

平成 27 年度修士論文

微生物機能を利用した銅粒子析出法

指導教員 松井 正仁 准教授

平成 27 年度

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

吉川 卓哉

目次

第 1 章 緒論	-1-
第 2 章 実験方法	-3-
2.1 観察および測定装置の概要	-3-
2.2 供試材および試験片	-11-
2.2.1 供試材	-11-
2.2.2 試験片	-13-
2.3 試験海水	-13-
2.4 試験方法	-16-
2.4.1 クランプ法	-16-
2.4.1.1 釣り糸によるクランプ法	-17-
2.4.1.2 おもりによるクランプ法	-17-
2.4.2 試験装置	-18-
2.4.3 試験記号	-19-
2.4.4 試験手順	-20-
2.4.4.1 標準試験	-21-
2.4.4.2 滅菌試験	-21-
2.4.4.3 おもりによるクランプ試験	-22-
2.4.4.4 フィルムによる遮蔽試験	-22-
2.4.4.5 クランプなし	-22-
2.4.4.6 釣り糸 4 本の上へのせる	-22-
2.4.4.7 試験片を浮かせる	-23-
2.4.4.8 試験片を立てる	-25-
2.5 研磨方法	-28-
2.6 析出粒子評価法	-28-
第 3 章 実験結果および考察	-31-
3.1 滅菌試験	-31-
3.1.1 実験条件	-31-
3.1.2 実験結果および考察	-31-
3.2 基板，マスク板の海水側表面粗さの影響	-33-

3.2.1	実験条件	-33-
3.2.2	実験結果および考察	-33-
3.3	簡易クランプ試験	-38-
3.3.1	実験条件	-38-
3.3.2	実験結果および考察	-38-
3.4	フィルムによる遮蔽試験	-41-
3.4.1	実験条件	-41-
3.4.2	実験結果および考察	-42-
3.5	基板の海水接触面積の影響	-46-
3.5.1	実験条件	-46-
3.5.2	実験結果および考察	-46-
3.6	おもりによるクランプ力の影響	-51-
3.6.1	実験条件	-51-
3.6.2	実験結果および考察	-51-
3.7	設置方法の影響	-57-
3.7.1	実験条件	-57-
3.7.2	実験結果および考察	-57-
3.8	pH および溶存酸素濃度, 銅イオン濃度の測定	-62-
3.8.1	pH の測定結果	-62-
3.8.2	溶存酸素濃度の測定結果	-64-
3.8.3	銅イオン濃度の測定結果	-66-
3.9	室温と析出量の関係	-68-
3.10	微生物の観察	-68-
3.10.1	生物顕微鏡による観察結果	-69-
3.10.2	SEM による観察結果	-69-
第 4 章	結論	-74-
	参考文献	-75-
	謝辞	-77-

第1章 緒論

現在、地球温暖化、ごみ問題、エネルギー問題などの環境問題が年々深刻化しているなか、いかにしてこのような環境問題を解決していくかが重要視されている。すでに全世界で様々な環境対策が行われているが、微生物機能を利用した環境対策もその一つである。一般には、生物作用は専ら有機物の分解や合成にかかわるものと考えられがちであるが、メタルバイオテクノロジーにおいて微生物は無機物である金属類に対しても多岐に渡る反応を触媒する。メタルバイオの研究・開発が進むことで、環境適合型工業生産技術（ホワイトバイオ）への適用も望めるようになる。金属類の製錬や加工は環境負荷の高いプロセスであるが、これを環境に優しいバイオプロセスで代替しグリーン化することができれば、持続産業構築への大きな貢献となる⁽¹⁾。工業分野のみでなく、不足しがちな微量金属類を健全なレベルで含む作物の育種など、農業分野で利用できる可能性もあり、安全安心で豊かな循環型社会を構築するための技術体系の一つとしてメタルバイオへの期待は大きく、今後も様々な分野での社会貢献を期待している。

近年では、Lin Yan He らの研究⁽²⁾で銅に耐性がある植物の根圏土壤中の細菌群を用いる事によって将来的に Cu 汚染された土壌の再緑化に応用できると報告している。多川らは嫌気性微生物を用いた廃水処理技術⁽³⁾によってこれまで困難であった廃水の脱色を可能とした。また、西尾らの嫌気性微生物を用いた有用物質生産や環境浄化・エネルギー回収への応用研究⁽⁴⁾ではバイオディーゼル燃料製造時に次世代のクリーンエネルギーである水素燃料およびエタノール燃料を回収できる処理法を早く実用化すべき技術として報告されている。矢木の研究⁽⁵⁾では自然の浄化力を活用するバイオレメディエーション技術を活用した土壌・地下水浄化の研究を報告し、地球環境保全の可能性を示した。LING WEI⁽⁶⁾らの研究では大腸菌、シュワネラ菌、そして枯草菌という3種類から採取した細菌株により、高効率で安定した出力を持つ発電システムを作り上げ将来の新しいエネルギーの1つになると報告している。

本研究室ではこれまで微生物の材料生成機能に着目し、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⁽⁷⁾によって発見されたもので、微生物酸化処理を行った無酸素銅板の基板の酸化被膜上に、銅結晶が析出する現象である。堀場⁽⁸⁾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⁽⁹⁾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⁽¹⁰⁾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。福島⁽¹¹⁾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。藤井⁽¹²⁾は過去の研究から試験片サイズを $15 \times 15 \text{mm}^2$ 、海水の量を 80mL、酸化処理無し、クランプ無しの条件を新たに標準試験として定めた。さらに銅イオン濃度、試験片の表面粗さを変えた実験を行い、銅イオン濃度が高く、試験片の表面を研磨することで MBD の発現が早まることを発見し表面粗さを変更することで析出箇所制御の可能性を示した。深見⁽¹³⁾は C1020-H と C1020-1/2H の析出量の違いは表面状態の影響であるとした。また、マスク板の表面粗さを小さくすると析出量が増加し、表面粗さが大きいと基板の腐食が進む傾向を観察した。さらに、試験海水の初期溶存酸素が高いと析出量が減少することを観察し、改めて嫌気性微生物が MBD に関与している事を確認した。好田⁽¹⁴⁾は材質の影響を調べるため、りん青銅と無酸素銅の比較実験を行った。表面粗さを同一にした試験では、りん青銅と無酸素銅の析出面積に明確な違いは認められず析出粒子のサイズはりん青銅の方が無酸素銅よりも大きくなることを確認した。また海水側の表面粗さを大きくしたところ、りん青銅、無酸素銅ともに析出量が少なくなりフィルタ側と同様に海水側も表面粗さが小さい方が MBD が促進されることを確認した。さらに EPMA で析出粒子を定量分析したところ、りん青銅、無酸素銅より析出した粒子はどちらも純銅であることを確認した。

そこで本研究では、MBD 生成メカニズム解明の手掛かりとするため、MBD 促進条件を探ることを目的とした。無酸素銅板を用いた MBD (バイオデポジション) において、滅菌試験での微生物作用の確認、おもりを用いた簡易クランプ法、海水側の表面粗さおよび海水接触面積の違いによる影響、設置方法の違いによる影響、pH および溶存酸素濃度、銅イオン濃度の影響、室温と析出量の関係、関与する微生物について検討した。

第2章 実験方法

2.1. 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 2.1 に示す電気伝導率計（東亜電波工業製 CM-31P）を使用した。電気伝導率セルは Electrode holder を用いて図 2.2 のように精製水中に浸して保管する。

pH および溶存酸素濃度の測定には、図 2.3 に示す pH メータ（東興化学研究所製 TPX-999i）および図 2.4 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 2.5 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 2.1 電気伝導率計の外観写真



図 2.2 Electrode holder の保管方法



図 2.3 pH メータ計の外観写真

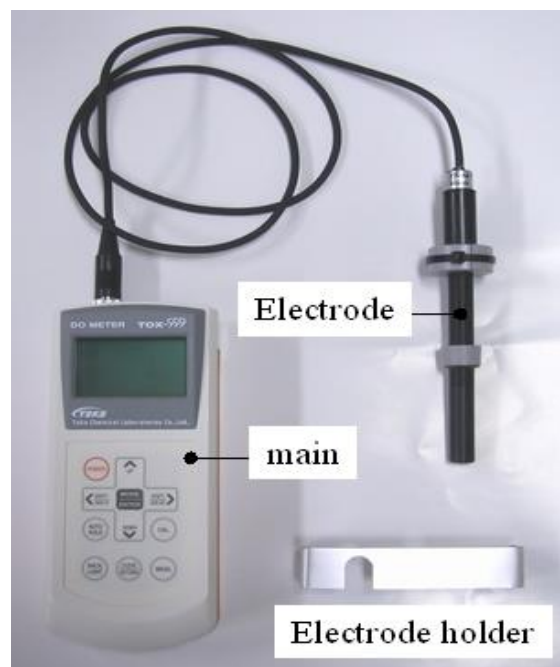


図 2.4 溶存酸素メータの外観写真

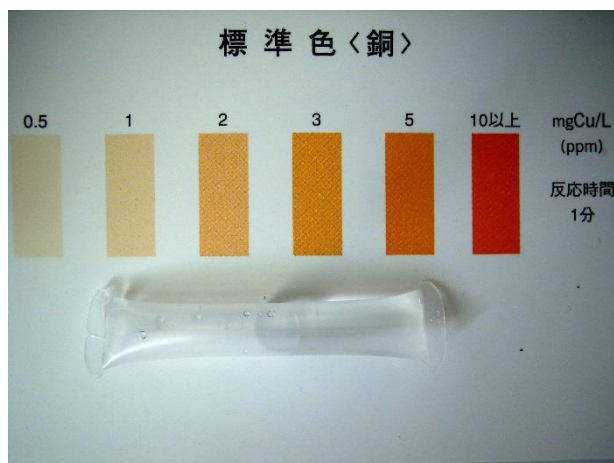


図 2.5 パックテストの外観写真

微生物および金属試験片表面の観察および分析には、図 2.6 に示す生物顕微鏡（オリンパス製 BHS-323）、図 2.7 に示す金属顕微鏡（オリンパス製 BH2-UMA）、図 2.8 および図 2.9 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 2.10 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 2.6 生物顕微鏡の外観写真



図 2.7 金属頭顕微鏡の外観写真



図 2.8 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 2.9 SEM 各部の説明図



図 2.10 表面粗さ計の外観写真

図 2.11 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。

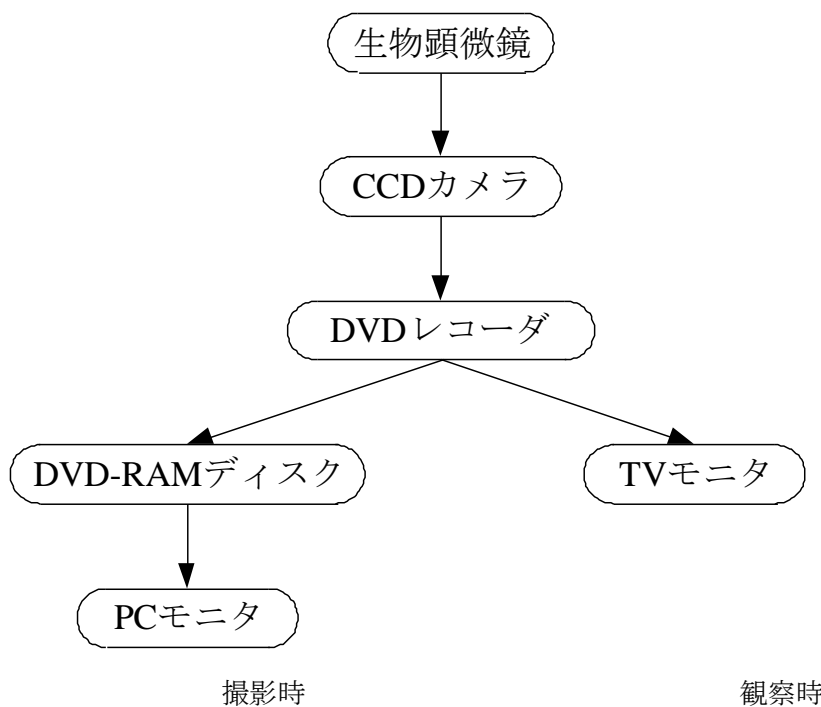


図 2.11 生物顕微鏡による観察システムの系統図

図 2.12 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。

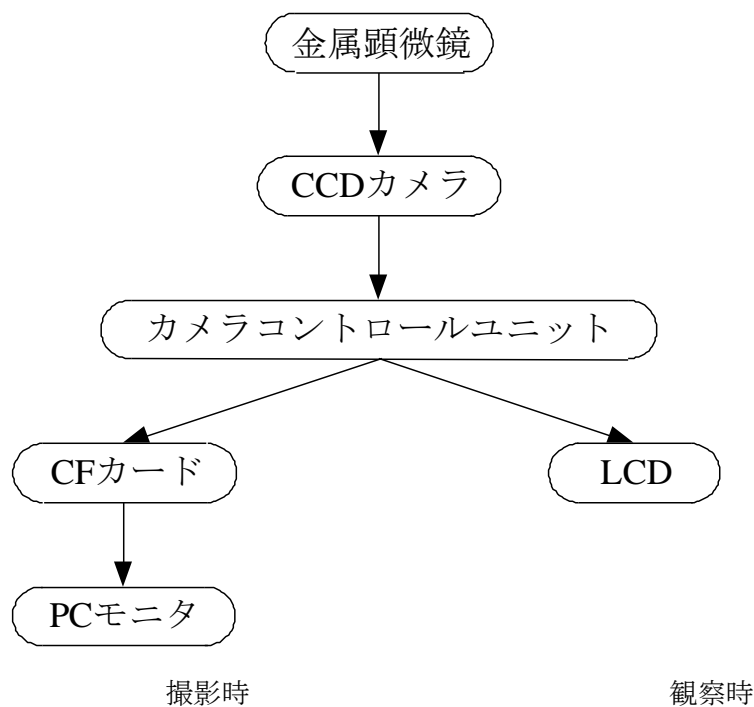


図 2.12 金属顕微鏡による観察システムの系統図

本研究で海水の成分分析のために使用した pH メータ⁽¹⁵⁾，溶存酸素メータ⁽¹⁶⁾，また微生物の観察および金属表面の測定に使用した SEM⁽¹⁷⁾，EPMA⁽¹⁸⁾，金属顕微鏡⁽¹⁹⁾，表面粗さ計⁽²⁰⁾の使用は好田に基づいて行った。

2.2 供試材および試験片

2.2.1 供試材

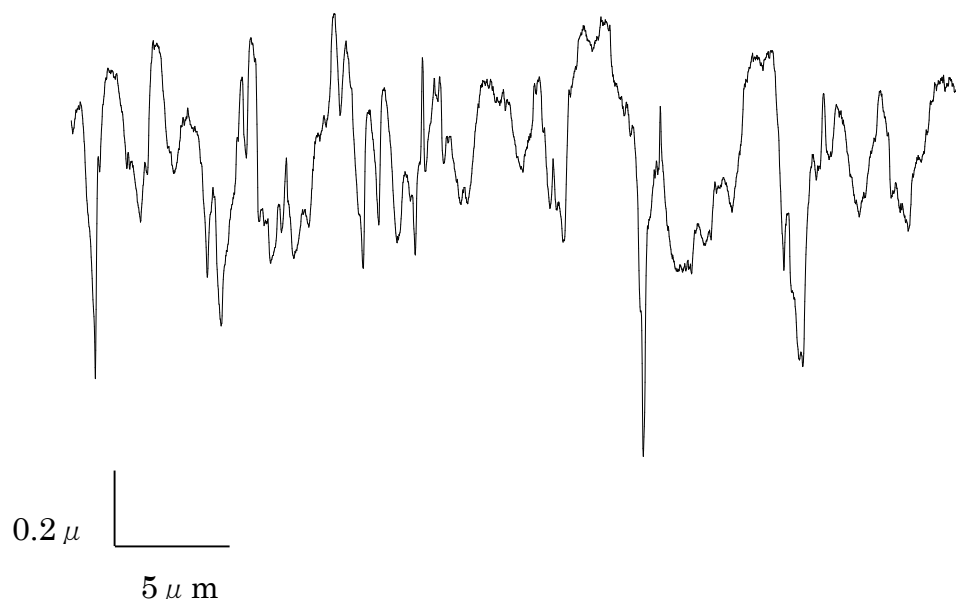
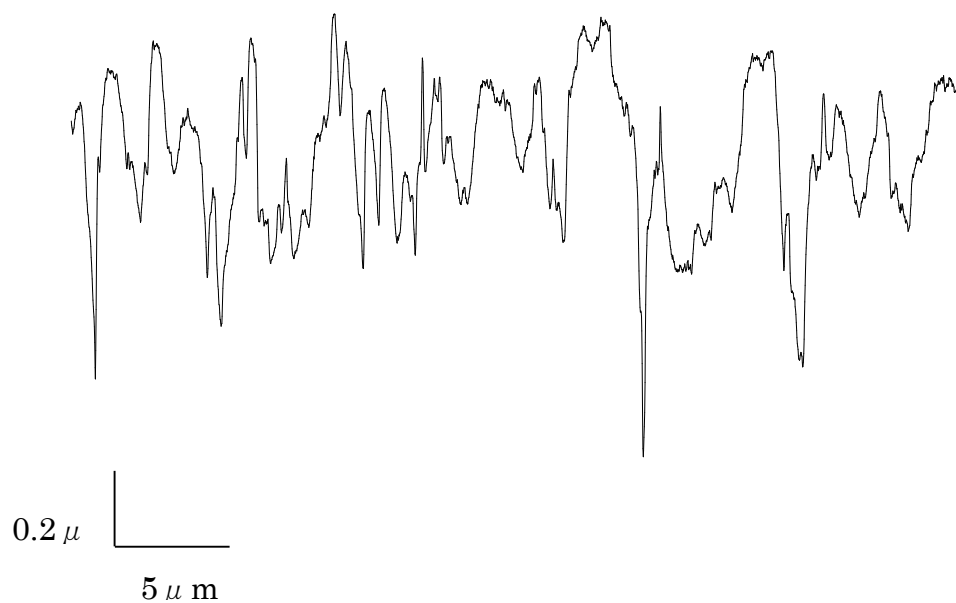
本研究で用いた材料は，市販の無酸素銅板（C1020-1/2H 材）である．無酸素銅の公称板厚は 0.8mm である．供試材の化学的性質を表 2.1 に，機械的性質を表 2.2 に示す．また，供試材の表面粗さ（圧延面）の測定結果を図 2.13，図 2.14 に示す．

表 2.1 供試材の化学的性質

成分 材質	P/%	S/%	Fe/%	Cu/%	Zn/%	Cd /%	Sn/%	Hg /%	Pb/%	others
C1020-1/2H	<3ppm	<8ppm		99.99	<1ppm	<1ppm		<1ppm	<10ppm	

表 2.2 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 R_z / μm	
			0°	90°
C1020-1/2H	253	25	0.9	1.0

図 2.13 C1020-1/2H 材の表面粗さ測定結果 (0° ; $R_z=0.9 \mu\text{m}$)図 2.14 C1020-1/2H 材の表面粗さ測定結果 (0° ; $R_z=0.9 \mu\text{m}$)

2.2.2 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。本研究で使用した試験片の寸法を図 2.15 に示す。

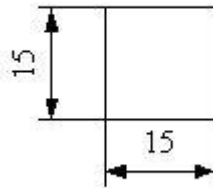


図 2.15 試験片寸法

2.3 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 2.16 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、三重県水産研究所浅海定線観測結果⁽²¹⁾ (<http://www.mpstpc.pref.mie.lg.jp/SUI/suzuka/senkaiteisen/senkaiindex.htm>) を基に 1 年の平均値を求め、これより Stephen C.Dexter⁽²²⁾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 2.3 に三重県水産研究所浅海定線観測結果（2014 年度年間平均値）を示す。



図 2.16 海水の採取場所

表 2.3 三重県水産研究所浅海定線観測結果（2014 年度年間平均値）

水温	(°C)	17.98
塩分	(‰)	29.72
DO	(ppm)	8.10
pH		8.21
COD	(ppm)	0.91
NH ₄ -N	(μ g-at. / l)	1.11
NO _{2,3} -N	(μ g-at. / l)	4.2
DIN	(μ g-at. / l)	5.2
PO ₄ -P	(μ g-at. / l)	0.4

※調査データは年度平均値，調査ポイントは地点 8，水深は水温，塩分，DO は 2m，その他は 0m.

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 2.4 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⁽²¹⁾を表 2.5 に示す.

表 2.4 海水の成分表

成分	濃度 (g/kg)
Na^+	9.14
K^+	0.33
Mg^{2+}	1.10
Ca^{2+}	0.35
Sr^{2+}	0.0068
Cl^-	16.43
Br^-	0.057
F^-	0.00085
HCO_3^-	0.12
SO_4^{2-}	2.30
B(OH)_3	0.0034

表 2.5 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

2.4 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基板上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。基板にマスク板をフィルタを介して重ね合わせ、海水中に浸漬させ嫌気性細菌を活動させることによりマスク材料を基板上に移着・析出させる。この粒子析出法の説明図を図 2.17 に示す。

今回、無酸素銅板を用いたMBD（バイオデポジション）において、簡易クランプ法、海水側における表面粗さおよび海水接触面積の違いによる影響、pH および溶存酸素濃度、銅イオン濃度の影響などについて調べた。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。

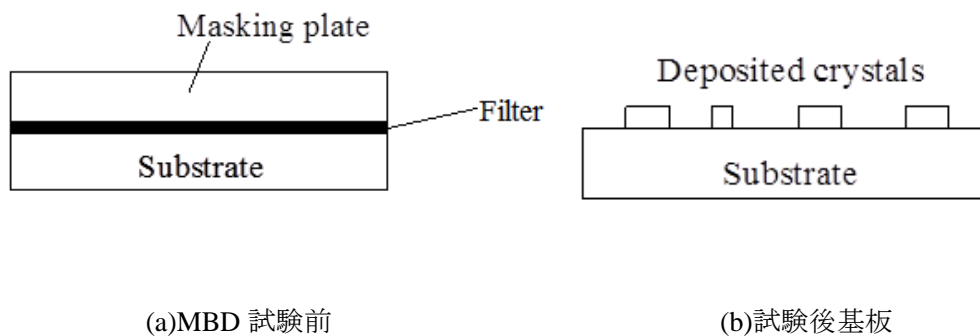


図 2.17 MBD の説明図

2.4.1 クランプ法

2.4.1.1 釣り糸によるクランプ法

試験中に基板とマスク板がずれる事がある。これを防止するために以下のクランプ法を採用した。釣り糸は YGK よつあみ社製（標準直径 0.235mm）を用いた。十字に糸をかけ、上部でこま結びを行いクランプする。この際、ズレない程度に軽く結ぶのが望ましい。図 2.18 にクランプ後の図を示す。

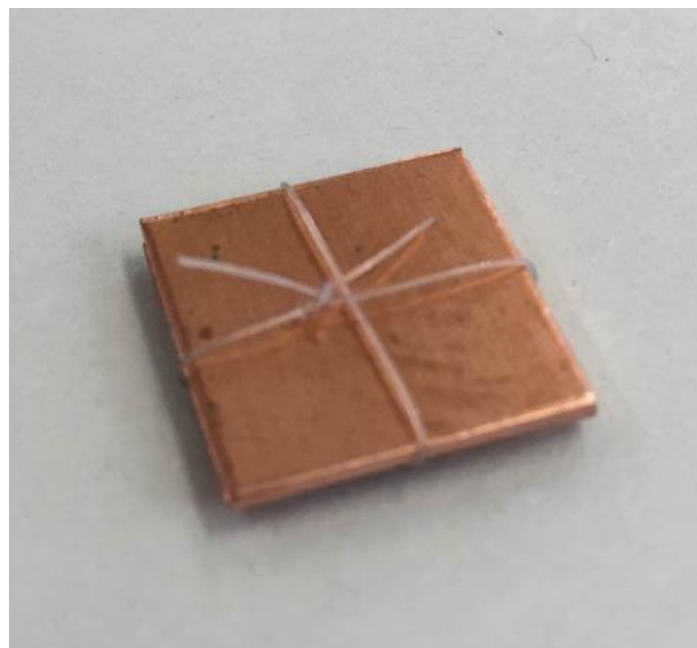


図 2.18 クランプ後の試験片

2.4.1.2 おもりによるクランプ法

さらに今回の実験では別の方法のクランプ方法を考案するためにおはじき(アーテック製, サイズ $\phi 16\text{mm} \times 3\text{mm}$, 重さ約 1.6g)によるクランプを行った。おはじきによるクランプでは予めフィルタを挟んだ試験片をビーカに入れて、ゆっくりと海水を注ぎ、その上におはじきを載せる。大きな振動がなければおはじきがずれる事はなく、基板とマスク板がずれる事もなかった。クランプ後の試験片を図 2.19 に示す。

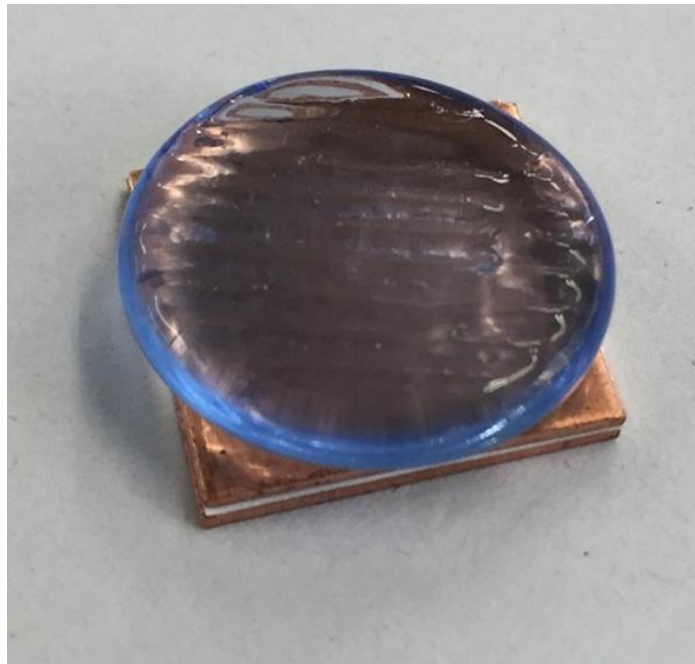


図 2.19 おもりによるクランプ後の試験片

2.4.2 試験装置

試験容器には 100mL ビーカを用いた。その中に用意した海水を 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 2.20 に示す。有菌試験・滅菌試験ではこれをタグボックス内に置いた。

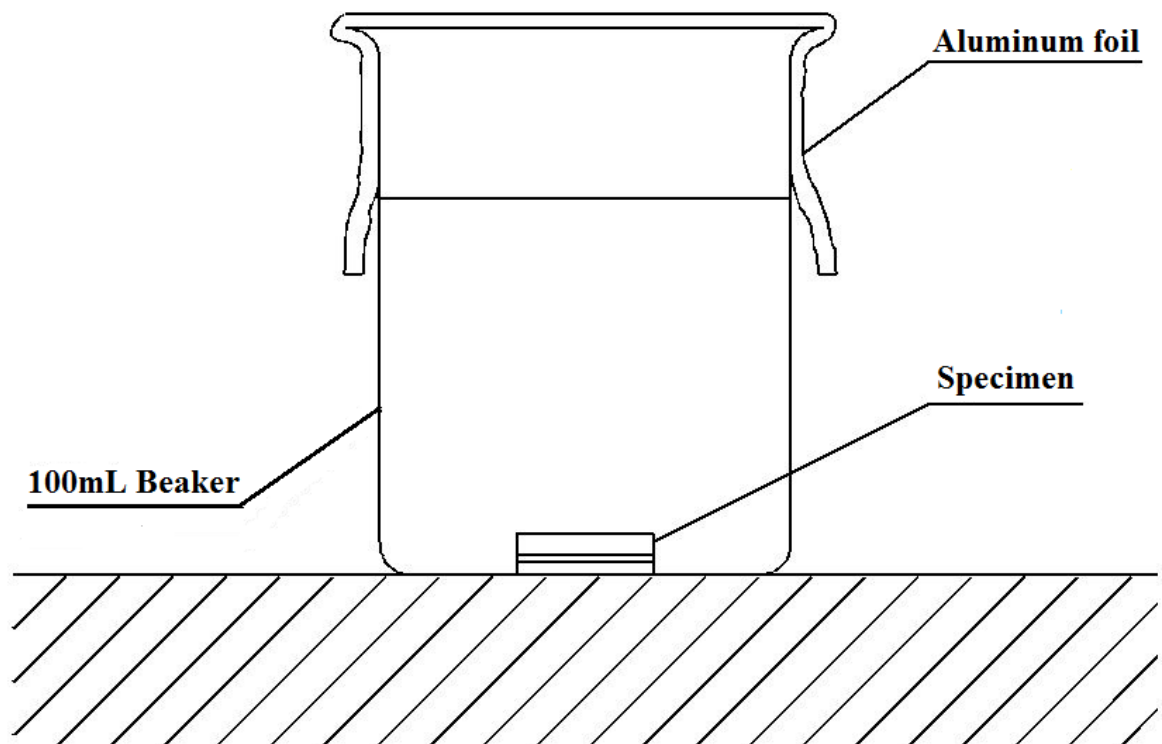


図 2.20 MBD 試験装置概略図

2.4.3 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図 2.21 に示す。

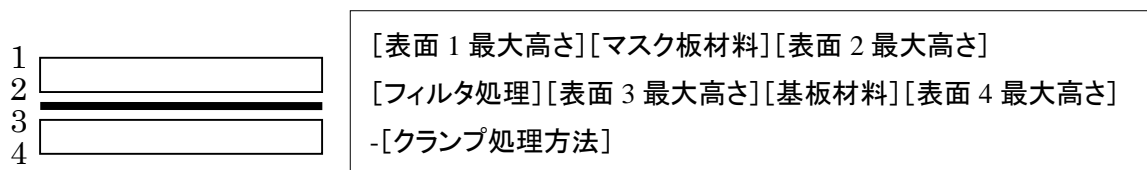


図 2.21 試験記号表記方法

(0.9/1.0) Cu1.6 F 1.6Cu (0.9/1.0) -M15p

図 2.22 試験記号概要（無酸素銅おもりによるクランプ試験の場合）

無酸素銅のおもりによるクランプ試験の場合の試験記号の例を図 2.22 に示す。

「(0.9/1.0)」は表面 1 の最大高さが 0° 方向 $R_z=0.9\mu\text{m}$ 、 90° 方向 $R_z=1.0\mu\text{m}$ の圧延面で「Cu」はマスク板材料が無酸素銅であることを示す。次の「1.6」は表面 2 の最大高さが $R_z=1.6\mu\text{m}$ の研磨面、「F」はフィルタが浸漬処理されていることを示す。次の「1.6」は表面 3 の最大高さ $R_z=1.6\mu\text{m}$ の研磨面で、「Cu」は基板材料が無酸素銅であることを示す。

「(0.9/1.0)」は表面 4 の最大高さが 0° 方向 $R_z=0.9\mu\text{m}$ 、 90° 方向 $R_z=1.0\mu\text{m}$ の圧延面であることを示す。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。「M」はおもりによるクランプを示す。試験片サイズは表記のないものは $30\times 30\text{mm}^2$ 、 $15\times 15\text{mm}^2$ の試験片を使用した試験では「15」と表記する。「p」は基板海水側の海水接触面積の影響を調べるために行っており、試験片を釣り糸 4 本の上に乗せることを示す。これらの処理条件の記号一覧を表 2.6 に示す。

表 2.6 処理条件の記号表記

	記号	意味
最大高さ (μm)	(/)	圧延面, (0° 方向/ 90° 方向)
		加工面
材料	Cu	無酸素銅
フィルタ 処理	F	フィルタ処理有
		フィルタ処理無
処理方法	CL	釣り糸によるクランプ
	M	おもりによるクランプ
	P	フィルムによる遮蔽
	15	試験片サイズ $15\times 15\text{mm}^2$
	p	釣り糸 4 本の上に乗せる
	f	試験片を浮かせる
	t	試験片を立てて浮かせる

2.4.4 試験手順

2.4.4.1 標準試験

- ① 各試験条件につき後述の研磨方法で説明するように片面を紙やすりで研磨した基板、マスク板をそれぞれ2枚用意する。これらをビーカ内に移し、99%アルコールで浸す。
- ② ビーカを超音波洗浄器（BRANSON 製 B-12）内に置き、1分間超音波洗浄する。
- ③ 十分に汚れを取るためビーカ内のアルコールを新しいものに交換し、最低3回は②を繰り返す。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く。
- ④ 海水は一度ろ紙（Whatman 製 FILTER PAPER 1）でろ過する。
- ⑤ フィルタ（MILLIPORE 社製 MEMBRANE FILTERS 0.22 μ m）を浸漬する場合は5日間有菌海水中に浸漬し、微生物処理を施す。
- ⑥ 2枚の試験片の間にフィルタを挟み、2.3.3.1のように釣り糸でクランプする。この時、研磨面がフィルタ側になるようにする。
- ⑦ 100mL ビーカに有菌海水を80mL入れ、⑥の試験片を浸漬する。
- ⑧ ビーカはタグボックス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、測定する。試験後の試験片はデシケータ内に保存する。

2.4.4.2 滅菌試験

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。本研究ではオートクレーブ（三洋電機製 MLS-2400）を使用した。滅菌条件を表 2.7 に示し、オートクレーブの外観を図 2.23 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。なおオートクレーブを用いた滅菌試験は好田⁽²³⁾に基づいた手順で行った。

表 2.7 各滅菌装置の使用条件

条件	オートクレーブ
温度(°C)	121
時間(分)	60
備考	圧力(MPa) : 約 0.12
実験器具等	海水 フィルタ 試験装置



図 2.23 オートクレーブの外観写真

2.4.4.3 おもりによるクランプ試験

標準試験の手順⑥，⑦の代わりにフィルタを挟んだ試験片をビーカーの中に入れておき，海水を静かに注ぐ，そしてピンセットでおはじき(アーテック製，サイズ $\phi 16\text{mm} \times 3\text{mm}$)を試験片の上に載せて固定する．

2.4.4.4 フィルムによる遮蔽試験

標準試験の手順⑥の際にマスク板の海水側に $15 \times 15\text{mm}^2$ に切り出したポリプロピレン製のフィルム (LIHIT LAB.製 F-78-25，サイズ： $15 \times 15\text{mm}^2$) を載せてから，釣り糸でクランプする．

2.4.4.5 クランプなし

標準試験の手順⑥の際クランプする手順を省く．

2.4.4.6 釣り糸 4 本の上へのせる

基板海水側の海水接触面積の影響を調べるためおもりによるクランプ試験およびクランプ無試験においておこなった．それぞれ手順⑦の海水を入れた直後にビーカー底に 4 本の釣り糸を並べその上に試験片をのせる．外観写真を図 2.24，図 2.25 に示す．

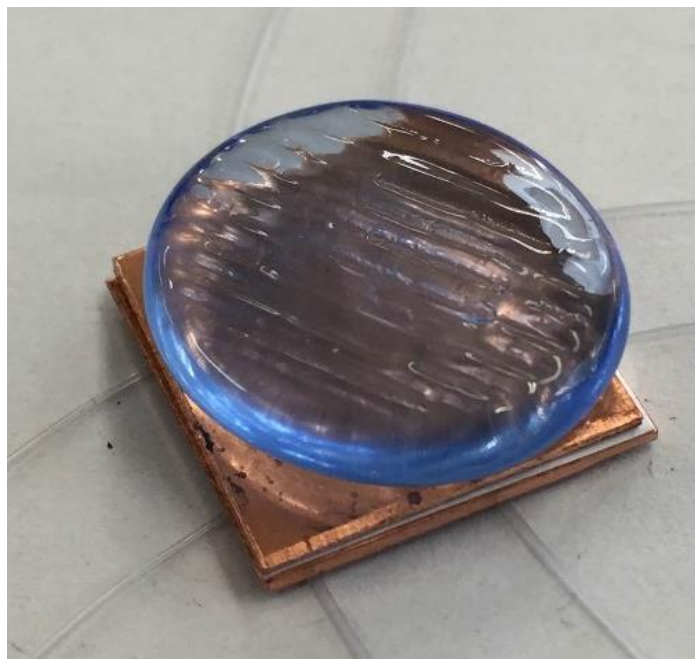


図 2.24 釣り糸 4 本の上へのせた試験片（おもりによるクランプ）

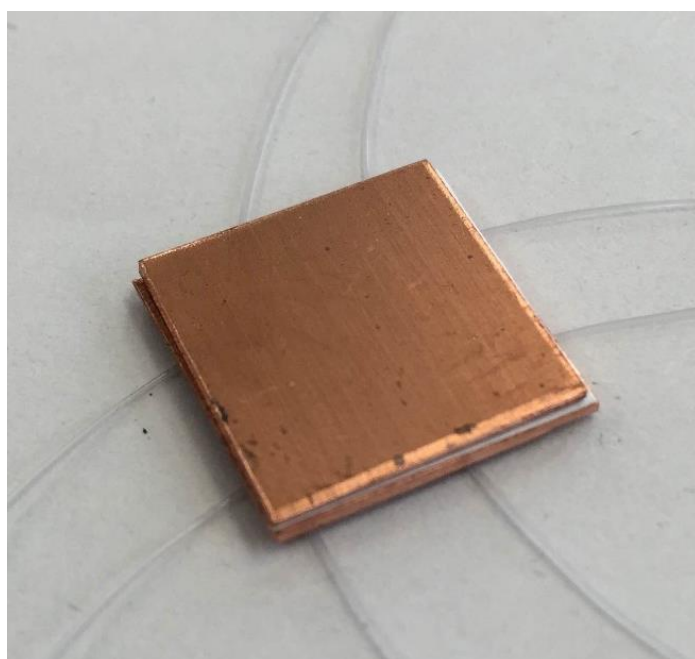


図 2.25 釣り糸 4 本の上へのせた試験片（クランプ無）

2.4.4.7 試験片を浮かせる

手順⑦の代わりに次の手順を行う。約 6.5cm にカットした竹串（やなぎプロダクツ株式会社製）をビーカーの上に橋渡しし、セロテープで固定する。手順 6 の試験片の結び目に

釣り糸を通し竹串から吊るす。この際試験片の吊るす高さをビーカー底から 2.5cm（ビーカーの目盛 50ml）に設置する。概略図を図 2.26, 図 2.27 に示す。

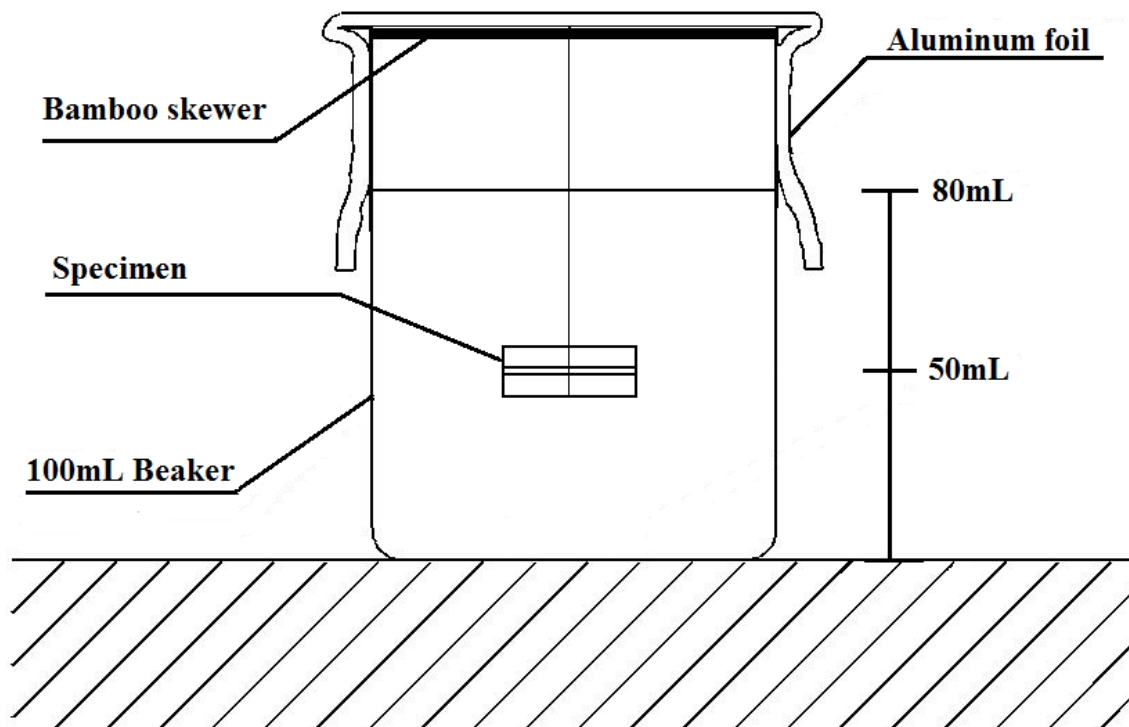


図 2.26 試験片を浮かせた試験概略図



図 2.27 試験片を浮かせた試験

2.4.4.8 試験片を立てる

上記試験片を浮かせる手順と同様だが、釣り糸を結び目ではなく試験片の側面に通すことで試験片を立てた状態で浮かせる。概略図を図 2.28, 図 2.29, 図 2.30 に示す。

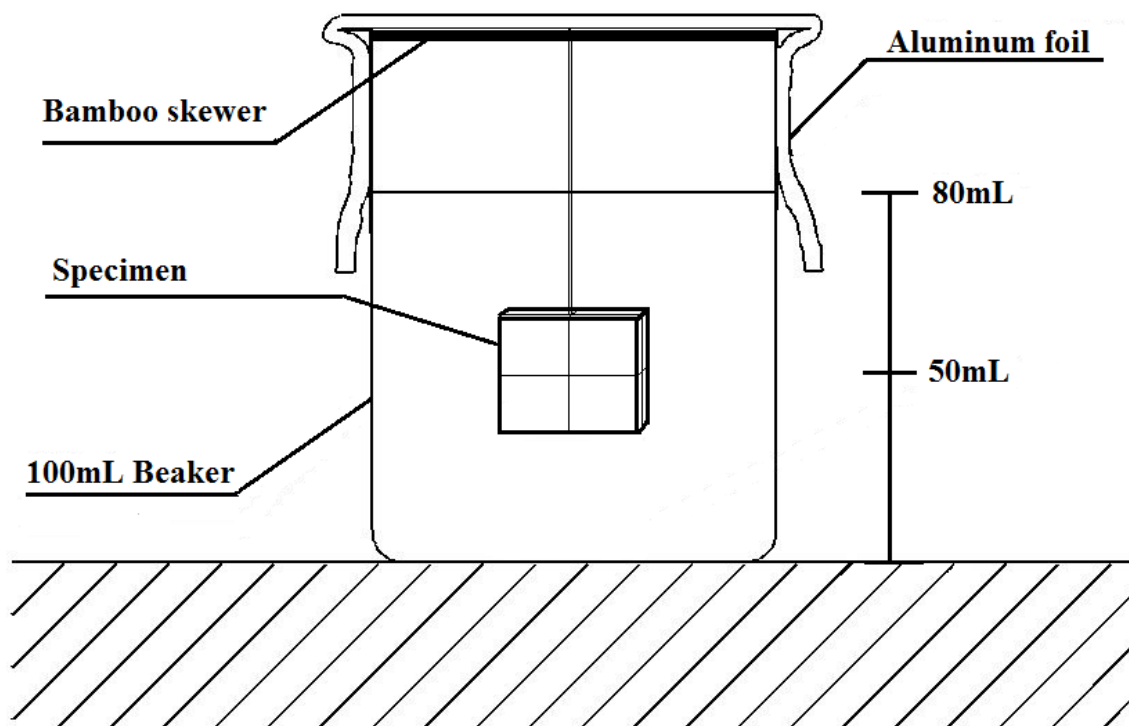


図 2.28 試験片を立てて浮かせた試験概略図



図 2.29 試験片を立てて浮かせた試験

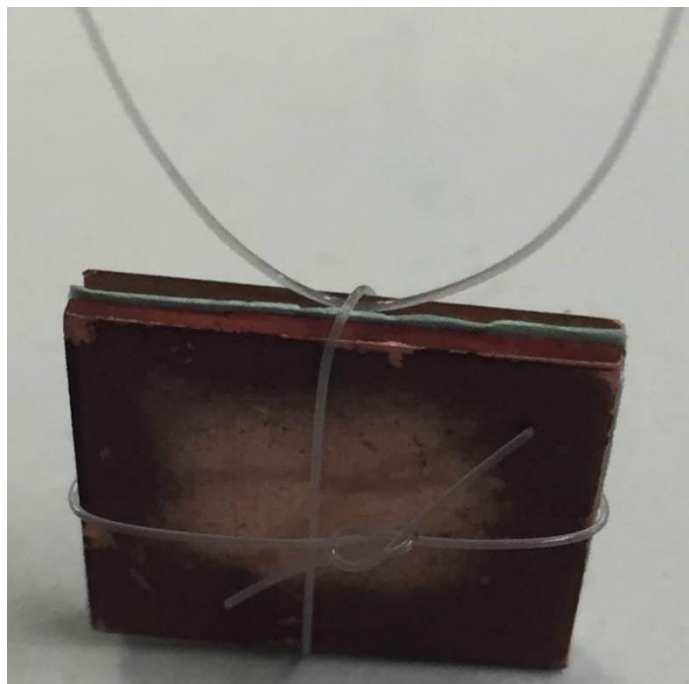


図 2.30 試験片を立てて浮かせた試験（拡大図）

2.5 研磨方法

試験片表面状態を変化させるため、試験片をサンドペーパー（P800C-Cw 耐水ペーパー）を用いて表面を研磨した。研磨の方向を一定にしないために5分間、円を描くように試験片を動かして研磨を行い、 $R_z=1.6\mu\text{m}$ に仕上げた。試験片表面の酸化を防ぐために実験直前に研磨を行った。

2.6 析出粒子評価法

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 2.31 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。金属顕微鏡像の撮影、WinROOF を用いた画像処理は好田⁽²⁴⁾に基づいて行った。取り出した試験片の析出粒子測定箇所を図 2.32 に、画像処理前と画像処理後の写真をそれぞれ図 2.33, 図 2.34 に示す。なお試験片を立てた場合、基板に加え、マスク板の測定も同条件で行い、その合計を測定値とすることとした。



図 2.31 画像処理システムの外観写真

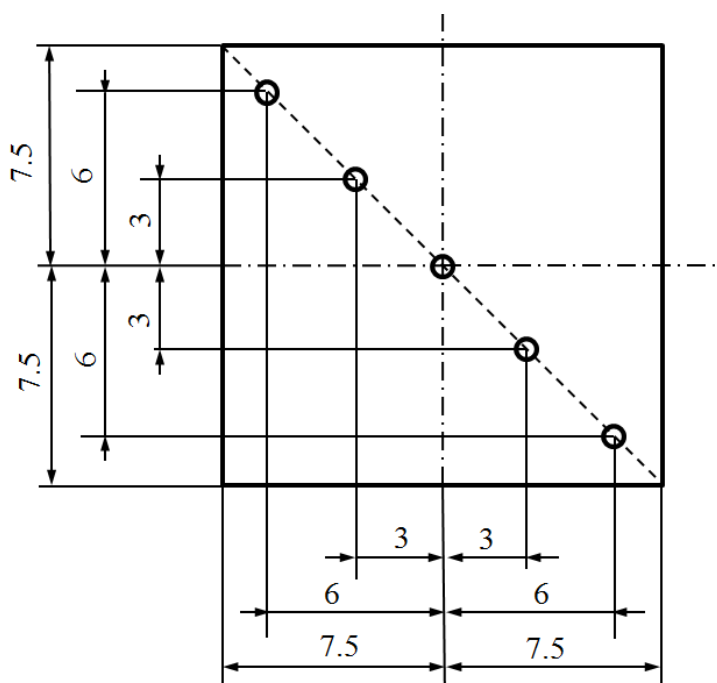


図 2.32 析出粒子測定箇所

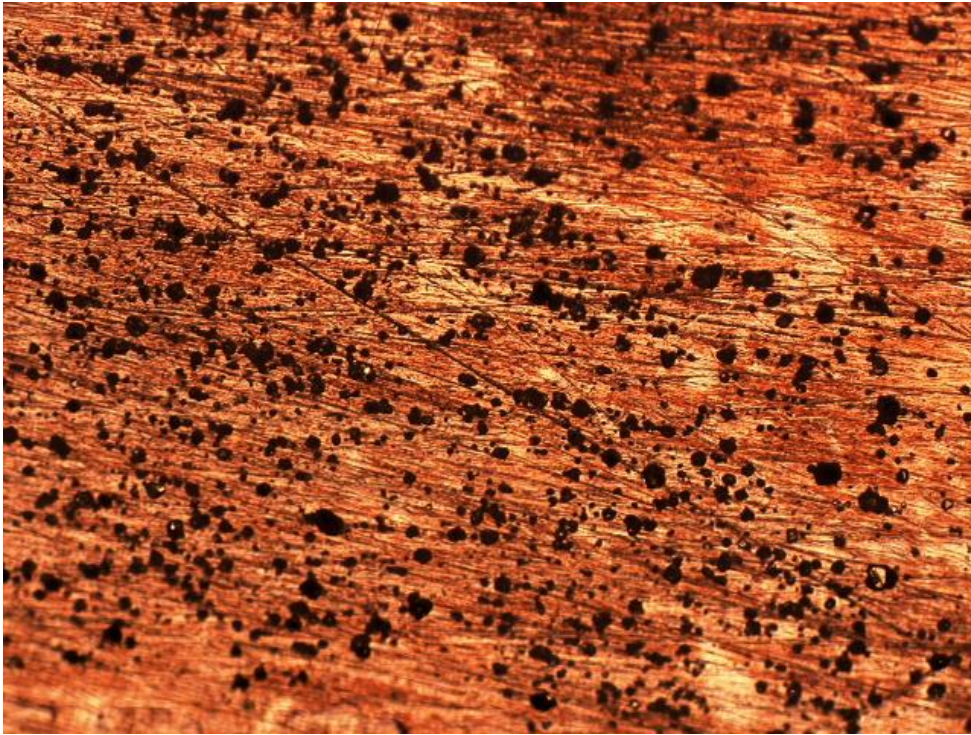


図 2.33 画像処理前（標準試験，試験期間 28 日）

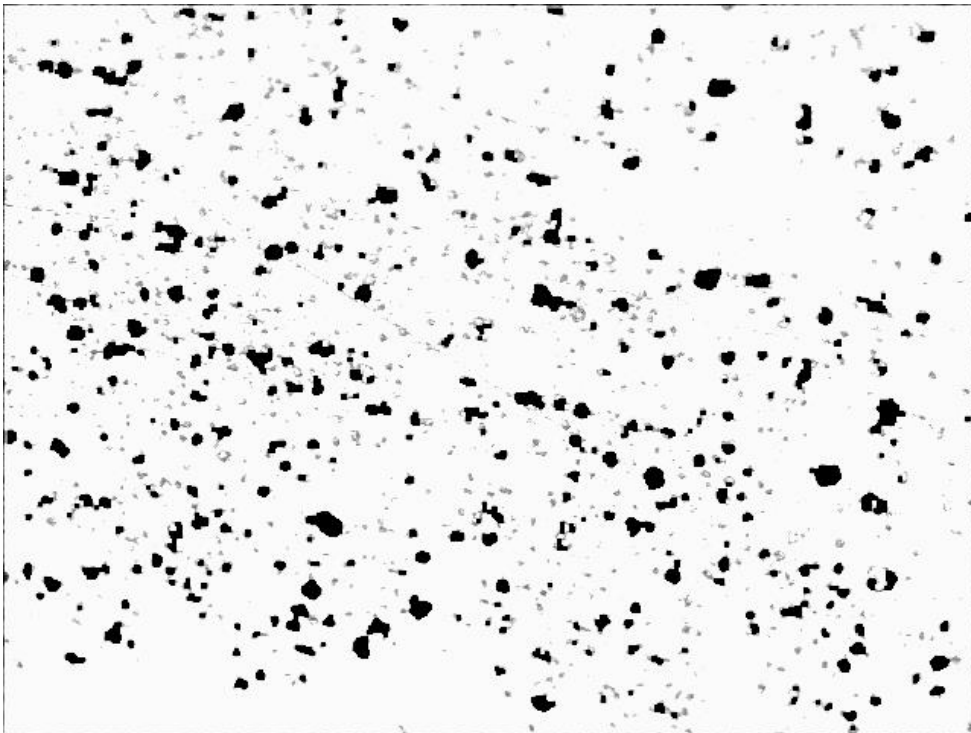


図 2.34 画像処理後（標準試験，試験期間 28 日）

第3章 実験結果および考察

3.1 滅菌試験

3.1.1 実験条件

微生物作用を確認するため、滅菌試験を行った。比較のため有菌試験も同時に行った。試験条件を表 3.1 に示す。

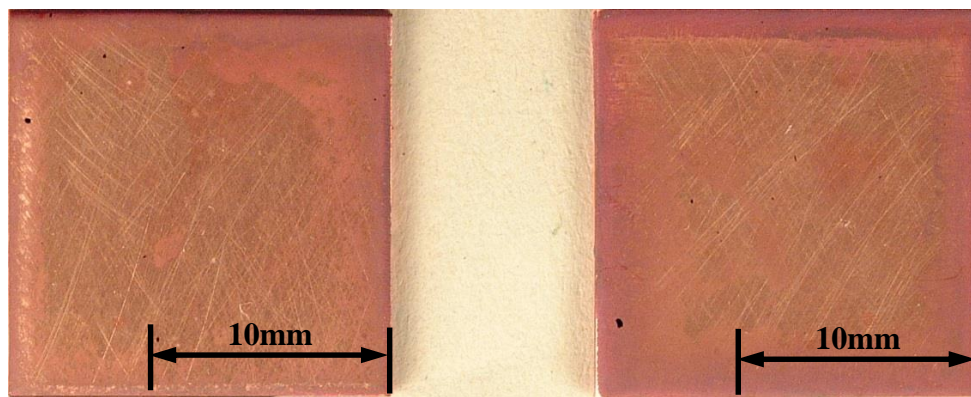
3.1.2 実験結果および考察

滅菌試験の試験後の写真を図 3.1, 有菌試験の試験後の写真を図 3.2 に示す。基板に注目すると、有菌試験では析出した粒子が確認できるが滅菌試験では確認できなかった。

図 3.3 に滅菌試験の粒子面積および粒子数を示す。2~4 週間の試験の結果、有菌試験では析出が確認されたが、滅菌試験では析出は全く見られなかった。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 3.1 滅菌試験の試験条件 (C1020-1/2H)

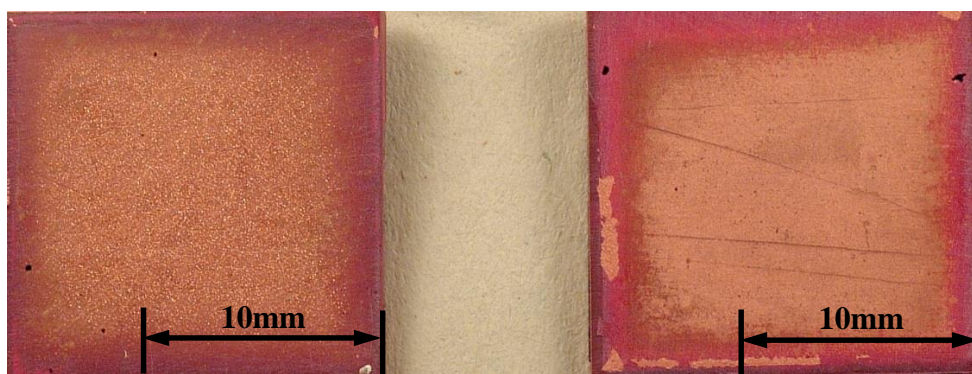
試験種別					フィルタ 処理条件			試験条件	
試験記号	試験海水	試験場所	マスク板 (海水側)	基板 (フ ィルタ 側)	枚 数	浸漬 温度	浸漬 期間	試験温度	試験 期間
			マスク板 (フィル タ側)	基板 (海 水側)					
(0.9/1.0)Cu1.6 F 1.6Cu(0.9/1.0)- CL15 With bacteria	有菌 海水	タグボッ クス内	圧延面	研磨面 $R_z=1.6$ μm	1 枚	21.5~ 22.5°C	5 日	21~ 26.5°C	2~4 週間
			研磨面 $R_z=1.6$ μm	圧延面					
(0.9/1.0)Cu1.6 F 1.6Cu(0.9/1.0)- CL15 Sterile	滅菌 海水	タグボッ クス内	圧延面	研磨面 $R_z=1.6$ μm	1 枚	21.5~ 22.5°C	5 日	21~ 26.5°C	2~4 週間
			研磨面 $R_z=1.6$ μm	圧延面					



(a) 基板

(b) マスク板

図 3.1 試験後の試験片写真（滅菌試験，試験期間 28 日）



(a) 基板

(b) マスク板

図 3.2 試験後の試験片写真（標準試験，試験期間 28 日）

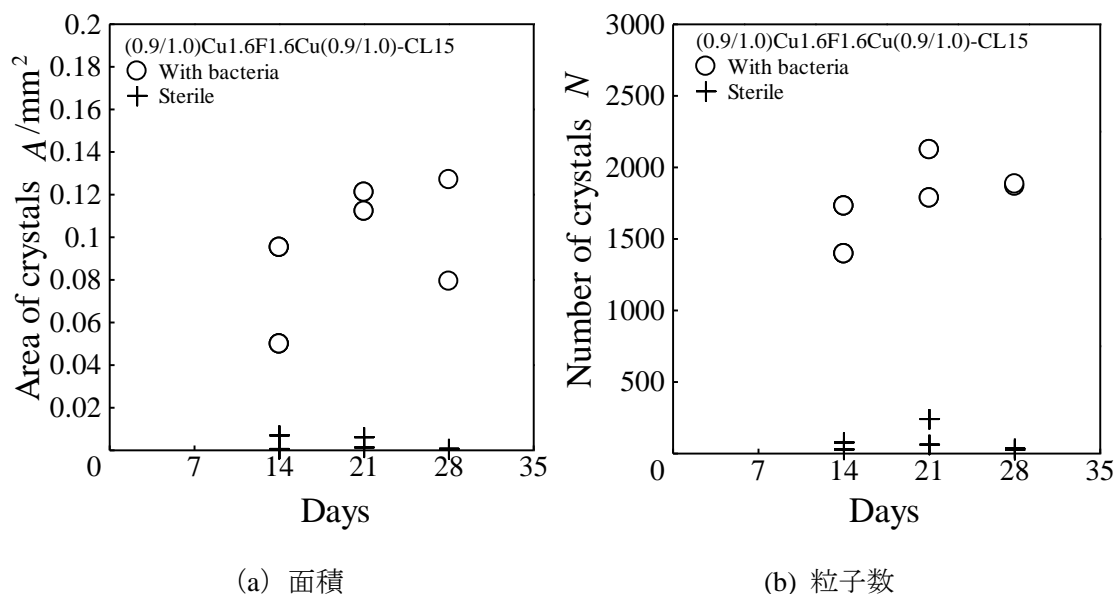


図 3.3 粒子面積および粒子数 (有菌, 滅菌)

3.2 基板, マスク板の海水側表面粗さの影響

3.2.1 実験条件

過去に行われた実験⁽²⁵⁾で基板, マスク板ともにフィルタに接している面の表面粗さが銅粒子の析出量に関与することは明らかになっており, 表面粗さが小さいほど析出量は増加することがわかっている. そこで, フィルタに接している面ではなく, 基板, マスク板の海水に接している側の表面粗さの影響を調べるために, 標準試験 (フィルタ側のみ研磨) とフィルタ側, 海水側の両面を研磨した試験を行い, 比較検討を行った. 表 3.2 に試験条件を示す.

3.2.2 実験結果および考察

海水側研磨の試験後の写真を図 3.4 に示す. 基板に析出した粒子が確認できる.

図 3.5 に 1 回目の試験で測定した粒子面積および粒子数を示す. 3 週目, 4 週目では海水側も研磨した試験は標準試験に比べて, 析出面積が小さくなっている. 粒子数では 2 週目, 4 週目で海水側も研磨した試験の方が多く, 3 週目ではほぼ同じ値を示した.

図 3.6 に 2 回目の試験で測定した粒子面積および粒子数を示す. 粒子面積ではすべての試験期間で海水側も研磨した試験の方が標準試験よりも小さくなり, どちらの試験でも試験期間が経過するごとに増加していることがわかる. 粒子数も概ね海水側も研磨した試験の方が小さくなった.

図 3.7 に 3 回目の試験で測定した粒子面積および粒子数を示す. 粒子面積, 粒子数共に海水側も研磨した試験の方が標準試験よりも小さくなった.

図 3.8 に 4 回目の試験で測定した粒子面積および粒子数を示す. この実験でも他の実験

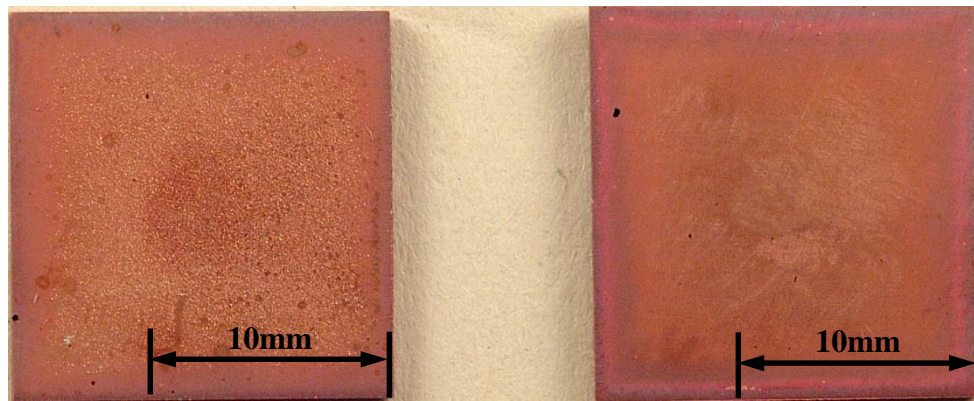
と同様の結果が見られた。

これらの結果から、基板、マスク板共に微生物処理が施してあるフィルタ側だけではなく、海水側の表面粗さも析出粒子面積に関与していることがわかった。そして、海水側も同様に表面粗さが小さい方が析出量が多くなることがわかった。

図 3.9 に粒子面積が $1\mu\text{m}^2$ 以上のサイズ A の分布を調べた結果を示す。図の縦軸は累積比率 P (A 以上の面積を有する粒子の存在割合) であり、 A および P は両対数グラフ上にプロットされている。海水側も研磨した試験は標準試験よりも析出量が少ないので 2 週目では粒子サイズも海水側も研磨した試験の方が小さいが、3 週目、4 週目では徐々に同程度の粒子サイズとなっている。

表 3.2 基板マスク板の海水側表面粗さの影響試験の試験条件 (C1020-1/2H)

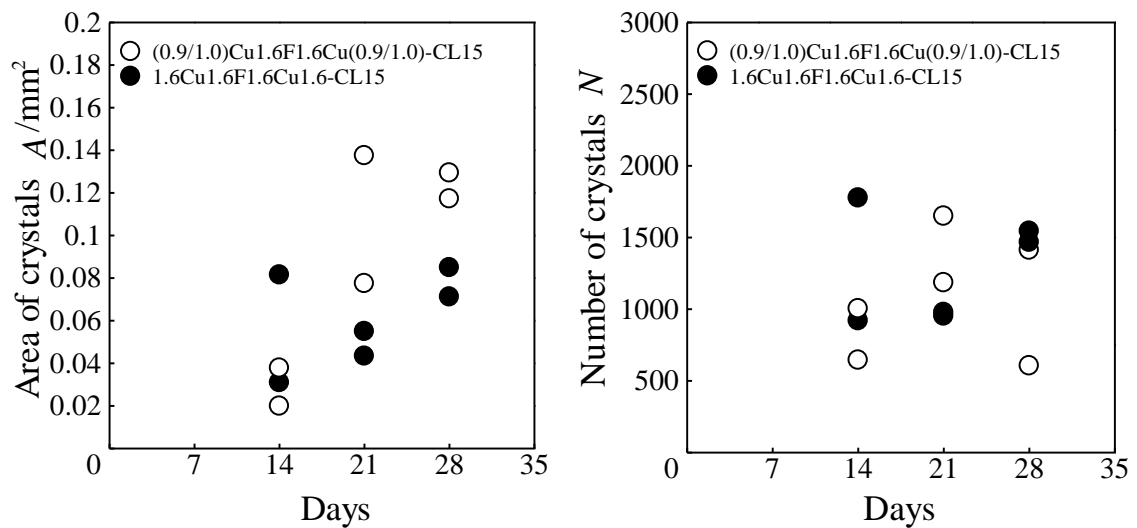
試験種別					フィルタ 処理条件			試験条件	
試験記号	試験海水	試験場所	マスク板 (海水側)	基板 (フ ィル タ側)	枚 数	浸漬 温度	浸漬 期間	試験温度	試験 期間
			マスク板 (フィル タ側)	基板 (海 水側)					
(0.9/1.0)Cu1.6 F 1.6Cu(0.9/1.0)- CL15	有菌 海水	タグボッ クス内	圧延面	研磨面 $R_z=1.6$ μm	1 枚	23.5~ 24°C	5 日	24~25°C	2~4 週間
			研磨面 $R_z=1.6$ μm	圧延面					
1.6Cu1.6 F 1.6Cu1.6 -CL15	有菌 海水	タグボッ クス内	研磨面 $R_z=1.6$ μm	研磨面 $R_z=1.6$ μm	1 枚	23.5~ 24°C	5 日	24~25°C	2~4 週間
			研磨面 $R_z=1.6$ μm	研磨面 $R_z=1.6$ μm					



(a) 基板

(b) マスク板

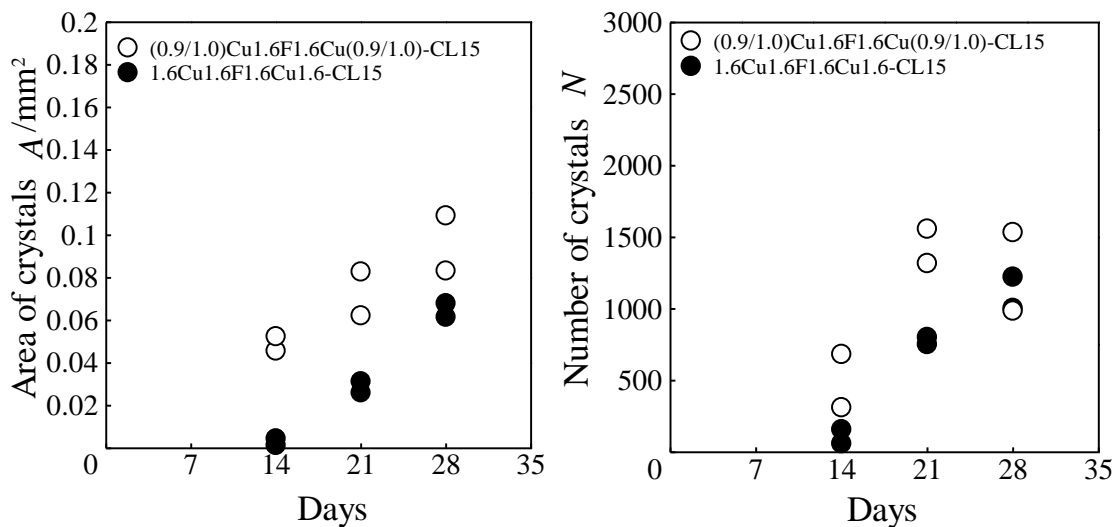
図 3.4 試験後の試験片写真（海水側研磨，試験期間 28 日）



(a) 面積

(b) 粒子数

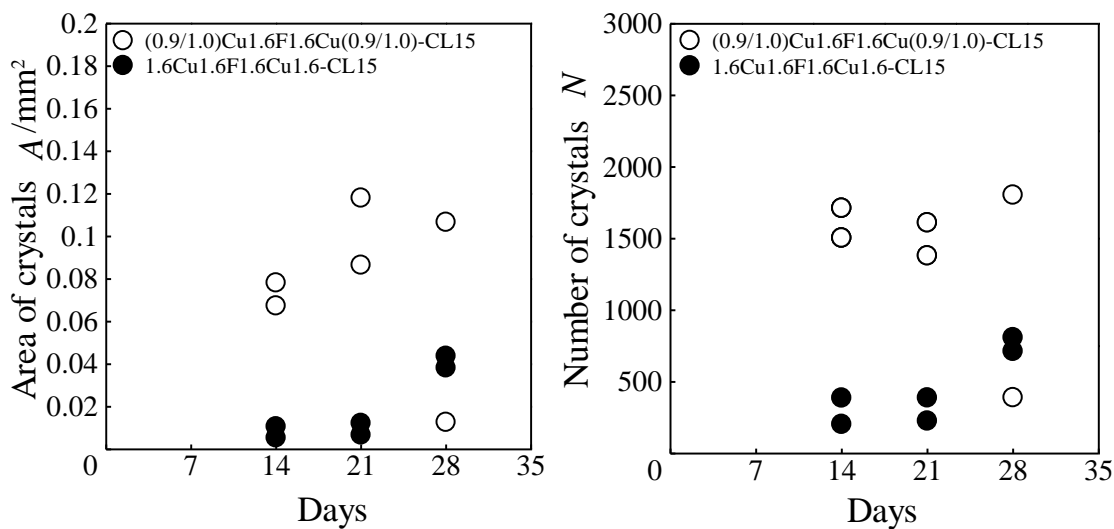
図 3.5 粒子面積および粒子数（標準，海水側研磨，1 回目）



(a) 面積

(b) 粒子数

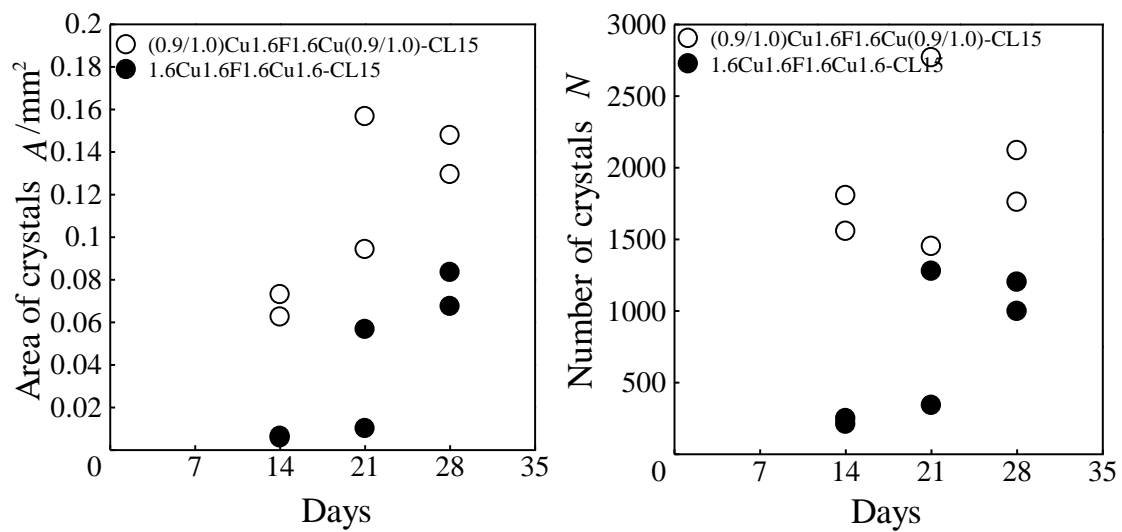
図 3.6 粒子面積および粒子数 (標準, 海水側研磨, 2 回目)



(a) 面積

(b) 粒子数

図 3.7 粒子面積および粒子数 (標準, 海水側研磨, 3 回目)



(a) 面積

(b) 粒子数

図 3.8 粒子面積および粒子数 (標準, 海水側研磨, 4 回目)

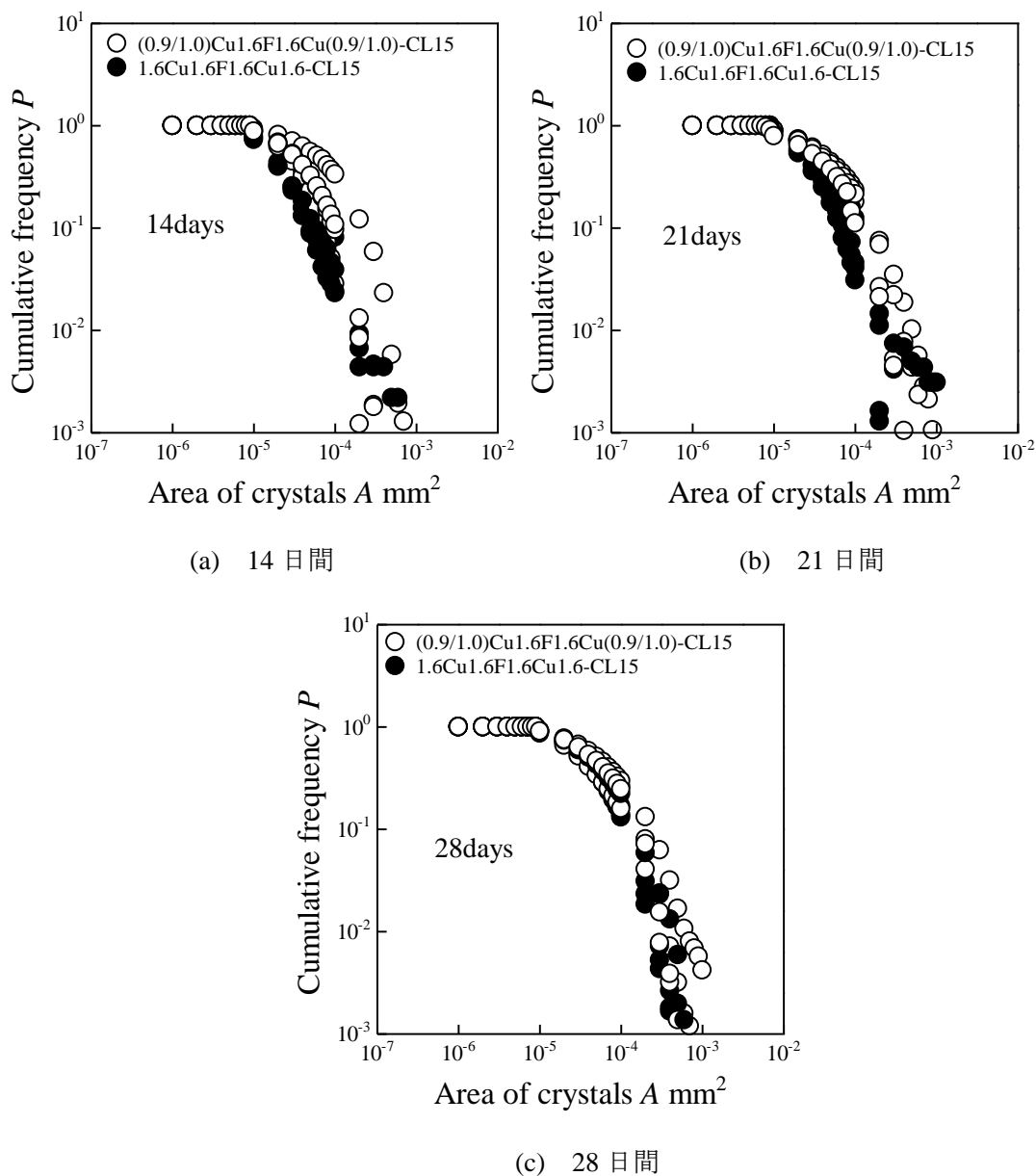


図 3.9 MBD 生成粒子のサイズ分布（標準，海水側研磨）

3.3 簡易クランプ試験

3.3.1 実験条件

これまで微生物処理をしたフィルタを試験片で挟み，釣り糸で結ぶことによって，クランプを行ってきた．その手順を簡易化するためにおもりをのせることによるクランプ方法を考案した，今回の実験ではおもりとしておはじきを使用した実験と標準試験として今まで通り釣り糸でクランプした試験を比較検討した．表 3.3 に試験条件を示す．

3.3.2 実験結果および考察

おもりによる簡易クランプ試験の試験後の写真を図 3.10 に示す。MBD が発現しなかったため基板上に析出した粒子は確認できなかった。

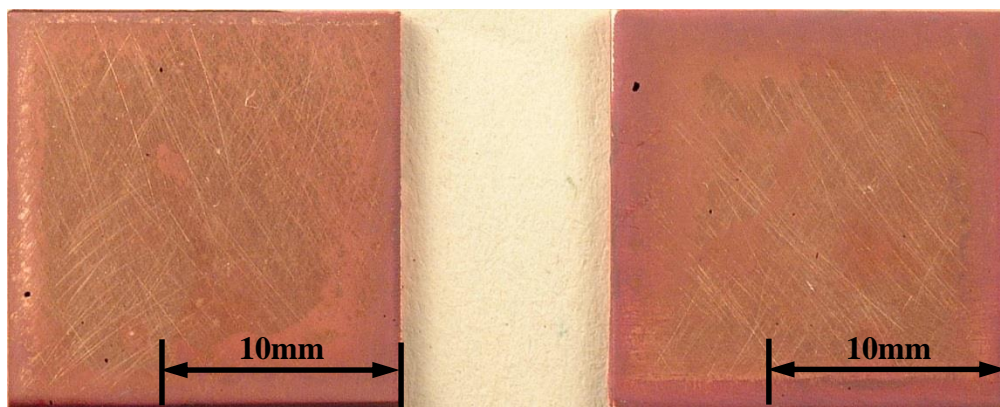
図 3.11 に 1 回目の試験で測定した粒子面積および粒子数を示す。粒子面積，粒子数から標準試験は試験期間に比例した析出が見られたが，おもりによるクランプを行った試験片には析出が全く見られなかった。

図 3.12 に 2 回目の試験の粒子面積および粒子数を示す。1 回目と同様におもりによるクランプ試験では粒子面積，粒子数において一切析出が見られなかった。

図 3.13 に 3 回目の試験の粒子面積および粒子数を示す。同様におもりによるクランプ試験では粒子面積，粒子数において一切析出が見られなかった。おもりによるクランプを行った場合，銅粒子の析出は見られないということがわかる。この原因としてはマスク板がおはじきによって遮蔽されたこと，基板海水側がビーカーによって遮蔽されたこと，おはじきのおもりによるクランプ力が強かったことなどが考えられる。

表 3.3 簡易クランプ試験の試験条件 (C1020-1/2H)

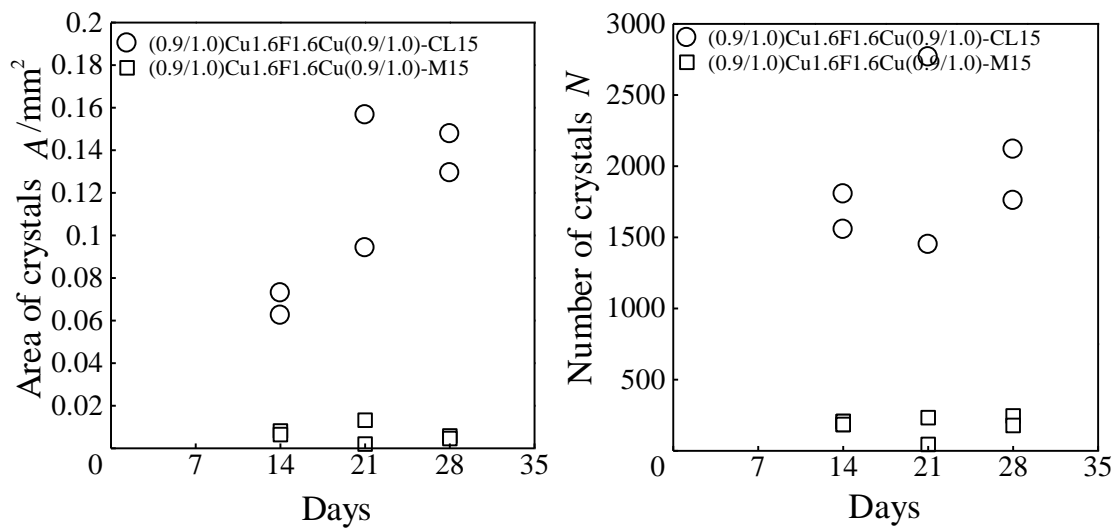
試験種別					フィルタ 処理条件			試験条件	
試験記号	試験海水	試験場所	マスク板 (海水側)	基板 (フ ィル タ 側)	枚 数	浸漬 温度	浸漬 期間	試験温度	試験 期間
			マスク板 (フィル タ側)	基板 (海 水側)					
(0.9/1.0)Cu1.6 F 1.6Cu(0.9/1.0)- CL15	有菌 海水	タグボッ クス内	圧延面	研磨面 $R_z=1.6$ μm	1 枚	23.5~ 24°C	5 日	24~25°C	2~4 週間
			研磨面 $R_z=1.6$ μm	圧延面					
(0.9/1.0)Cu1.6 F 1.6Cu(0.9/1.0)- M15	有菌 海水	タグボッ クス内	研磨面 $R_z=1.6$ μm	研磨面 $R_z=1.6$ μm	1 枚	23.5~ 24°C	5 日	24~25°C	2~4 週間
			研磨面 $R_z=1.6$ μm	研磨面 $R_z=1.6$ μm					



(a) 基板

(b) マスク板

図 3.10 試験後の試験片写真 (おもりクランプ, 試験期間 28 日)



(a) 面積

(b) 粒子数

図 3.11 子面積および粒子数 (標準, おもりクランプ, 1 回目)

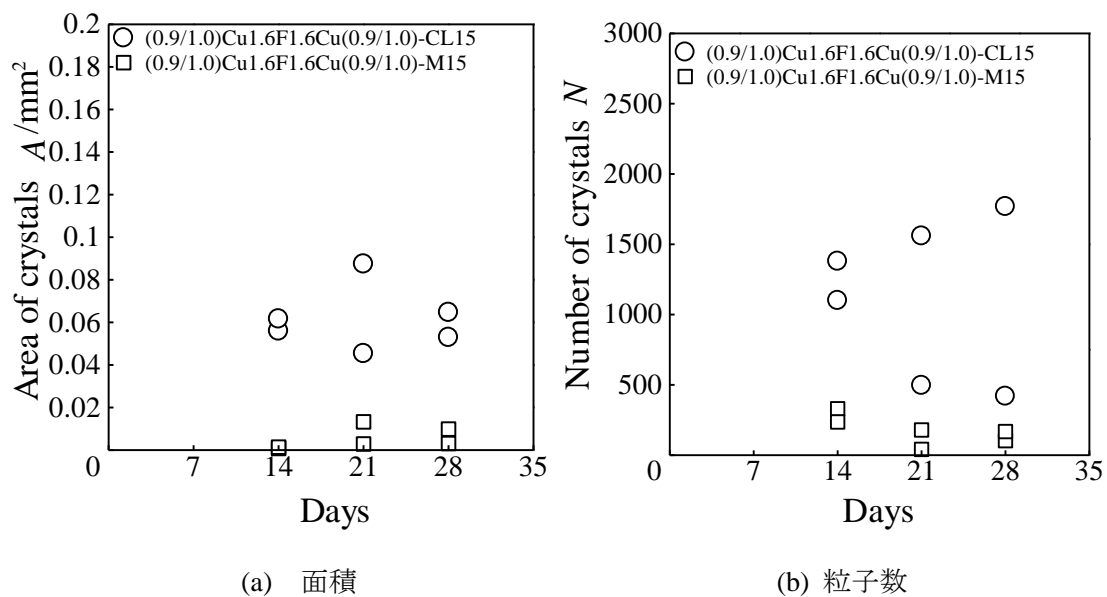


図 3.12 粒子面積および粒子数 (標準, おもりクランプ, 2回目)

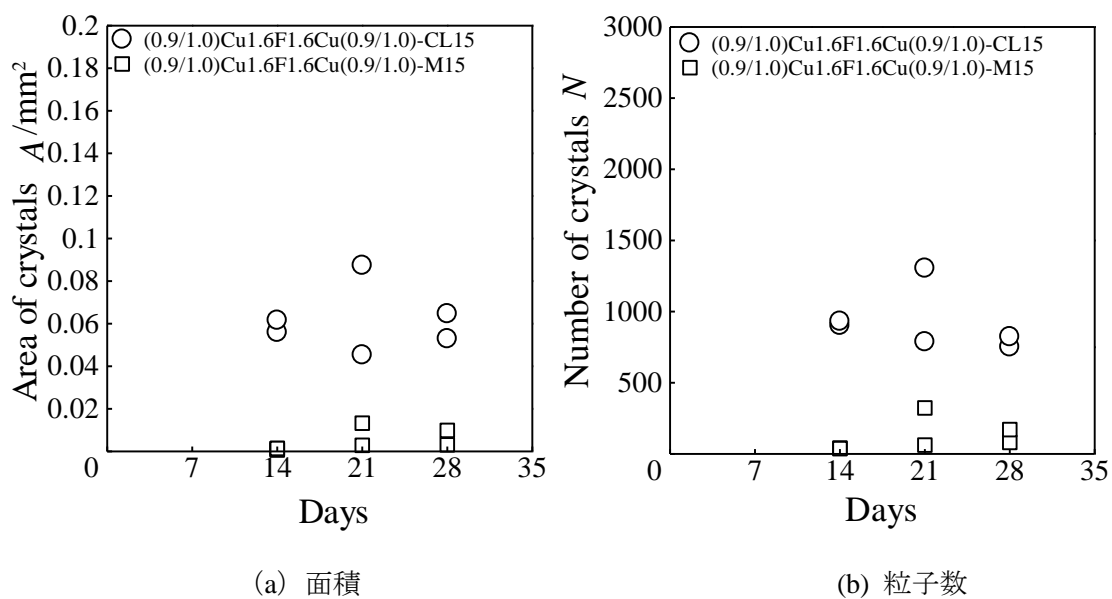


図 3.13 粒子面積および粒子数 (標準, おもりクランプ, 3回目)

3.4 フィルムによる遮蔽試験

3.4.1 実験条件

おはじきをおもりとして載せた場合, MBD が発現しなかった. この原因の一つとしてマスク板の海水側を遮蔽したことが考えられるのでマスク板の海水側をフィルムで遮蔽した

試験と標準試験を比較検討した。実験条件を表 3.4 に示す

3.4.2 実験結果および考察

フィルムによる遮蔽試験の試験後の写真を図 3.14 に示す。基板には図 3.2 の標準試験の写真と比べて少量の析出が確認できた。

図 3.15 に 1 回目の試験で測定した粒子面積および粒子数を示す。粒子面積、粒子数ともにフィルム遮蔽試験の方が標準試験より小さくなった。

図 3.16 に 2 回目の試験の粒子面積および粒子数を示す。同じく面積、粒子数ともにフィルム遮蔽試験は標準試験よりも小さくなった。

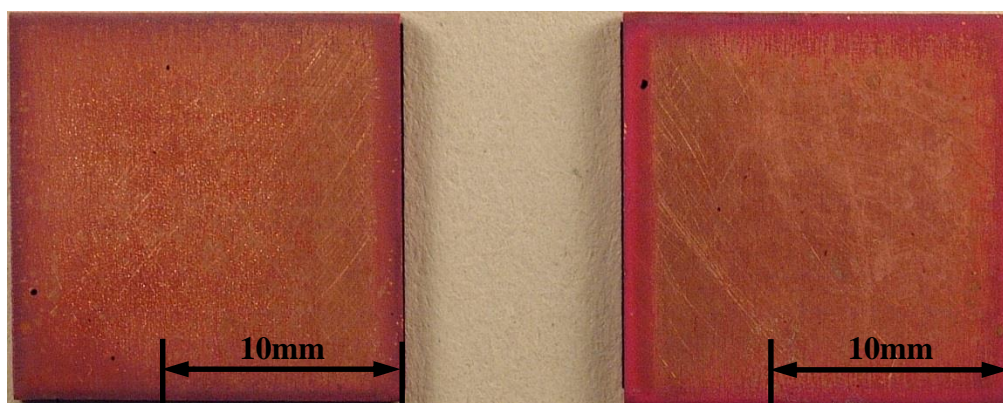
図 3.17 に 3 回目の試験の粒子面積および粒子数を示す。他の試験と同様の結果となった。

フィルム遮蔽処理を行った試験は標準試験よりも析出面積、粒子数ともに小さくなるということがわかる。おはじきのように MBD が発現しないことはなかった。よっておはじきの場合に MBD が発現しなかったのはマスク板がおはじきによって遮蔽されたことだけが原因ではないことがわかった。

図 3.18 に析出粒子のサイズ分布を示す。全ての試験期間において、標準試験とフィルム遮蔽処理を行った試験で差があまりないことがわかる。

表 3.4 マスク板の海水側をフィルムで遮蔽した試験条件 (C1020-1/2H)

試験種別				フィルタ 処理条件			試験条件		
試験記号	試験海水	試験場所	マスク板 (海水側)	基板 (フ ィル タ 側)	枚 数	浸漬 温度	浸漬 期間	試験温度	試験 期間
			マスク板 (フィル タ側)	基板 (海 水側)					
(0.9/1.0)Cu1.6 F 1.6Cu(0.9/1.0)- CL15	有菌 海水	タグボッ クス内	圧延面	研磨面 $R_z=1.6$ μm	1 枚	22~ 23°C	5 日	22~23°C	2~4 週間
			研磨面 $R_z=1.6$ μm	圧延面					
(0.9/1.0)Cu 1.6F1.6Cu (0.9/1.0)- CLP15	有菌 海水	タグボッ クス内	圧延面	研磨面 $R_z=1.6$ μm	1 枚	22~ 23°C	5 日	22~23°C	2~4 週間
			研磨面 $R_z=1.6$ μm	圧延面					



(a) 基板

(b) マスク板

図 3.14 試験後の試験片写真 (フィルム遮蔽, 試験期間 28 日)

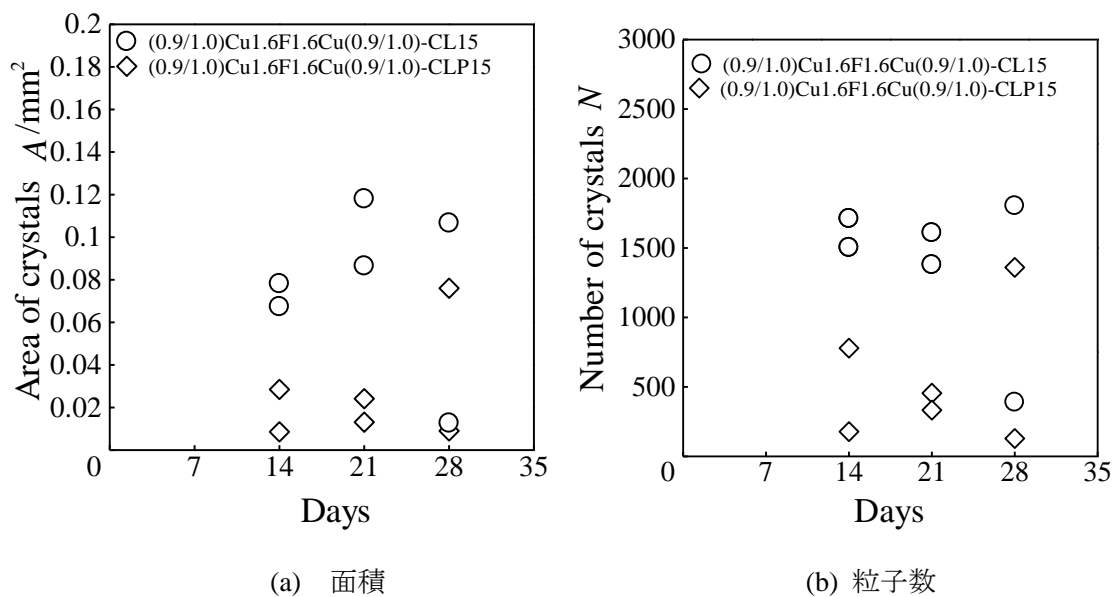


図 3.15 粒子面積および粒子数 (標準, フィルム遮蔽, 1 回目)

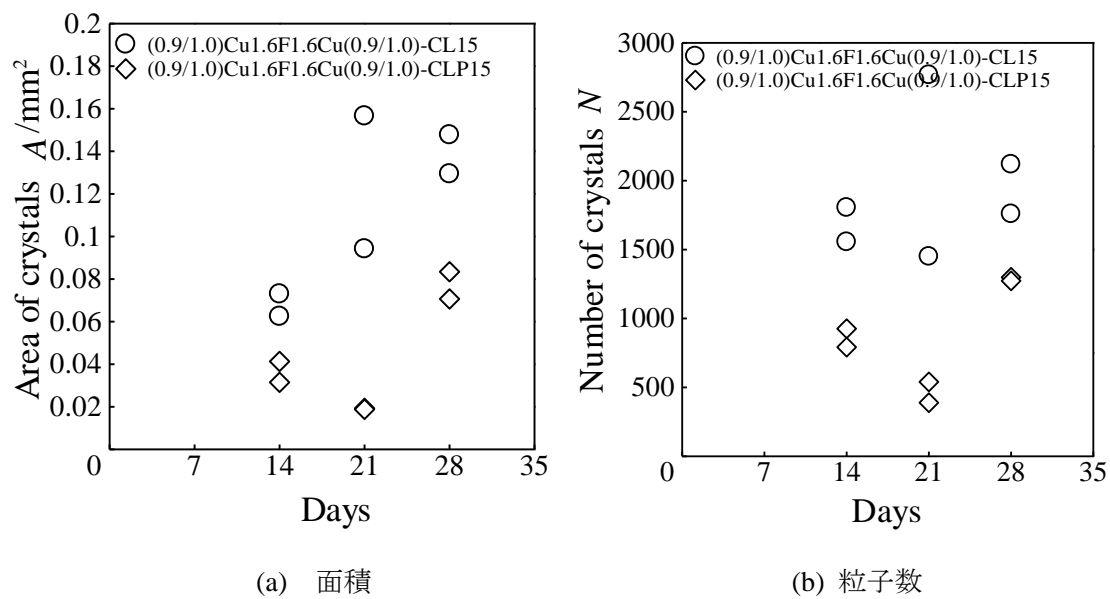


図 3.16 粒子面積および粒子数 (標準, フィルム遮蔽, 2 回目)

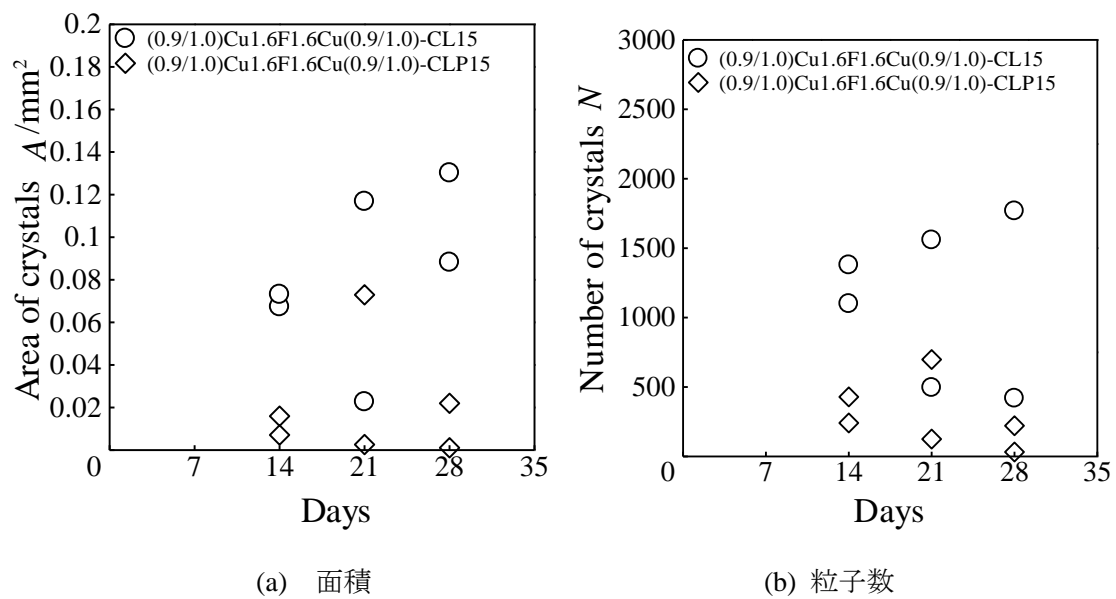


図 3.17 粒子面積および粒子数 (標準, フィルム遮蔽, 3 回目)

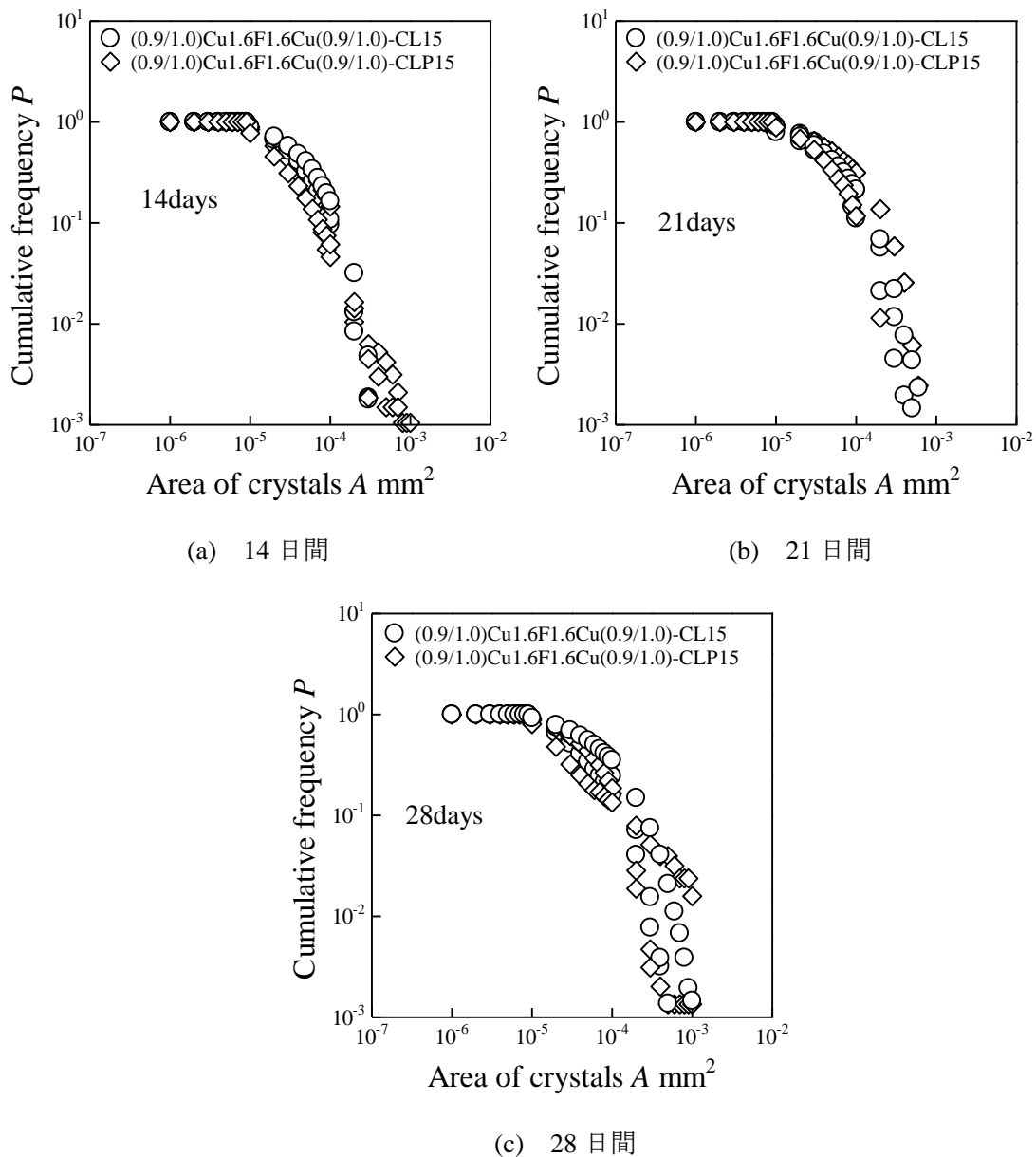


図 3.18 MBD 生成粒子のサイズ分布 (標準, フィルム遮蔽)

3.5 基板の海水接触面積の影響

3.5.1 実験条件

3.3 で述べたようにおもりを用いた簡易クランプ試験では MBD が発現しなかった。その原因として、基板海水側がビーカーによって遮蔽されたためではないかと考え、クランプを行わず試験片を釣り糸 4 本の上のせたものと直接ビーカーに接触させたものの結果を比較検討した。この実験条件を表 3.5 に示す。

3.5.2 実験結果および考察

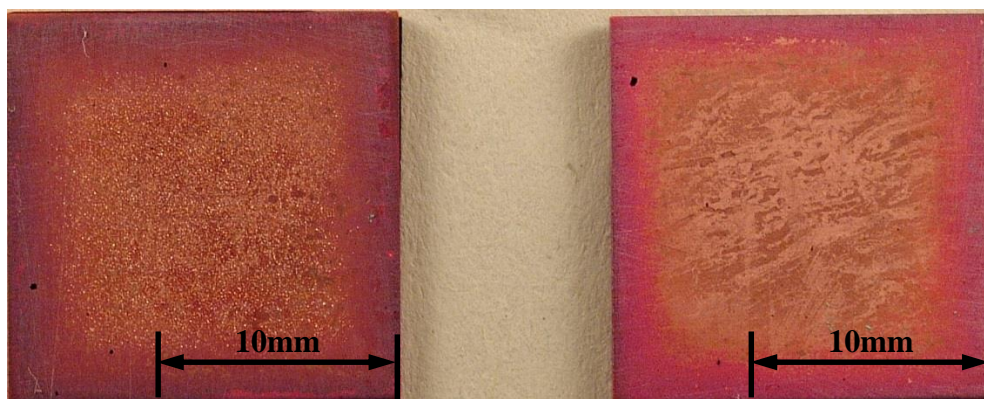
釣り糸 4 本の上ののせたもの試験後の写真を図 3.19, 釣り糸なしの試験後の写真を図 3.20 に示す. どちらの写真からも基板に析出した粒子が確認できた. より析出の多い釣り糸 4 本の上の写真の方が鮮明に粒子を確認できた.

図 3.21~図 3.23 に 1 回目~3 回目の試験で測定した粒子面積および粒子数を示す. いずれの結果でも釣り糸なしの場合は釣り糸 4 本の上の場合と比べると析出が少なくなったが, 析出は見られた. 基板の海水側の海水との接触面積が小さいと MBD が阻害されると考えられるが, 3.3 で MBD が発現しなかった大きな原因ではないと考えられる.

図 3.24 に析出粒子のサイズ分布を示す. 全ての試験期間において大きな違いはみられなかった.

表 3.5 基板の海水接触面積の影響試験条件 (C1020-1/2H)

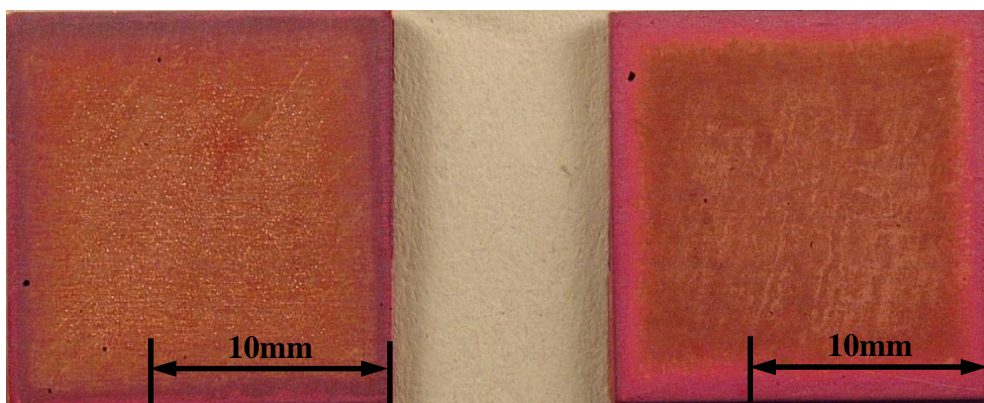
試験種別					フィルタ 処理条件			試験条件	
試験記号	試験海水	試験場所	マスク板 (海水側)	基板 (フ ィルタ 側)	枚 数	浸漬 温度	浸漬 期間	試験温度	試験 期間
			マスク板 (フィル タ側)	基板 (海 水側)					
(0.9/1.0)Cu1.6F 1.6Cu(0.9/1.0)- 15p	有菌 海水	タグボッ クス内	圧延面	研磨面 $R_z=1.6$ μm	1 枚	23~ 26°C	5 日	23~27°C	2~4 週間
			研磨面 $R_z=1.6$ μm	圧延面					
(0.9/1.0)Cu1.6F 1.6Cu(0.9/1.0)-15	有菌 海水	タグボッ クス内	圧延面	研磨面 $R_z=1.6$ μm	1 枚	23~ 26°C	5 日	23~27°C	2~4 週間
			研磨面 $R_z=1.6$ μm	圧延面					



(a) 基板

(b) マスク板

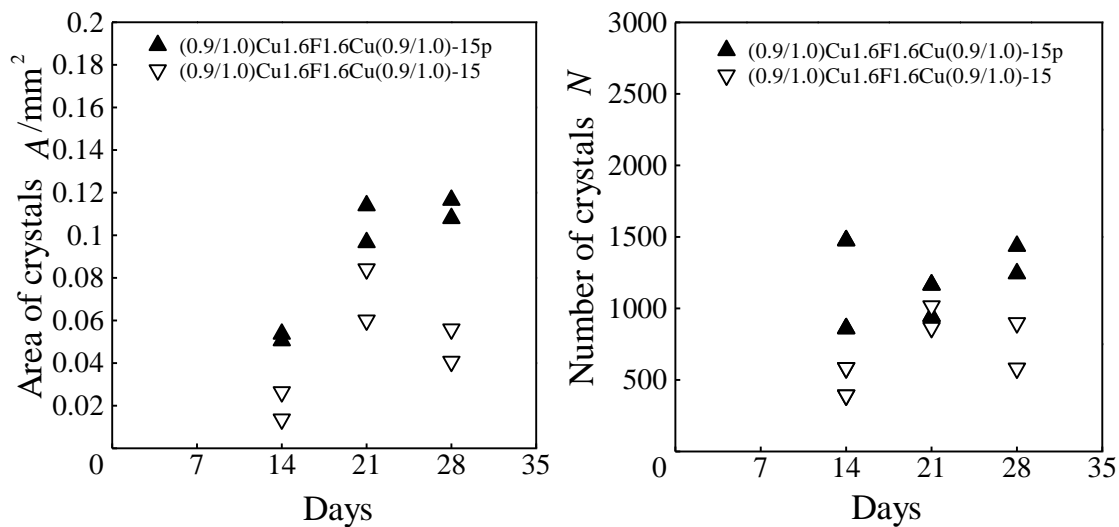
図 3.19 試験後の試験片写真（釣り糸 4 本の上，試験期間 28 日）



(a) 基板

(b) マスク板

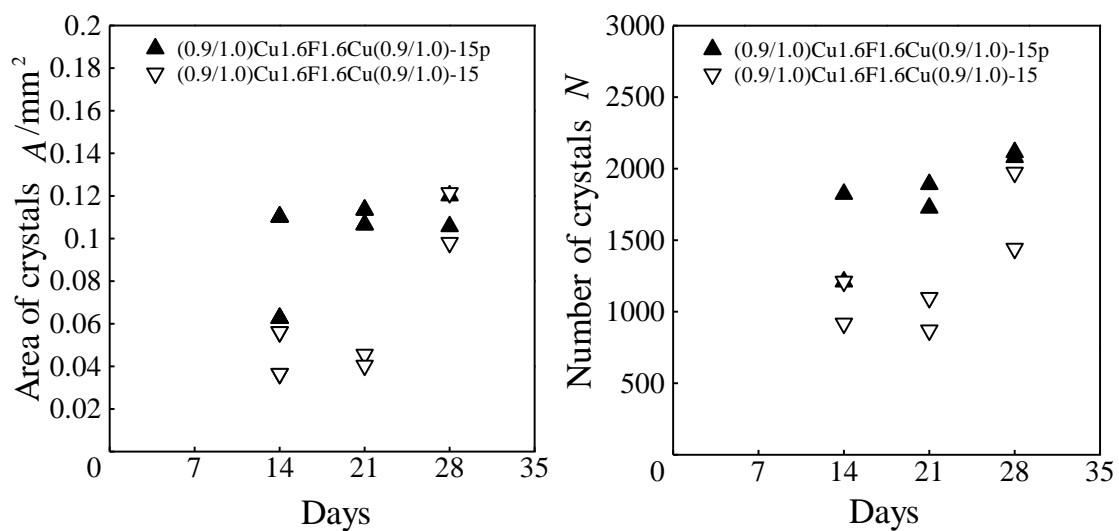
図 3.20 試験後の試験片写真（釣り糸なし，試験期間 28 日）



(a) 面積

(b) 粒子数

図 3.21 粒子面積および粒子数 (釣り糸 4 本の上, 釣り糸なし 1 回目)



(a) 面積

(b) 粒子数

図 3.22 粒子面積および粒子数 (釣り糸 4 本の上, 釣り糸なし 2 回目)

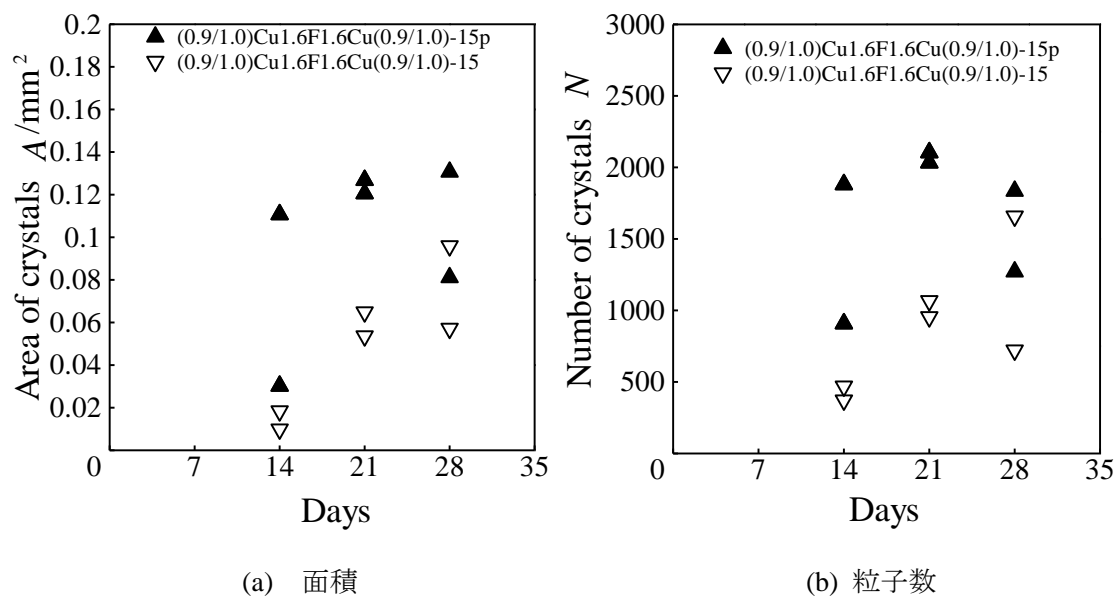


図 3.23 粒子面積および粒子数 (釣り糸 4 本の上, 釣り糸なし 3 回目)

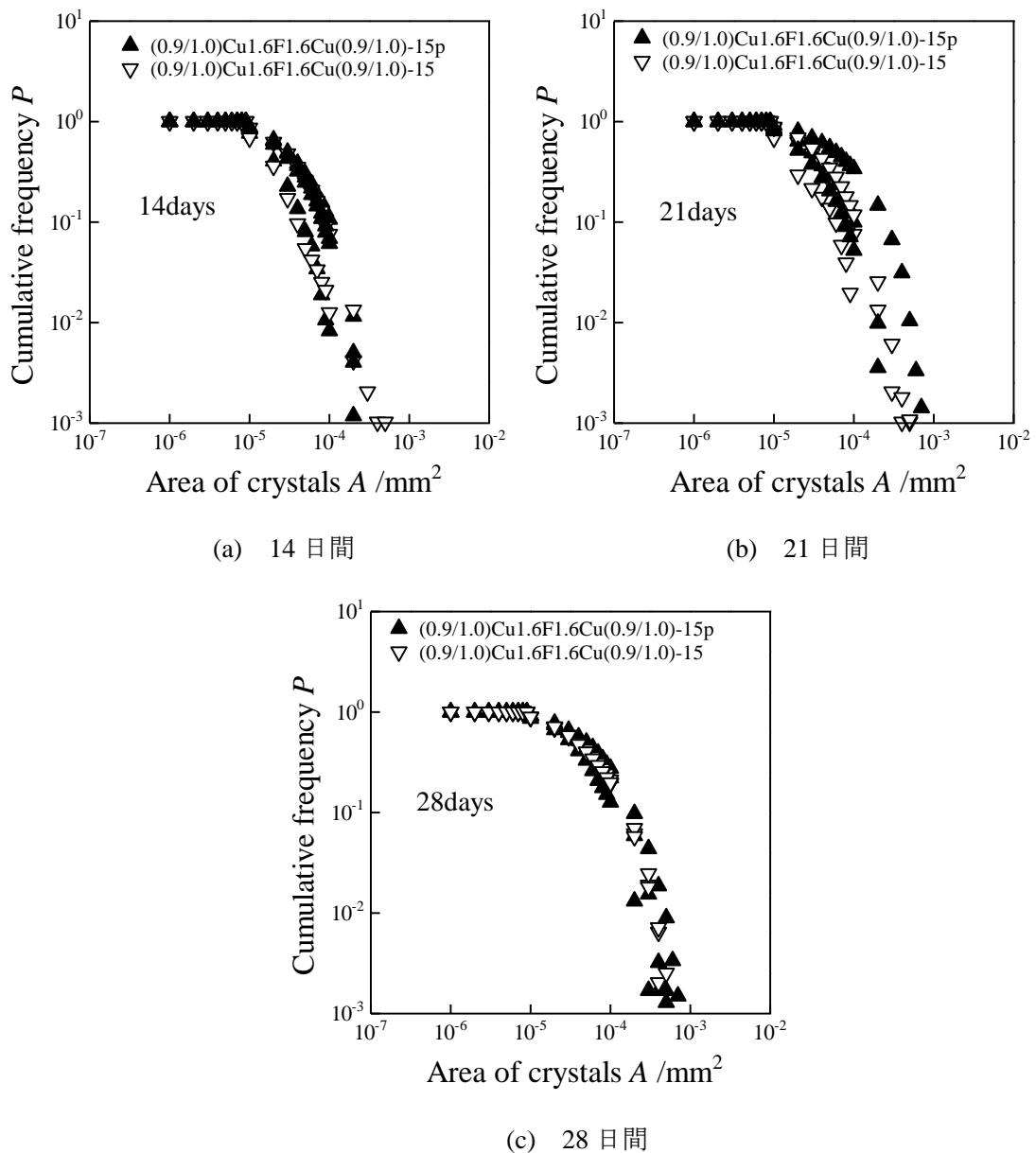


図 3.24 MBP 生成粒子のサイズ分布 (釣り糸 4 本の上, 釣り糸なし)

3.6 おもりによるクランプカの影響

3.6.1 実験条件

3.3 で MBP が発現しなかったもう一つの原因として, おもりによるクランプカの影響を考えた. そのため釣り糸 4 本の上に試験片をのせた状態でおもりによるクランプ試験, クランプなしで釣り糸 4 本の上に試験片をのせた試験, 標準試験と比較検討した. 実験条件を表 3.6 に示す.

3.6.2 実験結果および考察

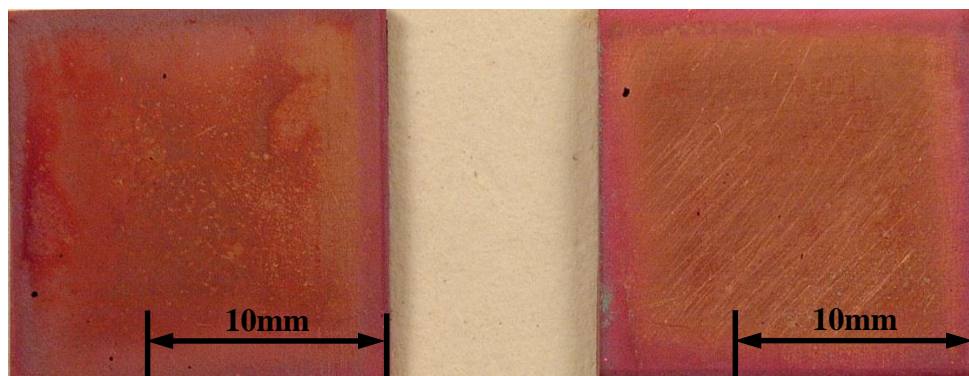
図 3.25 におもり+釣り糸 4 本の上の試験後の写真を示す。写真からは基板上に析出する粒子は確認できなかった。

図 3.26~図 3.28 に 1 回目~3 回目の試験で測定した粒子面積および粒子数を示す。おもり+釣り糸 4 本の上の試験では 3.3 の結果とは異なり、多少の析出がみられた。しかしおもりをのせなかったものと比べると明らかに析出量は少なく、おもりをを用いた実験ではクランプ力による影響が大きくおもりをを用いた実験は MBD 発現に適さないことがわかった。

図 3.29 に析出粒子のサイズ分布を示す。おもり+釣り糸 4 本の上の試験では析出量が少なくそれに伴い粒子サイズも小さくなっていることがわかる。釣り糸 4 本の上の試験では全ての試験期間において標準との大きな違いはみられなかった。

表 3.6 おもりによるクランプの影響試験の試験条件 (C1020-1/2H)

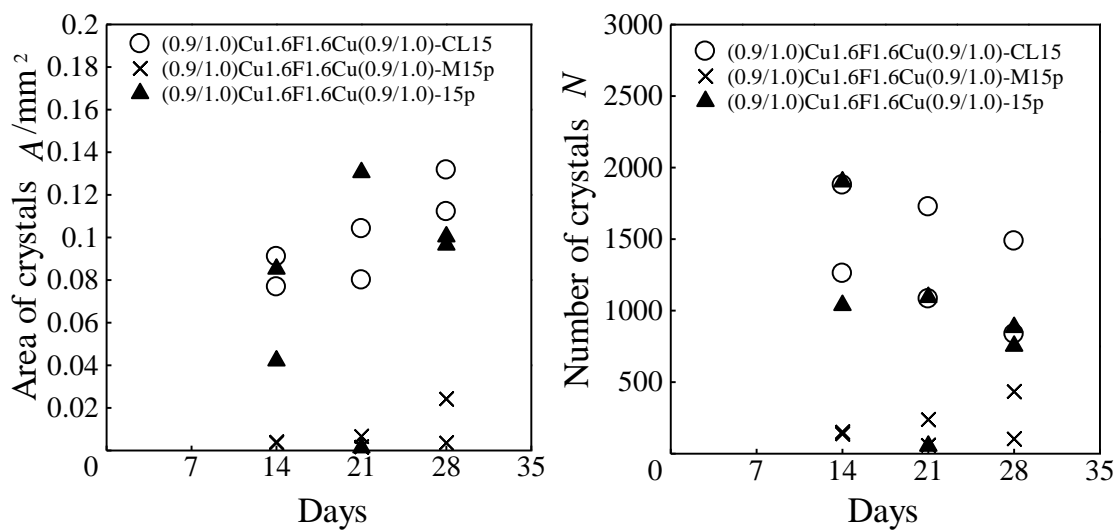
試験種別					フィルタ 処理条件			試験条件	
試験記号	試験 海水	試験 場所	マスク 板 (海水 側)	基板 (フ ィルタ 側)	枚 数	浸漬 温度	浸漬 期間	試験温度	試験 期間
			マスク 板 (フィ ルタ側)	基板 (海水 側)					
(0.9/1.0)Cu1.6F 1.6Cu(0.9/1.0)- CL15	有菌	タグボ ックス内	圧延面	研磨面 $R_z=1.6$ μm	1 枚	21~ 25.5°C	5 日	21~ 25.5°C	2~4 週 間
			研磨面 $R_z=1.6$ μm	圧延面					
(0.9/1.0)Cu1.6F 1.6Cu(0.9/1.0)- M15p	有菌	タグボ ックス内	圧延面	研磨面 $R_z=1.6$ μm	1 枚	21~ 25.5°C	5 日	21~ 25.5°C	2~4 週 間
			研磨面 $R_z=1.6$ μm	圧延面					
(0.9/1.0)Cu1.6F 1.6Cu(0.9/1.0)- 15p	有菌	タグボ ックス内	圧延面	研磨面 $R_z=1.6$ μm	1 枚	21~ 25.5°C	5 日	21~25.5	2~4 週 間
			研磨面 $R_z=1.6$ μm	圧延面					



(a) 基板

(b) マスク板

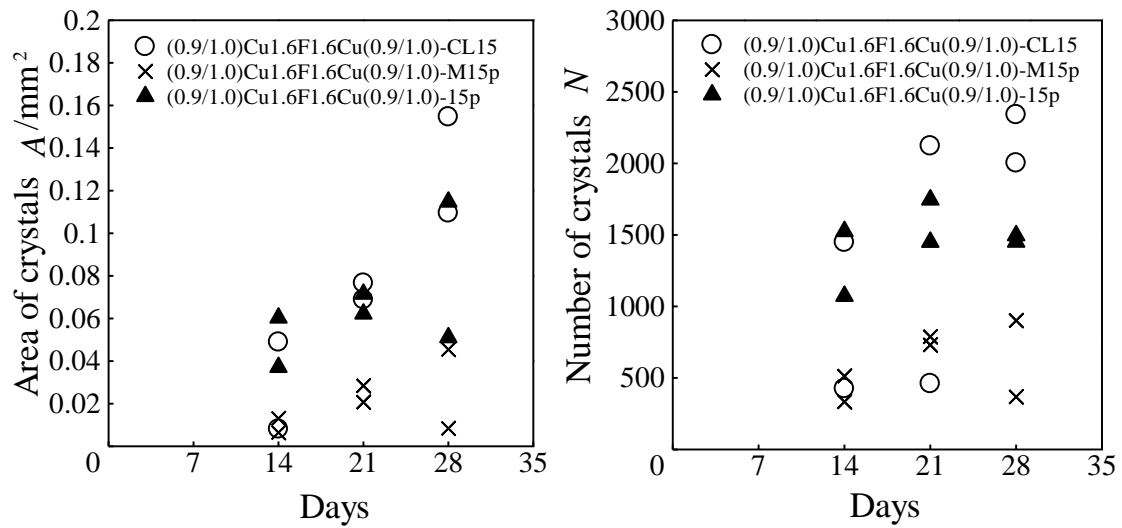
図 3.25 試験後の試験片写真 (おもり+釣り糸 4 本の上, 試験期間 28 日)



(a) 面積

(b) 粒子数

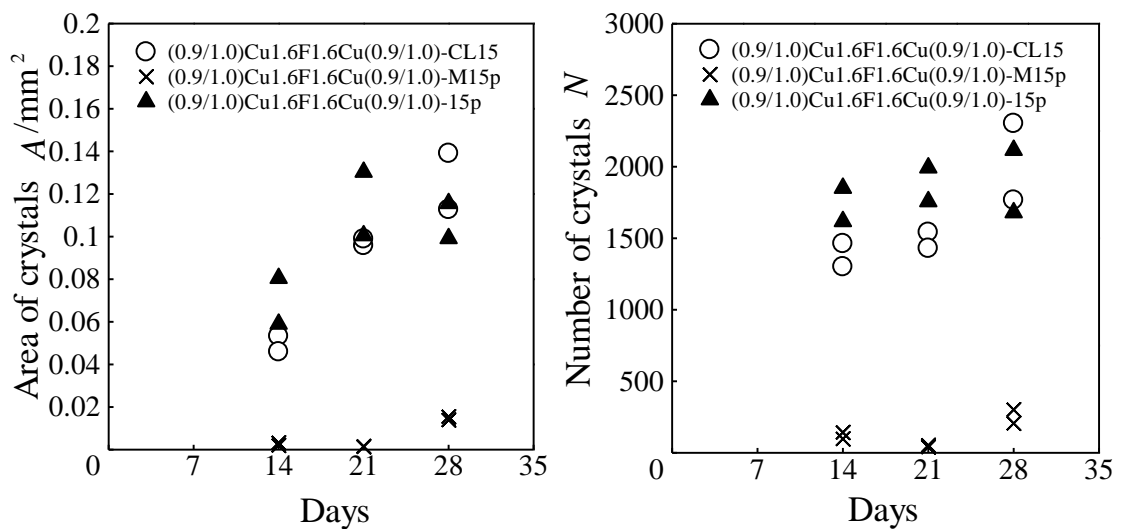
図 3.26 粒子面積および粒子数 (標準, おもり+釣り糸 4 本の上, 釣り糸 4 本の上 1 回目)



(a) 面積

(b) 粒子数

図 3.27 粒子面積および粒子数 (標準, おもり+釣り糸 4 本の上, 釣り糸 4 本の上 2 回目)



(a) 面積

(b) 粒子数

図 3.28 粒子面積および粒子数 (標準, おもり+釣り糸 4 本の上, 釣り糸 4 本の上 3 回目)

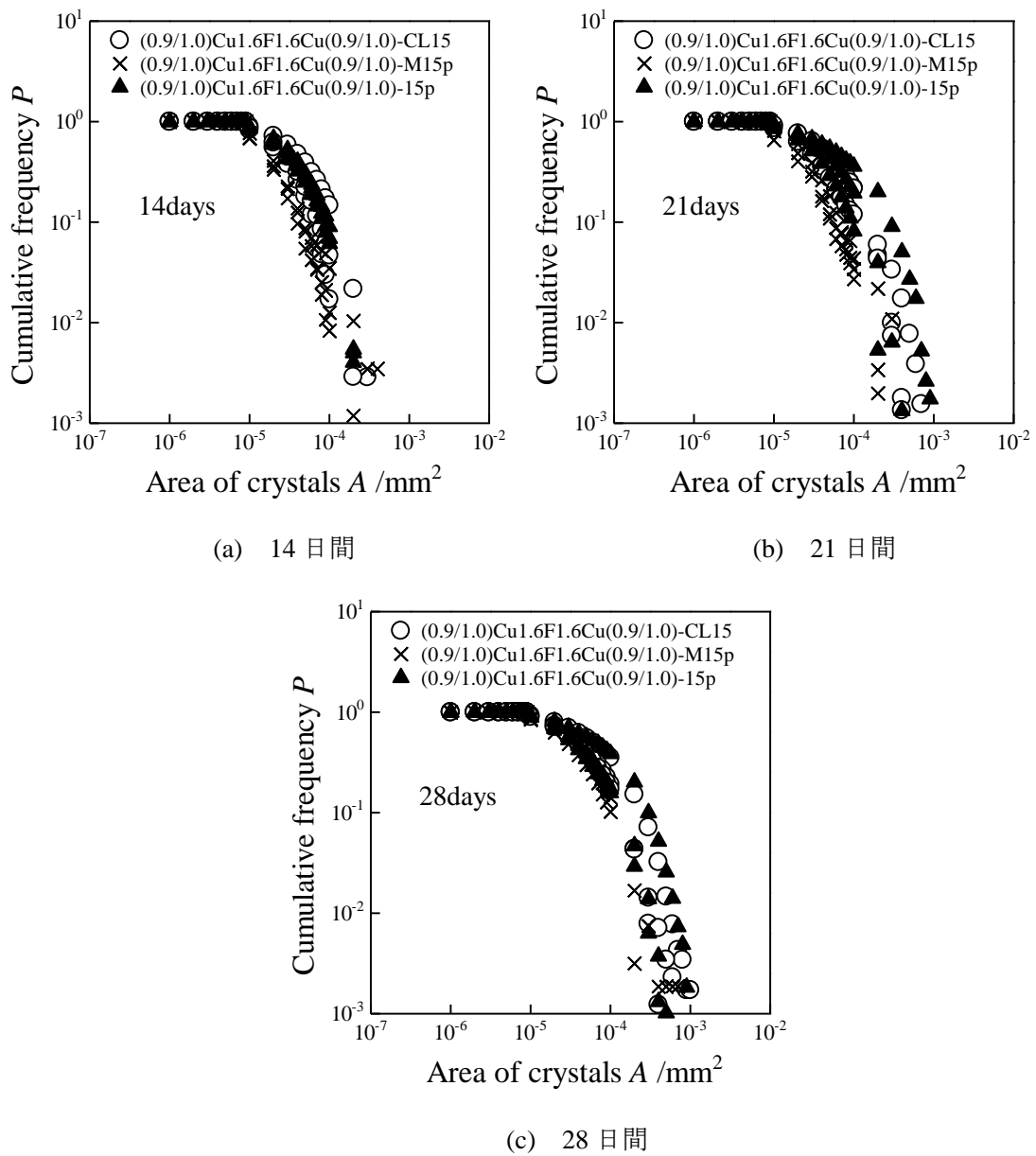


図 3.29 MBD 生成粒子のサイズ分布 (標準, おもり+釣り糸 4 本の上, 釣り糸 4 本の上)

3.7 設置方法の影響

3.7.1 実験条件

これまでの結果から粒子は概ね基板上に析出することが確認されている。その原因解明への手掛かりとして今回試験片を立てた状態での試験を行った。特に **MBD** が発現するの
か、また析出するとすればどの箇所に析出するのかに注目し、試験を行うことにした。なお、
試験片を立てるため、試験片の設置位置がこれまでの位置と異なるため、同じ位置で横に設
置した実験も同時に行った。表 3.7 にそれぞれの試験条件を示す。

3.7.2 実験結果および考察

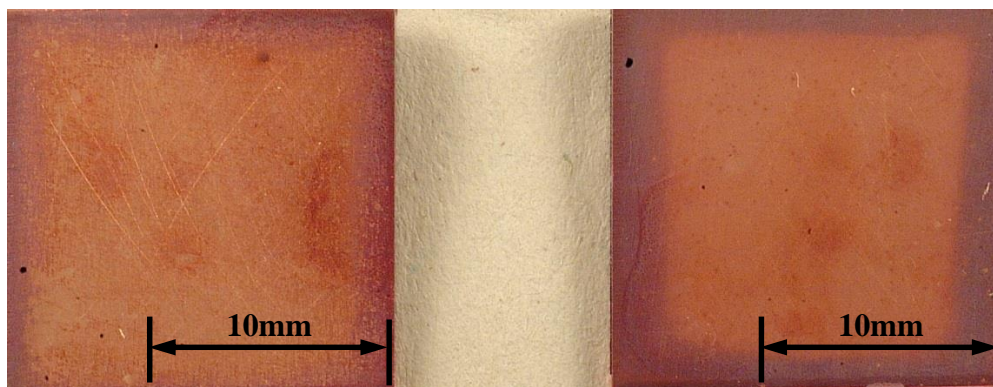
立てた場合の試験後の写真を図 3.30、浮かせた場合の試験後の写真を図 3.31 に示す。立
たせた場合の基板には析出した粒子は確認できなかったが浮かせた場合には析出が確認
できた。

図 3.32~図 3.34 に試験片を浮かせた場合、試験片を立てた場合における 1 回目~3 回目
の試験で測定した粒子面積および粒子数を示す。試験片を立てた場合は 1~3 回目全ての試
験において **MBD** が発現しなかった。これより試験片を立てた状態では **MBD** が発現しない
ことがわかった。試験片を浮かせた場合、2 回目を除き、標準試験との差はほとんど見られ
なかった。2 回目の結果では析出は見られたものの、標準と比べると明らかに粒子面積およ
び粒子数は小さくなってしまった。これは 1 回目の試験の途中から 2 回目の試験中に空調
の不具合があり、試験温度を一定にすることができなかったためではないかと考えられる。
図 3.35 に試験温度を示す。1 回目の 2 週目、2 回目の 1 週目以降、室温が一定していない期
間があることがわかる。このため、析出が少なくなったのではないかと考えられる。従って、
浮かせることによる影響はほとんど無いと考えられる。

図 3.36 に標準と浮かせた場合の析出粒子のサイズ分布を示す。全ての試験期間において
差があまりないことがわかる。

表 3.7 設置方法の影響試験条件 (C1020-1/2H)

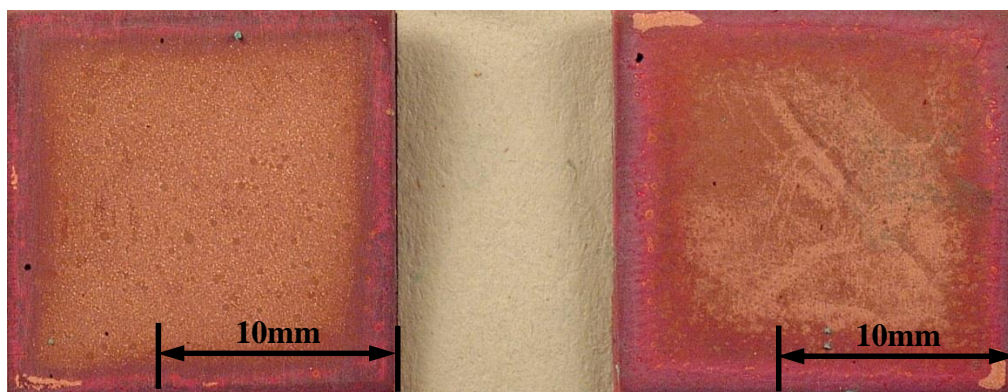
試験種別					フィルタ 処理条件			試験条件	
試験記号	試験 海水	試験場所	マスク板 (海水 側)	基板 (フ ィルタ 側)	枚 数	浸漬 温度	浸漬期 間	試験温度	試験 期間
			マスク板 (フィル タ側)	基板 (海 水側)					
(0.9/1.0)Cu1.6 F 1.6Cu(0.9/1.0)- CL15	有菌 海水	タグボッ クス内	研磨面	研磨面	1 枚	20～ 25℃	5 日	20～ 26.5℃	2～4 週間
			圧延面	$R_z=1.6$ μm					
(0.9/1.0)Cu1.6 F 1.6Cu(0.9/1.0)- CL15f	有菌 海水	タグボッ クス内	研磨面	研磨面	1 枚	20～ 25℃	5 日	20～ 26.5℃	2～4 週間
			$R_z=1.6$ μm	$R_z=1.6$ μm					
(0.9/1.0)Cu1.6 F 1.6Cu(0.9/1.0)- CL15t	有菌 海水	タグボッ クス内	研磨面	研磨面	1 枚	20～ 25℃	5 日	20～ 26.5℃	2～4 週間
			$R_z=1.6$ μm	$R_z=1.6$ μm					
(0.9/1.0)Cu1.6 F 1.6Cu(0.9/1.0)- CL15t	有菌 海水	タグボッ クス内	研磨面	研磨面	1 枚	20～ 25℃	5 日	20～ 26.5℃	2～4 週間
			$R_z=1.6$ μm	$R_z=1.6$ μm					



(a) 基板

(b) マスク板

図 3.30 試験後の試験片写真（立てる，試験期間 28 日）



(a) 基板

(b) マスク板

図 3.31 試験後の試験片写真（浮かせる，試験期間 28 日）

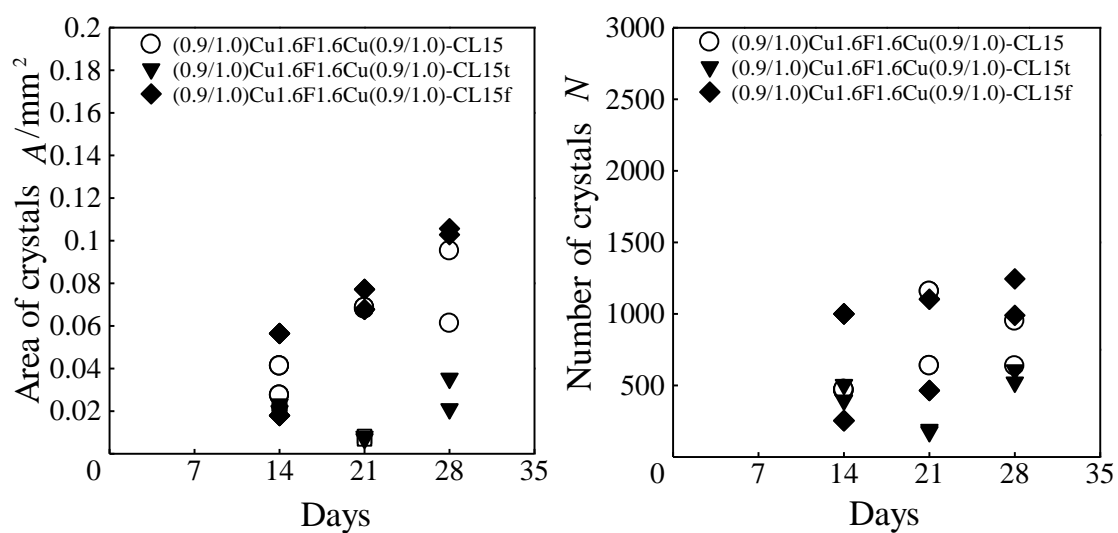


図 3.32 粒子面積および粒子数（標準，立てる，浮かせる 1 回目）

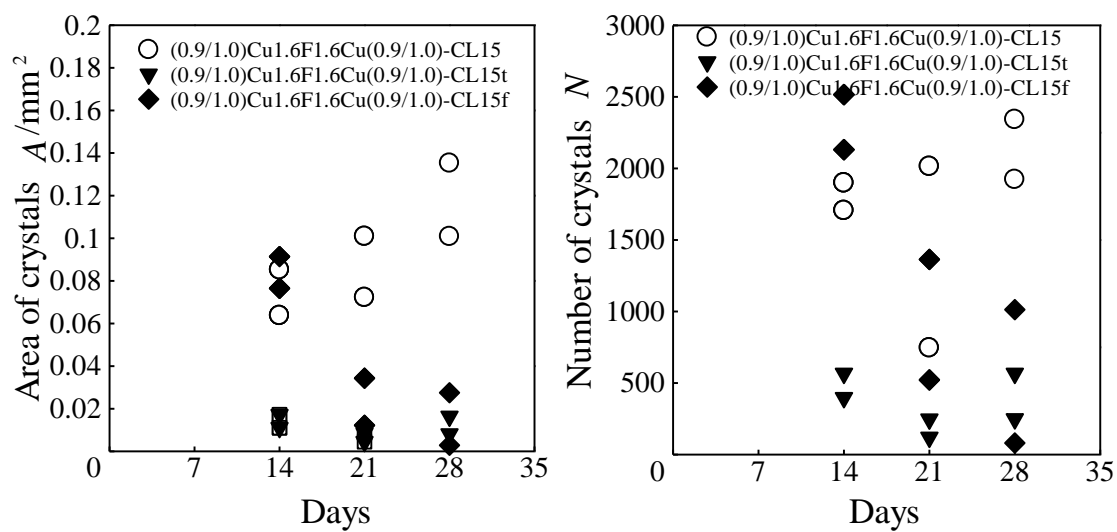


図 3.33 粒子面積および粒子数 (標準, 立てる, 浮かせる 2 回目)

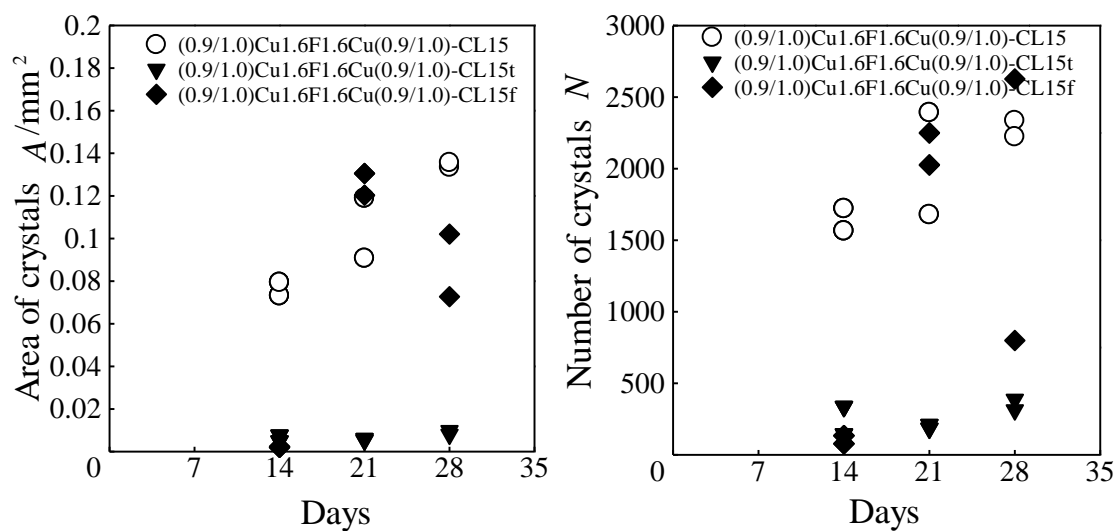


図 3.34 粒子面積および粒子数 (標準, 立てる, 浮かせる 3 回目)

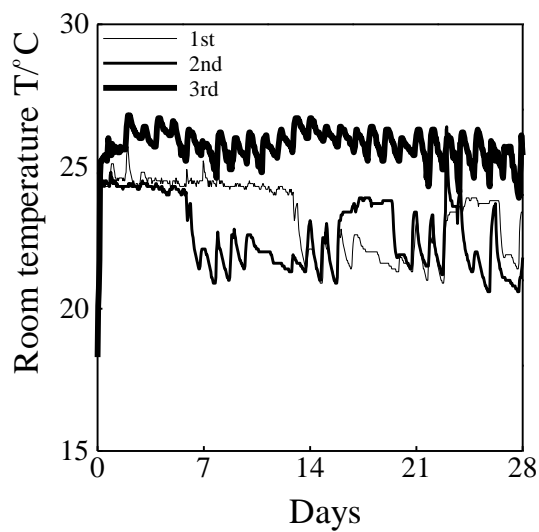
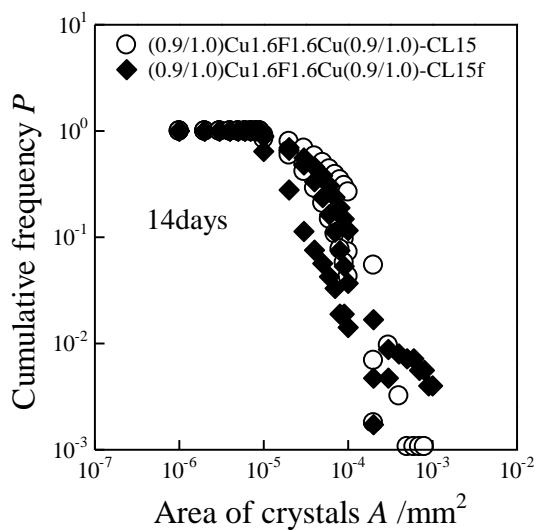
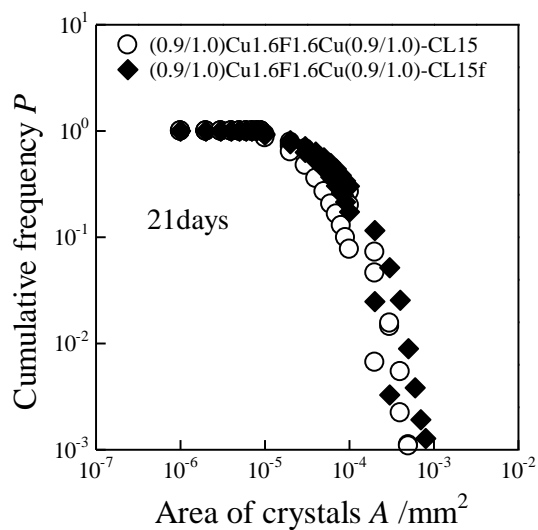


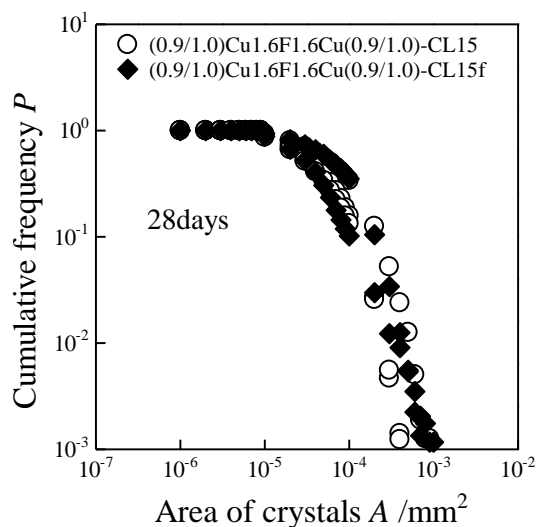
図 3.35 試験温度 (1 回目, 2 回目, 3 回目)



(a) 14 日間



(b) 21 日間



(c) 28日間

図 3.36 MBD 生成粒子のサイズ分布 (標準, 浮かせる)

3.8 pH および溶存酸素濃度, 銅イオン濃度の測定

3.8.1 pH の測定結果

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 3.37~図 3.43 に示す. 試験前と試験後ではあまり変化がなく試験期間による変化も ± 0.5 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ることがわかった. 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⁽²⁶⁾, 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. 試験条件による明確な違いは見られない.

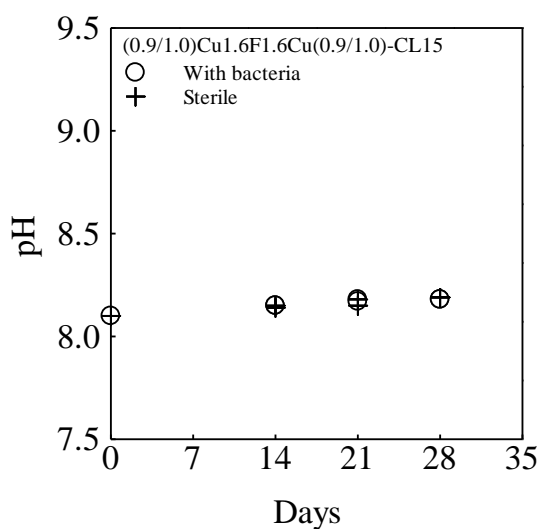


図 3.37 pH 測定結果 (有菌, 滅菌)

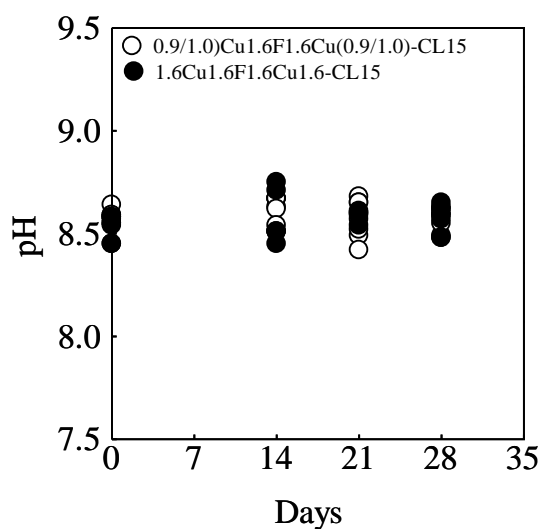


図 3.38 pH 測定結果 (標準, 海水側研磨)

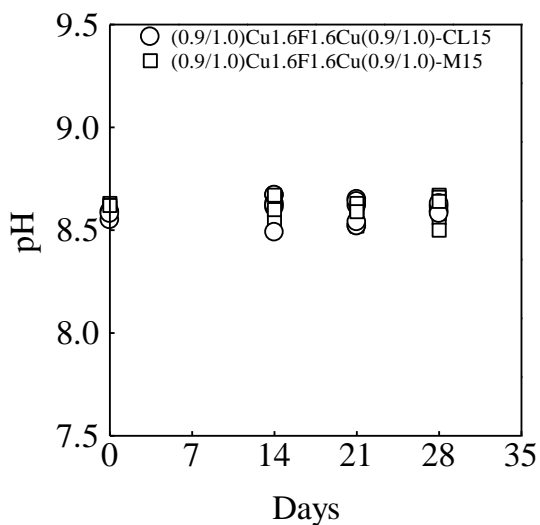


図 3.39 pH 測定結果 (標準,
おもりクランプ)

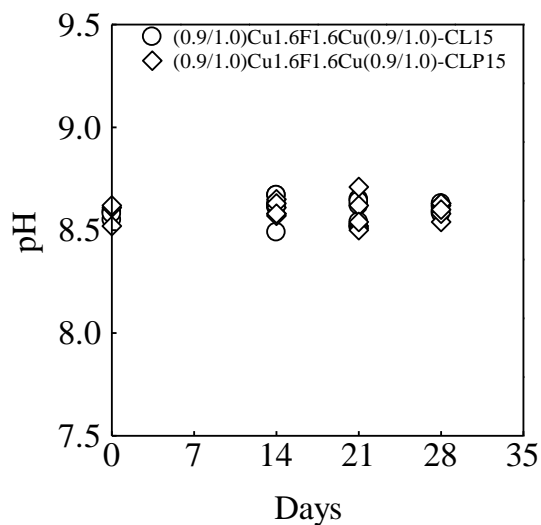


図 3.40 pH 測定結果 (標準,
フィルム遮蔽)

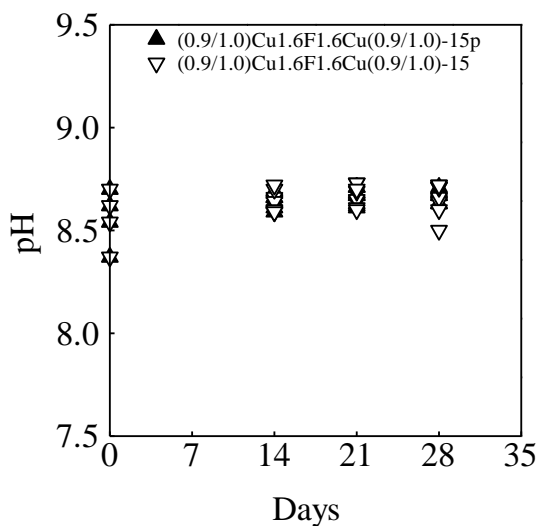


図 3.41 pH 測定結果 (釣り糸 4 本の上,
釣り糸なし)

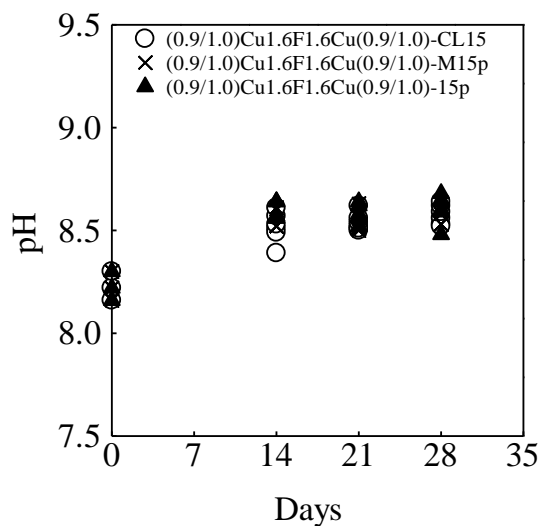


図 3.42 pH 測定結果 (標準,
おもり+釣り糸 4 本の上,
釣り糸 4 本の上)

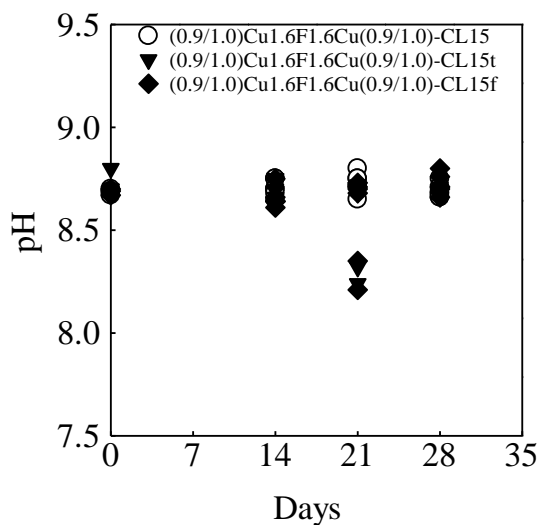


図 3.43 pH 測定結果（標準，立てる，浮かせる）

3.8.2 溶存酸素濃度の測定結果

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 3.44～図 3.50 に DO の測定結果を示す．いずれの条件でも DO の減少傾向が見られるが，試験条件による明確な違いは見られない．

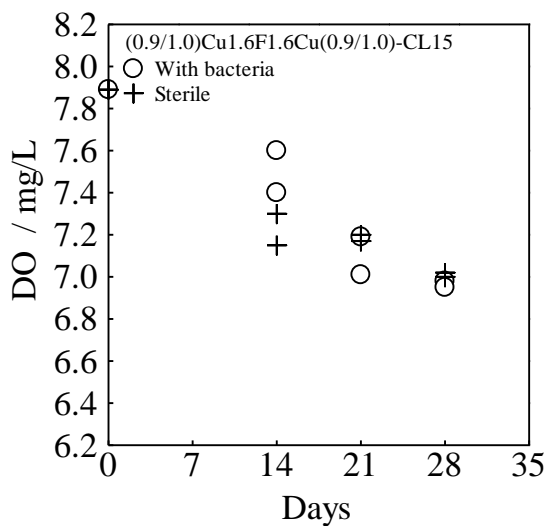


図 3.44 DO 測定結果（有菌，滅菌）

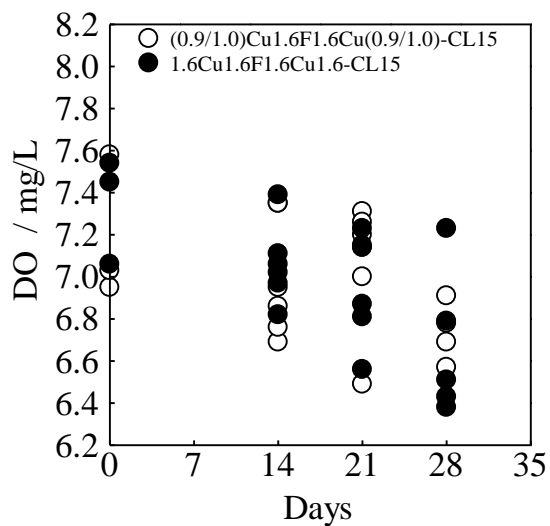


図 3.45 DO 測定結果（標準，海水側研磨）

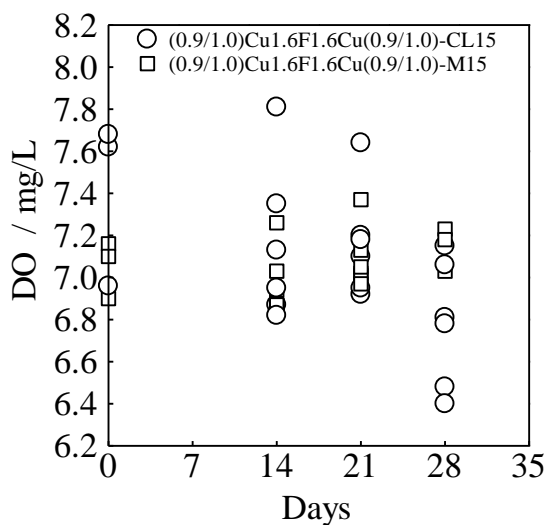


図 3.46 DO 測定結果 (標準,
おもりクランプ)

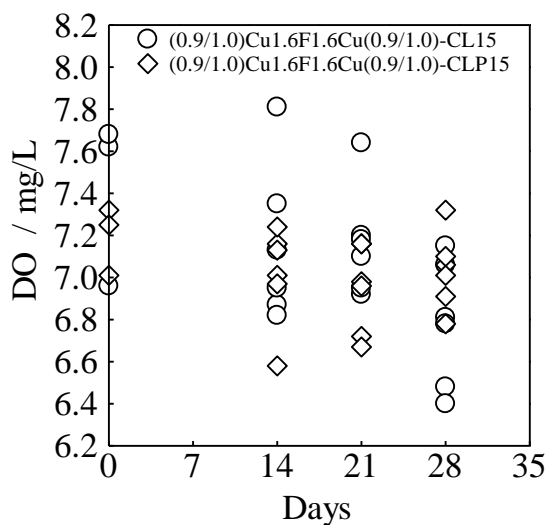


図 3.47 DO 測定結果 (標準,
フィルム遮蔽)

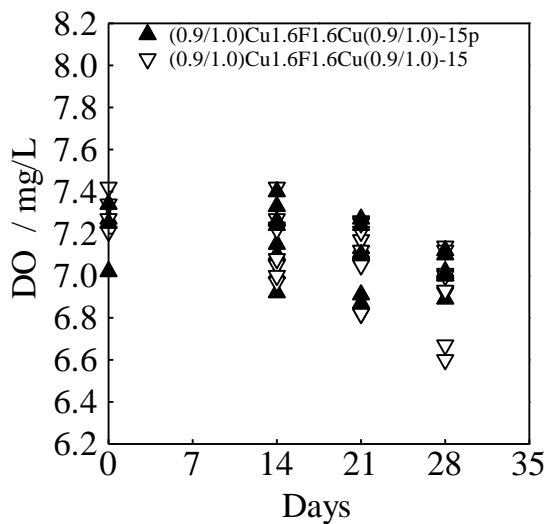


図 3.48 DO 測定結果 (釣り糸 4 本の上,
釣り糸なし)

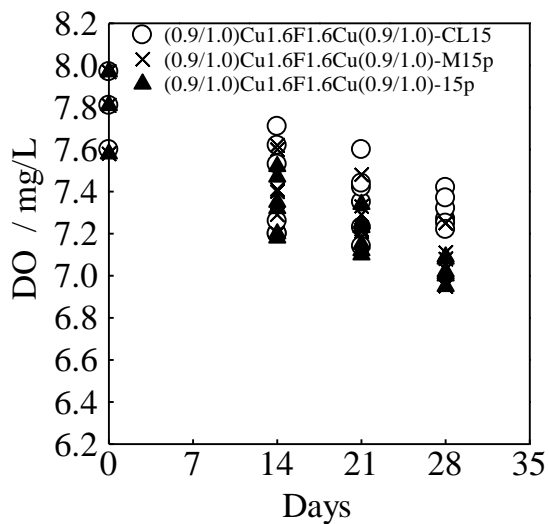


図 3.49 DO 測定結果 (標準,
おもり+釣り糸 4 本の上,
釣り糸 4 本の上)

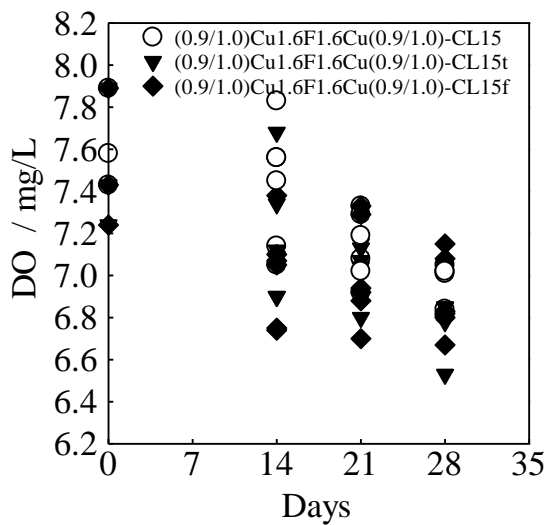


図 3.50 DO 測定結果（標準，立てる，浮かせる）

3.8.3 銅イオン濃度の測定結果

海水中の銅イオン濃度の影響を調べるためにその変化を測定した。図 3.51～図 3.57 に銅イオン濃度の測定結果を示す。銅イオン濃度は 2 週目から 3 週目にかけては減少することもあったが、どの実験条件においても、3 週目から 4 週目にかけては減少することなく全体的に増加傾向にあった。試験条件による明確な違いは見られない。

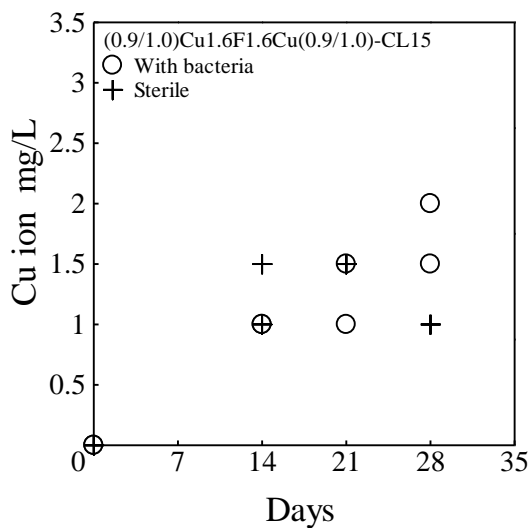


図 3.51 銅イオン濃度測定結果
（有菌，滅菌）

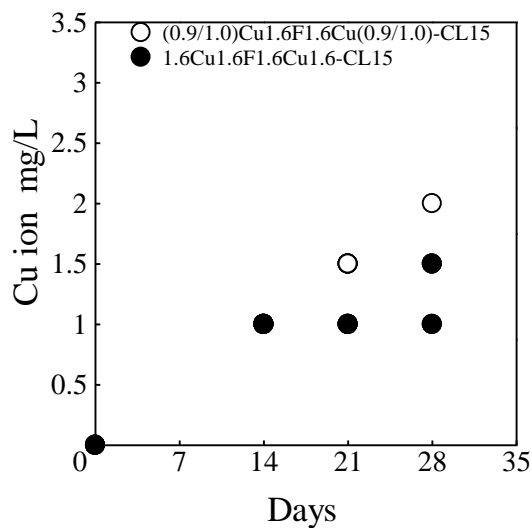


図 3.52 銅イオン濃度測定結果
（標準，海水側研磨）

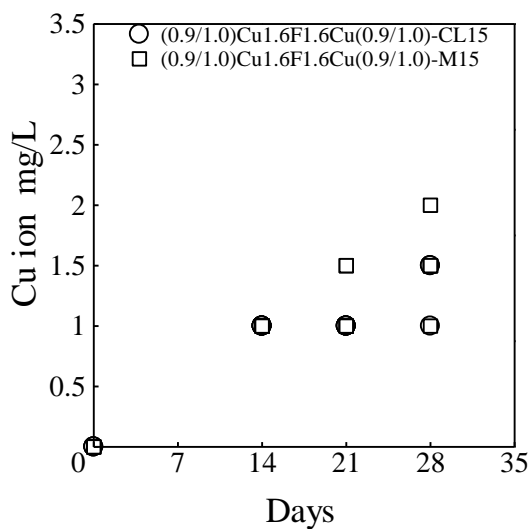


図 3.53 銅イオン濃度測定結果
(標準, おもりクランプ)

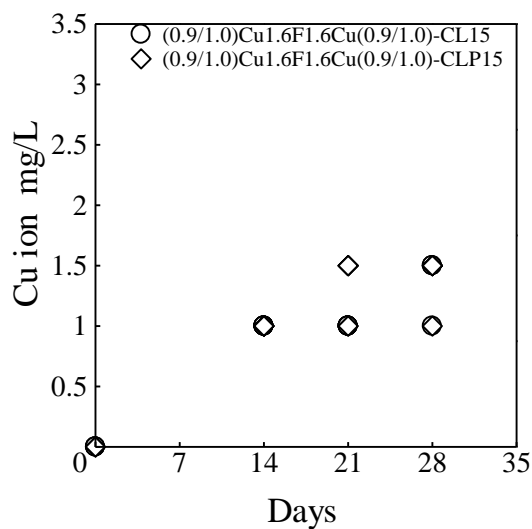


図 3.54 銅イオン濃度測定結果
(標準, フィルム遮蔽)

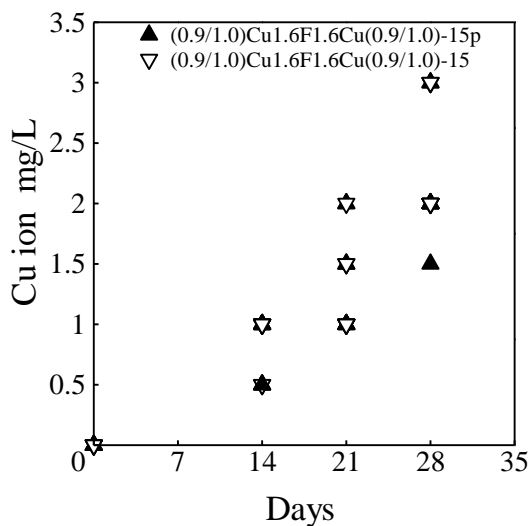


図 3.55 銅イオン濃度測定結果
(釣り糸 4 本の上, 釣り糸なし)

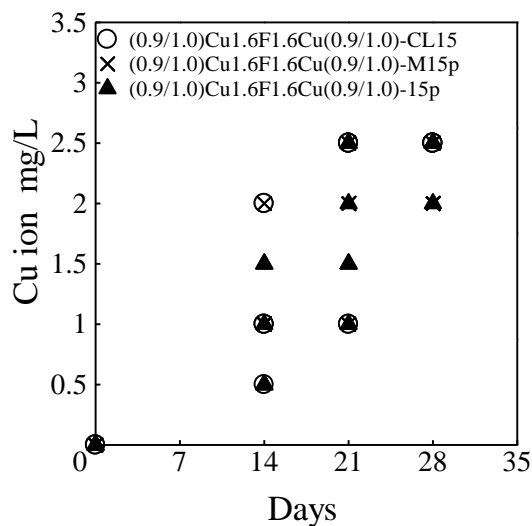


図 3.56 銅イオン濃度測定結果
(標準, おもり+釣り糸 4 本の上,
釣り糸 4 本の上)

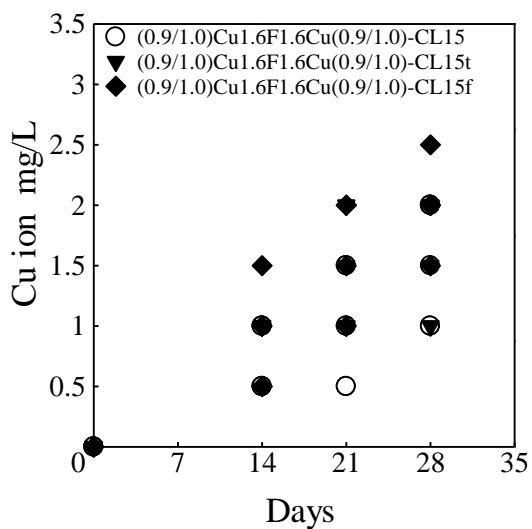


図 3.57 銅イオン濃度測定結果
(標準, 立てる, 浮かせる)

3.9 室温と析出量の関係

同じ条件で実験を行っても、析出量に差が見られることがある。よって、室温の違いに着目し、室温と析出量の関係調べた。標準試験の4週目の粒子面積と平均室温の関係を図 3.58 に示す。平均室温が高い方が安定して析出面積が多い割合が高いことがわかる。

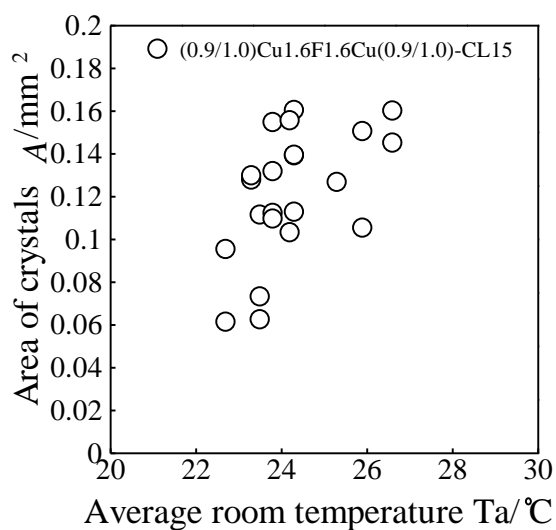


図 3.58 4週目の粒子面積および平均室温 (標準試験)

3.10 微生物の観察

3.10.1 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 3.59 に示す。生物顕微鏡ではあまり微生物を観察することが出来なかった。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。

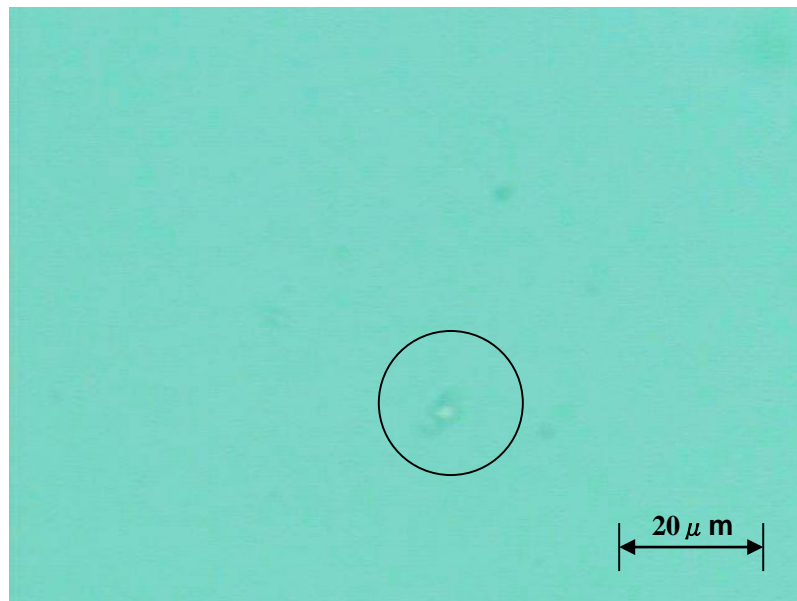


図 3.59 試験前海水の生物顕微鏡による微生物観察結果

3.10.2 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 3.60～図 3.62 に示す。基板上では桿菌，短桿菌，球菌が観察された。これらの微生物が MBD プロセスに関与していると思われる。



図 3.60 試験後の海水で確認された短桿菌と球菌（標準試験，無酸素銅，28 日）

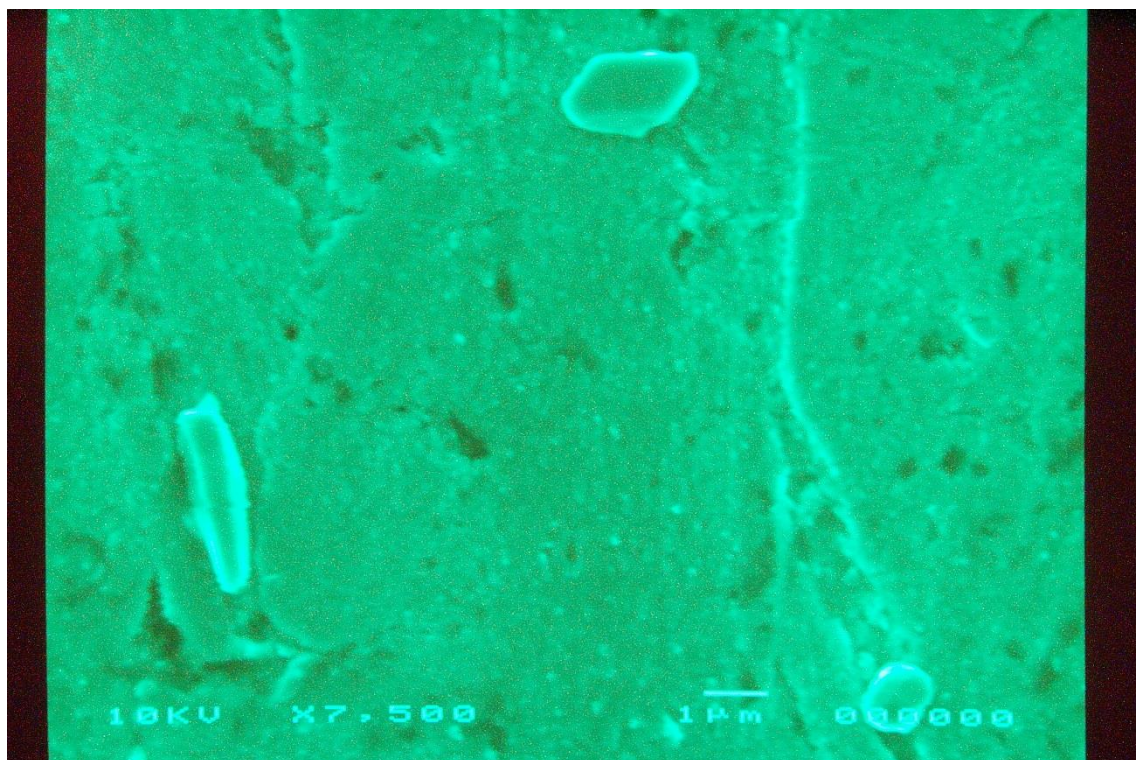


図 3.61 試験後の基板上で確認された桿菌（標準試験，無酸素銅，28 日）

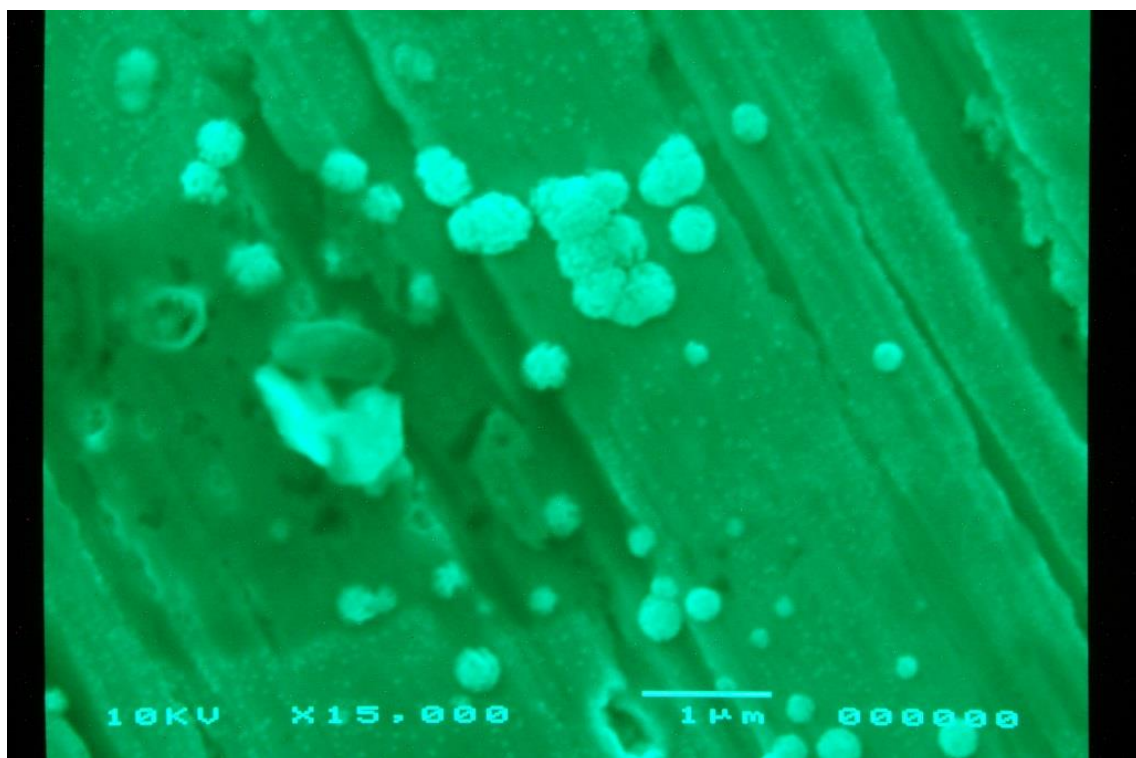


図 3.62 試験後の基板上で確認された球菌（海水側研磨試験，無酸素銅，28 日）

最後に本研究で得られた結果を表 3.8 に示す.

第4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) についての実験を行い、滅菌試験での微生物作用の確認、簡易クランプ法、海水側における表面粗さおよび海水接触面積の違いによる影響、設置方法の違いによる影響、pH および溶存酸素濃度、銅イオン濃度の影響、室温と析出量の関係、関与する微生物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) 滅菌試験を行い、滅菌環境では MBD が発現しないことを確認した。
- (2) 新しい簡易クランプ法としておもりによるクランプを行ったところ、MBD が発現しなかった。
- (3) 基板、マスク板両方の海水側の表面粗さの影響を調べたところ、表面粗さが大きい方が析出量は減少した。フィルタ側と同様に海水側も表面粗さが小さい方が MBD が促進されることがわかった。
- (4) マスク板の海水側をポリプロピレン製のフィルムで遮蔽した場合、析出は見られたが、標準試験に比べて少なくなった。マスク板の海水側の海水との接触面積が小さいと MBD が阻害されることがわかった。
- (5) クランプを行わず、試験片を釣り糸 4 本の上に乗せたものと直接ビーカーに接触させたものを比較した結果、直接ビーカーに接触させたものの方が析出量が減少し、基板の海水側の海水との接触面積が小さいと MBD が阻害されることがわかった。
- (6) 釣り糸 4 本の上に試験片をのせた状態でおもりによるクランプ試験、クランプなしで釣り糸 4 本の上に試験片をのせた試験を比較した結果、おもりによるクランプの方が析出量が少なくなった。おもりによるクランプはクランプ力が強いいため、MBD が阻害されると思われる。
- (7) 試験片を立てた状態での試験を行った。その結果、試験片を立てた状態では MBD が発現しないことがわかった。
- (8) pH には試験中の大きな変化はなく、安定した値を取っていた。また、試験中の溶存酸素濃度 DO は試験中、減少傾向が見られた。銅イオン濃度については試験期間に比例して増加する傾向が見られた。これらはどの実験条件に対しても同様の結果が得られた。
- (9) 試験後の基板上の SEM 観察を行った結果、桿菌、短桿菌、球菌が観察された。これらの微生物が MBD プロセスに関与していると思われる。

参考文献

- (1) 植田・池監修：『メタルバイオテクノロジーによる環境保全と資源回収—新元素戦略の新しいキーテクノロジー』，シーエムシー出版，1-12，（2009）.
- (2) Takashi Kunito・Kazutoshi Saeki・Kazunari Nagaoka・Hiroshi Oyaizud・Satoshi Matsumoto : Characterization of copper-resistant bacterial community in rhizosphere of highly copper-contaminated soil Eur. J. Soil Biol, 37, 95-102, (2001).
- (3) 多川 正：嫌気性微生物を活用した難分解性廃水処理技術の開発 高松工業高等専門学校研究紀要, 43, 29-33, (2008).
- (4) 西尾 尚道：嫌気微生物による有用物質生産と環境浄化・エネルギー回収への応用 生物学会誌, 86 (1), 2-11, (2008).
- (5) 矢木 修身：微生物を活用するバイオレメディエーション技術の開発とそのリスク評価, 環境バイオテクノロジー学会誌, Vol. 9, No. 2, 95-100, (2009).
- (6) 「Spoonful of Sugar Helps Power Fuel Cell」 Tokyo Business Today, November 19,2015 参考 URL ; <http://toyokeizai.net/articles/print-tbt/93326>.
- (7) 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).
- (8) 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).
- (9) 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).
- (10) 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). 西尾 尚道：嫌気微生物による有用物質生産と環境浄化・エネルギー回収への応用 生物学会誌, 86 (1), 2-11, (2008).
- (11) 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).
- (12) 藤井聖耶：海洋微生物による銅粒子の析出作用, 平成23年度修士論文, (2012).
- (13) 深見真之：海洋微生物による銅粒子析出法, 平成25年度修士論文, (2014).
- (14) 好田和秀：海洋微生物を利用した銅粒子の析出, 平成26年度修士論文, (2015).
- (15) 好田和秀：海洋微生物を利用した銅粒子の析出, 平成26年度修士論文, 13-14, (2015) .
- (16) 好田和秀：海洋微生物を利用した銅粒子の析出, 平成26年度修士論文, 14-16, (2015).
- (17) 好田和秀：海洋微生物を利用した銅粒子の析出, 平成26年度修士論文, 19-21, (2015).
- (18) 好田和秀：海洋微生物を利用した銅粒子の析出, 平成26年度修士論文, 22-26, (2015).
- (19) 好田和秀：海洋微生物を利用した銅粒子の析出, 平成26年度修士論文, 26-27, (2015).
- (20) 好田和秀：海洋微生物を利用した銅粒子の析出, 平成26年度修士論文, 27-28, (2015).
- (21) 三重県水産研究所：浅海定線観測結果, 2014年度, 調査地点8, 参考 URL ; <http://www.mpstpc.pref.mie.lg.jp/SUI/suzuka/senkaiteisen/senkaiindex.htm>.

- (22) Stephen C.Dexter : Marin Corrosion, Metals Handbook Ninth Edition, Volume 13, Corrosion, 893-907, (1987).
- (23) 好田和秀 : 海洋微生物を利用した銅粒子の析出, 平成 26 年度修士論文, 40-41, (2015).
- (24) 好田和秀 : 海洋微生物を利用した銅粒子の析出, 平成 26 年度修士論文, 43-52, (2015).
- (25) 深見真之 : 海洋微生物による銅粒子の析出作用, 平成 25 年度修士論文, 84-91, (2014).
- (26) 柳田友道 : 微生物科学 4 生態, 学会出版センター, 54, 79-82, 122-125, 139-141, (1984).

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。いたらず、度々ご迷惑ばかりかけてしまった私を何度も適切な助言で最後まで指導していただいたことは感謝してもしきれません。そして、実験に際して惜しめない御指示、御協力をいただいた川口直紀氏、野口孝生氏、加藤史也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。