

論文 微生物によるコンクリートの表面汚染機構に関する研究

小竹森 浩^{*1}・田澤 栄一^{*2}・河合 研至^{*3}・市坪 誠^{*4}

要旨：微生物によるコンクリート表面の汚れメカニズムを解明するための基礎的研究として、コンクリート表面の色彩変化には直接関係を持たないと考えられる細菌類(バクテリア)に着目し、各微生物(真菌類、藻類、細菌類)のセメントペーストへの吸着実験、真菌類の栄養分として細菌類、藻類の死骸を使用した培養実験等を行った。その結果、細菌類はコンクリートへの吸着率が高く、また生息する微生物の栄養分に成り得るものであり、表面汚染の初期形成に大きく関与することが分かった。

キーワード：コンクリート、表面汚染、微生物、吸着

1. はじめに

コンクリート構造物における色彩変化(いわゆる汚れ)の原因は、コンクリート自体の変化と汚れ物質の付着の二つに大別できる[1]。前者のコンクリート自体の変化についてはコンクリートの劣化と関係があるため様々な研究がなされている。しかし汚れ物質の付着に関してはその研究は未だ少なく、特に微生物などの生物系有機物はコンクリート表面汚染の大部分を占めるにもかかわらず、ほとんど研究がなされていないのが現状である。

コンクリート表面での生態系に関しては仕入ら[2]により詳細な検討が行われ、微生物起源の表面汚染について次のような機構が提案されている。まず、塵埃がコンクリート壁面に付着し、それを栄養分として藻類が光合成により増殖し、乾燥により死滅する。次に、塵埃、藻類の死骸に含まれる糖類やアミノ酸などを栄養分として真菌類が増殖し、これがコンクリート表面の汚れとなる。

しかし、既存のコンクリート構造物における生物系汚染物質の実態調査からは、藻類、真菌類以外にも細菌類が同定されており[3]、細菌類は、藻類、真菌類と比較した場合、一般に世代時間が26~32分と極めて短く増殖が非常に早く、また、藻類、真菌類が微酸性(pH4.0~6.0)を好むのに対して細菌類は中性から微アルカリ性(pH7.0~8.0)を好んで生育することから、コンクリートの表面汚染に関与する細菌類の役割は比較的大きいのではないかと考えられる。そこで、本研究ではコンクリート表面の生態系における細菌類の関与を明らかにすることを目的として、セメントペーストへの細菌類の吸着特性を検討するとともに、コンクリート表面における真菌類の栄養源としての細菌類の有効性について検討を行なった。

2. 実験概要

2.1 使用菌種

真菌類として糸状菌の*Cladosporium cladosporioides*、藻類として緑藻類の*Chlorella vulgaris*、細菌類として枯草菌の*Bacillus subtilis*をそれぞれ使用した。

*1 広島大学大学院 工学研究科構造工学専攻 (正会員)

*2 広島大学教授 工学部第四類(建設系), 工博 (正会員)

*3 広島大学助手 工学部第四類(建設系), 工博 (正会員)

*4 呉工業高等専門学校助手 土木工学科, 工修 (正会員)

2.2 使用培地

真菌類にはPD培地、藻類にはMBM培地(ただし増殖を高めるためGlucose、Peptone、Tryptoneを添加した)、細菌類には普通液体培地をそれぞれ使用した。また、スラント(斜面培地)や平板培地には寒天培地を使用し、それぞれの培地に2%の寒天を加えてオートクレーブ(120℃、1.5atm、20分間)した。培地の組成成分及びpHを表-1に示す。

2.3 増殖曲線の作成

実験に先立ち、菌株接種の時期を選定するために増殖曲線を作成した。

C. cladosporioides、及び*C. vulgaris*の増殖曲線は以下の要領で作成した。それぞれ坂口フラスコ14本に所定の培地を100mℓ入れオートクレーブ滅菌後、菌体を接種し28℃恒温室で振盪培養を行った。これを数日おきに2本ずつ回収し培養液を濾過した。濾過前後の濾紙の重量の差より乾菌体重量を求めグラフにプロットした。*B. subtilis*も同様に菌株を接種し、37℃恒温室で振盪培養を行った。1時間毎に培養12時間までフラスコ内の培養液をそれぞれ4mℓ採取し、分光光度計(波長:660nm)により吸光度を測定し、グラフにプロットして増殖曲線を作成した。

上記の方法により作成した増殖曲線から、対数増殖期を定め(図-1参照)菌体採取時期を選定した。

2.4 微生物のセメントペーストへの吸着実験

供試体はW/C=32%のセメントペーストとし、1次水 W_1 =24%、2次水 W_2 =8%のダブルミキシングを行い、4×4×16cmに成形した。水中養生(20℃、28日)を行った後ジョークラッシャーにより粉碎し、このうち粒径が2.5mm~1.2mmのものを取り出し粉末試料とした。また、比較材料としては水剤(アルキルアルコキシシラン系)を粉末試料に含浸したものも用意した。

吸着実験に用いたカラムを図-2に示す。カラム底部に網を敷き試料を100g投入し、試料の高さが185mm(はっ水剤を含浸したものは175mm)となるよう

均等に詰めた。なお、試料に付着する微粉の影響を防ぐため、予めカラム上端から蒸留水を流下させ十分に洗浄した後、炉乾燥(60℃、72時間以上)したものを使用した。

カラム内を流下させる微生物懸濁液に

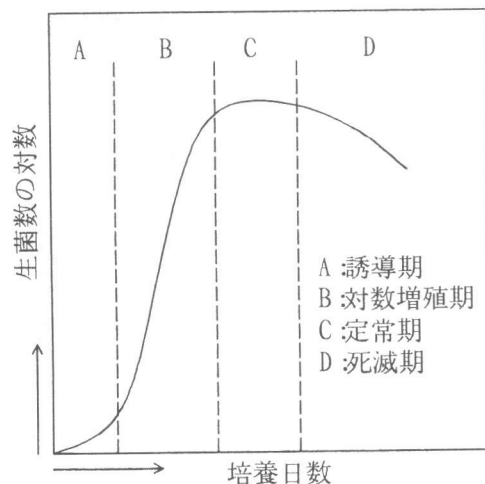


図-1 増殖曲線

表-1 使用培地の組成

培地名	組成成分	pH値	
PD培地	じゃがいも抽出液 1ℓ	5.6	
	デキストロース 10g		
MBM培地	NaNO ₃	0.5g	6.0
	MgSO ₄ ・7H ₂ O	0.075g	
	K ₂ HPO ₄	0.075g	
	KH ₂ PO ₄	0.175g	
	NaCl	0.025g	
	CaCl ₂	0.025g	
	Fe*1混液	1mℓ	
	A5*2混液	1mℓ	
	蒸留水	998mℓ	
	Glucose	0.1%	
	Bacto Tryptone	0.1%	
	Proteose Peptone	0.1%	
普通液体培地	Glucose	10g	7.0
	Proteose Peptone	10g	
	肉エキス	10g	
	蒸留水	1ℓ	

*1	*2
Fe*sdn→ 1mℓ/ℓ	A5*sdn→ 1mℓ/ℓ
FeSO ₄ ・7H ₂ O 1g/500mℓ	H ₃ BO ₃ 286mg/100mℓ
Conc H ₂ SO ₄ 2drops	MnSO ₄ ・7H ₂ O 250mg/100mℓ
	ZnSO ₄ ・7H ₂ O 22.5mg/100mℓ
	CuSO ₄ ・5H ₂ O 7.9mg/100mℓ
	NaWO ₄ 2.1mg/100mℓ

微生物懸濁液

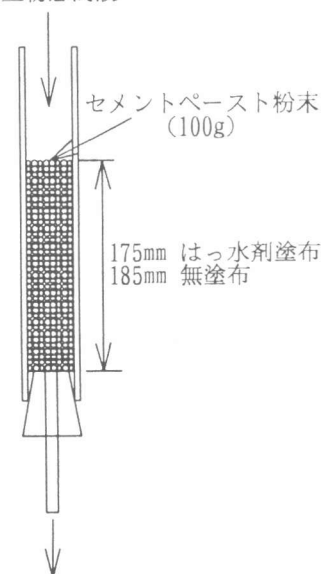


図-2 微生物吸着用カラム

については、*C. cladosporioides*の場合には、殺菌水を加えたスラント表面を白金耳により攪乱、振盪することにより作成した。また、*C. vulgaris*、*B. subtilis*では、液体培地で振盪培養した後、遠心分離により菌体のみを取り出し殺菌水で懸濁することにより作成した。これらの懸濁液を殺菌水で定容とした後、殺菌水で希釈することにより濃度の異なる懸濁液を作成した。ただし、*C. cladosporioides*及び*C. vulgaris*についてはトーマの血球計算板により菌体数の計測を行ったが、*B. subtilis*については菌体そのものの計測が困難であるため分光光度計(波長:660nm)による吸光度として測定を行った。

恒温恒湿環境下(20℃、50%RH)で、これらの微生物懸濁液100mlをカラム上部より流下させ、流下前後の菌体数並びに懸濁液容積を計測することによりセメントペーストへの微生物吸着数を求めた。

2.5 微生物の死骸を栄養とした真菌類培養試験

2.4に示した方法により*C. vulgaris*、*B. subtilis*の懸濁液を作成し、坂口フラスコに100mlずつ入れ、これをオートクレーブ滅菌したものを真菌類の栄養分とした。真菌類の菌体を接種した後、28℃恒温室で振盪培養し、数日おきに回収を行ない、2.3で示した方法により乾菌体重量を測定した。

3. 実験結果及び考察

3.1 増殖曲線

(1)*C. cladosporioides*の増殖曲線

*C. cladosporioides*は、スラント(PD培地)に植え付けてから28℃恒温室で4日間培養したものを坂口フラスコに接種し、振盪培養することにより増殖曲線を求めた。*C. cladosporioides*の増殖曲線を図-3に示す。これより、実験に使用する菌体採取時期を、対数増殖期にあたる培養開始後6日目に決定した。

(2)*C. vulgaris*の増殖曲線

*C. vulgaris*は、MBM培地に植え付けてから

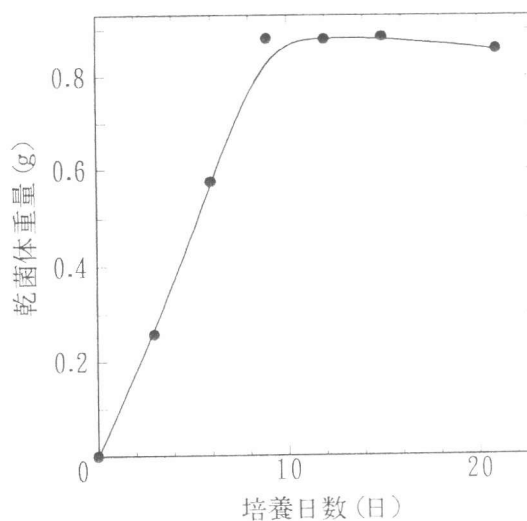


図-3 *C. cladosporioides*の増殖曲線

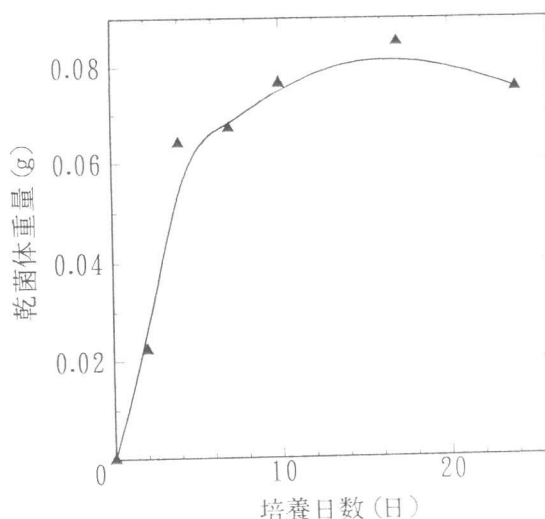


図-4 *C. vulgaris*の増殖曲線

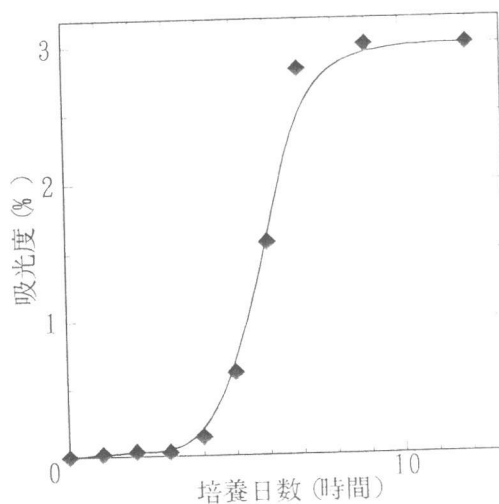


図-5 *B. subtilis*の増殖曲線

28℃恒温室(1500ルクス12時間/日)で10日間静置培養したものを坂口フラスコに接種し、振盪培養することで増殖曲線を求めた。*C. vulgaris*の増殖曲線を図-4に示す。これより、実験に使用する菌体採取時期を、対数増殖期にあたる培養開始後4日目に決定した。

(3) *B. subtilis*の増殖曲線

*B. subtilis*は、スラント(普通液体培地)に植え付けてから37℃恒温室で1日間培養したものを坂口フラスコに接種し、振盪培養することで増殖曲線を求めた。*B. subtilis*の増殖曲線を図-5に示す。これより、実験に使用する菌体採取時期を、対数増殖期にあたる培養開始後6時間に決定した。

3.2 微生物の吸着実験

2.3で示したように、*B. subtilis*においては直接菌体数を計測することができないため、分光光度計の測定結果より得られる吸光度が濃度に比例することを利用して、それぞれの測定結果を相対量として表すことにより整理した。すなわちカラムに投入した懸濁液の容積を L 、その濃度を c 、吸光度を A 、カラムより流出した懸濁液の容積、濃度及び吸光度をそれぞれ L' 、 c' 、 A' とし、さらに、カラムに投入した中で最も濃度の高い懸濁液の L 、 c 、 A をそれぞれ $L_{\max}$ 、 $c_{\max}$ 、 $A_{\max}$ としたとき、カラムを流下させる前の懸濁液に含まれる菌体数ならびにセメントペースト粉末の単位重量あたりに吸着した菌体数をそれぞれ相対流下前菌体数、相対吸着菌体数として、次のように定義した。

$$\text{相対流下前菌体数} = \frac{cL}{c_{\max} L_{\max}} = \frac{AL}{A_{\max} L_{\max}}$$

$$\text{相対吸着菌体数} = \frac{\frac{cL - c'L'}{W}}{\frac{c_{\max} L_{\max}}{W_{\max}}} = \frac{\frac{AL - A'L'}{W}}{\frac{A_{\max} L_{\max}}{W_{\max}}}$$

ただし、 W はカラム中のセメントペースト粉末の重量であり、 $W_{\max}$ としている。

これから求めた、*B. subtilis*懸濁液の相対流下前菌体数と相対吸着菌体数の関係を図-6に示

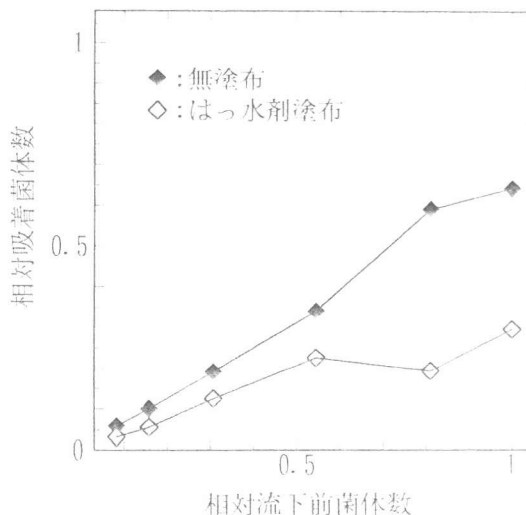


図 6 *B. subtilis*の相対吸着菌体数

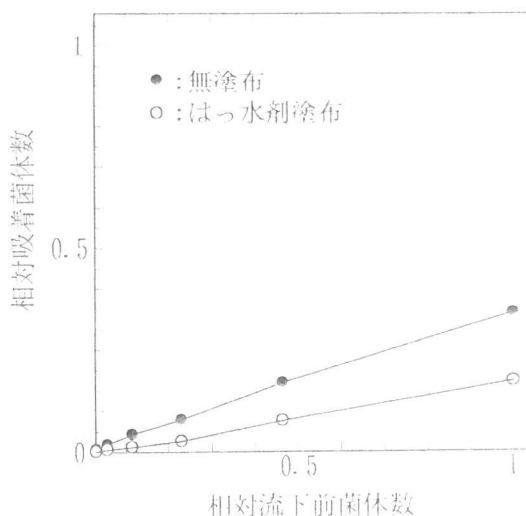


図-7 *C. cladosporioides*の相対吸着菌体数

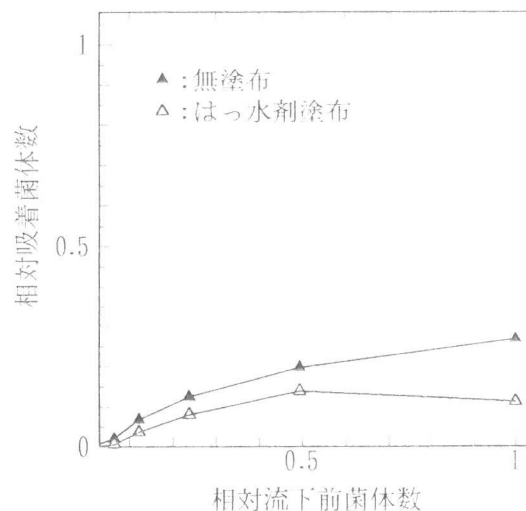


図 8 *C. vulgaris*の相対吸着菌体数

す。また菌体数を数えることにより求めた*C. cladosporioides*並びに*C. vulgaris*の相対流下前菌体数と相対吸着菌体数の関係をそれぞれ図-7、図-8に示す。なお、*C. cladosporioides*並びに*C. vulgaris*の相対流下前菌体数が1の時の菌体数はそれぞれ 96.20×10^6 、 104.70×10^6 個/mlであった。

細菌類のセメントペーストへの吸着率は非常に高く、高濃度の懸濁液を流下させた場合6割以上が吸着している。細菌類の場合、細胞の大きさが $1\mu\text{m}$ 前後と他の微生物と比較した場合かなり小さく、また、その細菌細胞の外側は粘液層で覆われ、ペン毛を着生している。そのために、コンクリート表面部分の凹凸への付着が起こり易いと考えられる。懸濁液濃度が高いところでは、ペーストへの吸着菌体数の増加が緩やかとなっているが、これは粒子表面のほぼ全域に菌体が付着したためと思われる。また、はっ水剤の使用により吸着量を大きく低減させることが出来ることが示された。

藻類ならびに真菌類においても相対流下前菌体数の増加に伴いセメントペーストへの相対吸着菌体数の単調な増加が見られるものの、増加の傾向がはっ水剤を含浸したものと似通っていることから、セメントペーストへの吸着のみならず、ペースト粒子間における菌体の目づまりによるものも相当量含まれていることが考えられる。いずれにせよ、真菌類、藻類ともに全体の吸着量としては低く、吸着力が弱いことが分かる。また、濃度を最も高くした懸濁液は非常に濃い色を呈しており、実環境下ではまず起こり得ないことから細菌類と比較した場合、真菌類並びに藻類のコンクリート表面への吸着量は少ないと思われる。

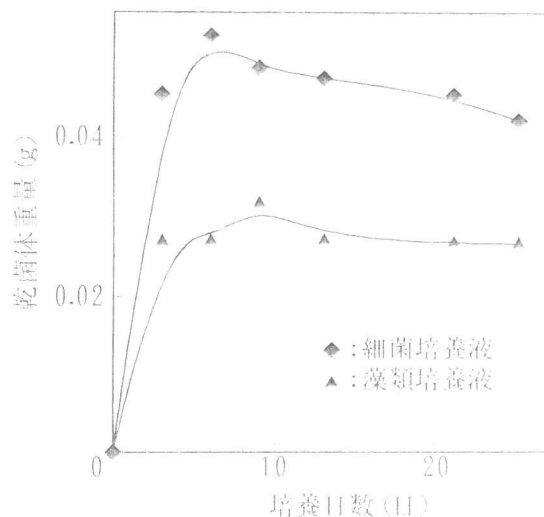


図 9 *B. subtilis*、*C. vulgaris*を栄養とした *C. cladosporioides*増殖曲線

3.3 藻類、細菌類の死骸を栄養分とした真菌類の増殖

実験室内での促進試験のため栄養分となる微生物を高濃度として実験を行った。使用した懸濁液の濃度は*C. vulgaris*では 68.6×10^6 個/ml、*B. subtilis*では吸光度で2.7を示すものであった。*B. subtilis*、*C. vulgaris*の死骸をそれぞれ栄養分として培養した*C. cladosporioides*の増殖曲線を図9に示す。

従来から考えられていたように藻類の死骸は含まれているアミノ酸等により真菌類の育成に十分な栄養分となっている。また単純に比較はできないが、細菌類の死骸を栄養分とした場合、藻類を栄養分とした場合の約2倍もの真菌類の増殖が確認できる。細菌類の組成成分は、その乾燥量の50%がC、8~15%がN、2~5%が灰分であり、リン酸、K、S、

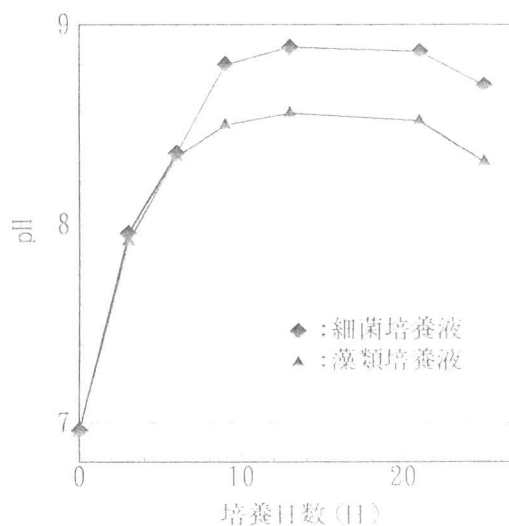


図 10 *B. subtilis*、*C. vulgaris*培養液中の pHの経時変化

Cl、Na、Mg、Ca、Ca、Si、Fe、Cu、Mn等が含まれている。このNの大部分とCの大部分が乾燥菌体量の50～90%のタンパク質を形成するアミノ酸となっており、真菌類の栄養として十分である。したがって、実環境下での乾湿の繰り返しにより細菌類が増殖と死滅を繰り返した場合、十分に真菌類の栄養となることが分かる。なお、真菌類の増殖の様子については、栄養分が藻類と細菌類の場合でかなり異なっていた。藻類の死骸を栄養分とした場合は、1～3mmの粒状の真菌類が徐々に増えたのに対し、細菌類の死骸を栄養分とした場合は、培養液全体が徐々に濁って行き、最終的には真黒となった。

B. subtilis、*C. vulgaris*の死骸を栄養分として*C. cladosporioides*を培養した溶液のpHの経時変化を図-10に示す。培養開始時には中性(pH=7)であったものが、弱アルカリ(pH 8.4～8.9)になっている。また菌体数の変化にpHが深く関係していることも認められる。これは、真菌類の増殖に伴う代謝産物の増加によるものと考えられる。

細菌類自体の色調は無色から乳白色であるため、細菌類がコンクリート表面汚染の多数を占める黒い色調の直接的原因ではないと考えられる。しかし、これらの実験結果より、細菌類はセメントペーストへの吸着率が高く、また既存の土木構造物からも同定されていることなどからコンクリート表面に多数存在すると考えられる。細菌類は弱アルカリ性に好んで生育するため、コンクリート打設後早期から乾湿の繰り返しにより増殖と死滅を繰り返し、その死骸がコンクリート表面に生育する微生物の栄養源となり、表面汚染の形成に関与していることが考えられる。

4. 結論

本研究によりコンクリート表面の生態系への細菌類の関与について、以下のことが明らかとなった。

- 1) 真菌類並びに藻類と比較して細菌類のコンクリート表面への吸着量は極めて多く、雨水等の流下によっても容易には取り除かれないものであることが分かった。
- 2) コンクリート表面の汚れの主要因である真菌類が、藻類のみならず細菌類の死骸を栄養分として十分増殖することが確認された。すなわち、コンクリート表面に付着した細菌類が乾湿の繰り返しにより増殖と死滅を繰り返し、表面汚染が形成される際の真菌類の栄養分として作用している可能性が示唆された。

謝辞 本研究の実施に際し、広島大学工学部第三類の森永力助教授より多大なる御指導、御協力を頂くとともに、広島大学卒論生の高源英子さんの御協力を得ました。ここに記して感謝の意を表します。

【参考文献】

- 1) 仕入豊和、地濃茂雄：コンクリート表面の汚れとその対策、コンクリート工学、Vol. 24、pp. 52～58、1986. 7
- 2) 仕入豊和、地濃茂雄、橘高義典：コンクリート壁面の汚れ、セメント・コンクリート、No. 461、pp. 22～33、1985. 7
- 3) 市坪誠：コンクリート表面の汚れに関する研究、広島大学大学院修士論文、pp. 83～98、1989. 2