅 圧延面	減菌 15×15 mm ²	減菌 海水	—	—	0日	1	26.3～ 27℃	5日	26～ 27℃	1～ 4週間	基板	2週目
	CuP0.05Cu-F15	無酸素銅 圧延面	無酸素銅 圧延面	減菌 15×15 mm ²	減菌 海水	—	—	1日	1	24～ 26℃	5日	21～ 25℃	1～ 4週間	基板	2週目
研磨試験 (3μm)	CuP3Cu-F15	無酸素銅 圧延面	無酸素銅 圧延面	有面 15×15 mm ²	有面 海水	—	—	0日	1	20～ 21.5℃	5日	20.5 ～ 23℃	2～ 5週間	×	—
	CuP3Cu-F15	無酸素銅 圧延面	無酸素銅 圧延面	有面 15×15 mm ²	有面 海水	—	—	0日	1	23～ 25℃	5日	23～ 26℃	2～ 5週間	×	—
	CuP3Cu-F15	無酸素銅 圧延面	無酸素銅 圧延面	有面 15×15 mm ²	有面 海水	—	—	0日	1	26～ 28.3℃	5日	26～ 27℃	2～ 4週間	×	—
銅イオン濃度 (2.2mgCu/L)	CuCu-F15(ion)	無酸素銅 圧延面	無酸素銅 圧延面	有面 15×15 mm ²	有面 海水	—	—	0日	1	23.6～ 25.6℃	5日	24～ 27.5℃	2～ 5週間	基板	3週目
	CuCu-F15(ion)	無酸素銅 圧延面	無酸素銅 圧延面	有面 15×15 mm ²	有面 海水	—	—	0日	1	26～ 28℃	5日	26～ 27℃	2～ 4週間	基板	2週目
銅イオン濃度 (4～6mgCu/L) 研磨試験 (0.05μm)	CuP0.05Cu-F15(ion)	無酸素銅 圧延面	無酸素銅 圧延面	有面 15×15 mm ²	有面 海水	—	—	0日	1	26～ 28℃	5日	26～ 27℃	1～ 4週間	基板	1週目
	CuP0.05Cu-F15(ion)	無酸素銅 圧延面	無酸素銅 圧延面	有面 15×15 mm ²	有面 海水	—	—	0日	1	26～ 27℃	5日	26～ 27.8℃	1～ 4週間	基板	1週目
	CuP0.05Cu-F15(ion)	無酸素銅 圧延面	無酸素銅 圧延面	有面 15×15 mm ²	有面 海水	—	—	0日	1	26.3～ 27℃	5日	26～ 27℃	1～ 4週間	基板	1週目
	CuP0.05Cu-F15(ion)	無酸素銅 圧延面	無酸素銅 圧延面	有面 15×15 mm ²	有面 海水	—	—	0日	1	20～ 21.5℃	5日	21～ 25℃	1～ 4週間	基板	1週目
銅イオン濃度 (4～6mgCu/L) 研磨試験 (0.05+3μm)	CuP0.05P3Cu-F15(ion)	無酸素銅 圧延面	無酸素銅 圧延面	有面 15×15 mm ²	有面 海水	—	—	0日	1	22～ 25℃	5日	24～ 26.5℃	1～ 4週間	基板	1週目
	CuP0.05P3Cu-F15(ion)	無酸素銅 圧延面	無酸素銅 圧延面	有面 15×15 mm ²	有面 海水	—	—	0日	1	22～ 25℃	5日	23～ 25℃	1～ 4週間	基板	1週目

*1 : 2 枚中 1 枚から析出あり

表 6.12 実験結果一覧 (400mL)

試験名	試験記号	基板	マスク板	試験片 条件	試験 水	クランプ	酸化処理		フィルタ浸漬		試験条件		結果		
							温度	日数	枚数	温度	日数	温度	日数	析出 箇所	析出 開始日
酸化無クラン プ無試験	CuCu-F	無酸素銅 圧延面	無酸素銅 圧延面	有菌 30×30 mm ²	有菌 海水	—	—	0日	1	23～ 27℃	5日	23～ 27℃	2～ 5週間	×	—
銅イオン濃度 (2.2mgCu/L)	CuCu- F15(ion)	無酸素銅 圧延面	無酸素銅 圧延面	有菌 15×15 mm ²	有菌 海水	—	—	0日	1	26.5～ 28℃	5日	26～ 28.5℃	3～ 5週間	基板	3週目
	CuCu- F15(ion)	無酸素銅 圧延面	無酸素銅 圧延面	有菌 15×15 mm ²	有菌 海水	—	—	0日	1	20～ 25.5℃	5日	20～ 25.5℃	1～ 5週間	基板	1週目*1
	CuCu- F15(ion)	無酸素銅 圧延面	無酸素銅 圧延面	有菌 15×15 mm ²	有菌 海水	—	—	0日	1	21.5～ 23℃	5日	18～ 23.5℃	1～ 5週間	×	—
	CuCu- F15(ion)	無酸素銅 圧延面	無酸素銅 圧延面	有菌 15×15 mm ²	有菌 海水	—	—	0日	1	20～ 22℃	5日	20.5～ 24℃	1～ 4週間	基板	2週目*1

* 1:2 枚中 1 枚から析出あり

第7章 結論

本研究では、無酸素銅板を用いた MBD（バイオデポジション）について検討を行った。その結果、次のような結論が得られた。

- (1) 試験片サイズを $15 \times 15 \text{mm}^2$ にした試験では、過去の研究では海水を 80mL にした酸化無クランプ無試験でのみ析出が得られたので、その再現性を確認し、これを標準試験として新たに定めた。
- (2) 基板の酸化処理の有無およびクランプの有無の違いによる検討を行ったところ、どちらかでも行った場合は析出しなかった。ゆえに、基板酸化処理やクランプの使用は MBD 発現の必須条件ではなく、むしろ阻害要因であると思われる。
- (3) 標準試験に対し、海水量のみを 400mL に変更した試験を行ったところ、MBD の発現は得られなかった。
- (4) 滅菌試験を行ったところ、MBD の発現は得られなかったため、発現には微生物が関与していると思われる。
- (5) 試験海水中の銅イオン濃度を高めた試験を行ったところ、通常では MBD が発現しない 400mL の海水量でも発現し、促進効果が得られた。
- (6) 試験基板表面を研磨し、粗さを変えた試験を行ったところ、表面粗さ $R_z=0.04 \mu\text{m}$ の試験においては MBD の発現が早まったが、表面粗さ $R_z=3 \mu\text{m}$ の試験においては、MBD の発現は得られなかった。また、試験片表面粗さ $R_z=0.04 \mu\text{m}$ と $R_z=0.05 \mu\text{m}$ を比較したところ、析出量にあまり変化はなく、試験準備の短縮ができるようになった。基板表面を研磨しきれいにすることで MBD が発現しやすくなることが示された。
- (7) 試験海水 80mL で試験海水中の銅イオン濃度を高めるだけでは促進効果が得られなかったが、試験海水中の銅イオン濃度を高め、試験片表面を研磨することで MBD の発現が早まることがわかった。
- (8) 同一基板上の半分の表面粗さを $R_z=3 \mu\text{m}$ と $R_z=0.05 \mu\text{m}$ と変えた試験を行ったところ、基板表面粗さ $R_z=0.05 \mu\text{m}$ の部分でのみ析出がみられ、表面粗さを変更することで析出箇所制御の可能性が示された。
- (9) 試験中の pH にはあまり大きな変化はなく、およそ $\text{pH}=8.0$ で安定していた。また、試験中の溶存酸素濃度 DO の変化についてははっきりとした傾向はつかめなかった。
- (10) 試験後の基板上の SEM 観察を行った結果、MBD プロセスには海水中に生息する桿菌、短桿菌、球菌のいずれかが関与していると思われる。

参考文献

- (1) 藤田博之：MEMS の開発の 10 年と光通信への応用，電子情報通信学会 信学技報，(2001)，9-13.
- (2) 熊田誠：微生物腐食を応用した金属微細加工に関する研究，材料と環境，50，(2001)，411-417.
- (3) 宇野義幸・金枝敏明・横溝精一・由村貴彦：電界付加バイオマシニングに関する研究，精密工学会誌 Vol.62 No.4，(1996)，540-543.
- (4) 宮野・坪沼・スリークマーリ・大森・菊地：スタフィロコッカススピーシーズを利用した銅の微細除去加工，溶接学会全国大会講演概要 第 73 集，(2003)，124-125.
- (5) 西川正三：淡水中における銅の微生物腐食，溶接学会誌 第 64 巻 第 4 号，(1995)，48-51.
- (6) Rongjun Zuo : Biofilms:Strategies For Metal Corrosion Inhibition Employing Microorganisms, APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, Volume 76 No.6, (2007)，1245-1253.
- (7) JOGMEC 独立行政法人 石油天然ガス・金属鉱物資源機構：平成 17 年度 鉱物資源開発・製錬技術等調査報告書，参考 URL ; http://mric.jogmec.go.jp/tec_dev_rep/pdf/report160.pdf
- (8) 中川和也：海水環境における金属表面への微生物作用に関する研究，平成 3 年度修士論文，(1992).
- (9) 堀場智弘：海洋微生物の材料プロセス機能を利用した加工法の開発に関する研究，平成 5 年度修士論文，(1994).
- (10) 山口輝男：嫌気性微生物による銅結晶体の析出作用，平成 8 年度修士論文，(1997).
- (11) 間柄翠：微生物を用いた微細粒子析出法，平成 20 年度修士論文，(2009).
- (12) 福島達也：微生物機能を利用した材料処理法に関する研究，平成 21 年度修士論文，(2010).
- (13) 柳田友道：微生物科学 4 生態，学会出版センター，(1984)，54，79-82，122-125，139-141.
- (14) 芦田智明・淡川拓郁：微生物の材料プロセス機能に関する基礎研究，平成 7 年度卒業論文，(1996).
- (15) Stephen C.Dexter : Marin Corrosion, Metals Handbook Ninth Edition, Volume 13, Corrosion, (1987)，893-907.
- (16) 三重県科学技術センター水産研究部：平成 19 年度水質調査結果—伊勢湾 調査地点 8，参考 URL ; <http://www.sea.pref.mie.jp/mirainet/ui/ui03001.htm>
- (17) Raymond F. Decker : Biotechnology / Materials : The Growing Interface , METALLURGICAL TRANSACTION A, Vol.17A, January, (1986)，5-30.
- (18) 青木・井口・末永・井内・加藤 他：地球の水圏—海洋と陸水，東海大学出版会，(1995)，41-42.
- (19) 平島剛・笹木圭子・芳賀生憲・大沼英明・恒川昌美・西尾広志：水溶性切削油剤の腐敗防止に関する研究，資源と素材 Vol.115 No.4，(1999)，240-244.

謝辞

本研究の終わりにあたり、終始懇切丁寧なる御指導を賜った三重大学ナノプロセッシング研究室、松井正仁准教授、中村裕一准教授、鈴木実平教授ならびに村井健一技術専門員に深く感謝いたします。そして、実験に際して惜しみない御指示、御協力をいただいたナノプロセッシング研究室、中山聖士氏ならびにナノプロセッシング研究室諸氏に心から御礼申し上げます。