

論文 コンクリートに生息する微生物の採取方法に関する検討

寺本 篤史^{*1}・蔵富 千奈^{*2}・藤吉 奏^{*3}・丸山 史人^{*4}

要旨：本研究では、コンクリートの内部および表部からより環境条件に近い状態で微生物群集を採取する方法について既往の研究の整理および基礎的な検討を実施した。その結果、コアドリルによる加熱は、抽出した DNA 濃度に大きな影響を及ぼさないこと、骨材とコンクリートの DNA 濃度はおおよそ同程度であること、コンクリート外壁の表層部から微生物を採取する場合には、スワブスティックを湿らせた状態で実施することで採取効率が向上すること、コンクリート表層部のスワブ範囲はおおよそ 150mm 角以上を目安とできることなどが明らかになった。

キーワード：微生物群集, DNA 抽出, 採取方法, コア採取, スワブ

1. はじめに

原核生物, 真核生物, アーキアなどの微生物は地球上のいたるところに生息している。深海底の熱水噴出口や砂漠のような乾燥地域など, 極限環境と呼ばれる領域も例外ではなく微生物の繁殖の場になっている。

コンクリート構造物は, 練混ぜ時から供用期間中にかけて含水状態が大きく変化し続けていること, 硬化過程において空隙径がマイクロオーダーからナノオーダーに細径化すること, 空隙水の pH が 12~13 程度と極めて高いことなど, 微生物の生息においては極限環境の一つと認識されている。

しかしこのような極限環境であっても生息可能な微生物は存在し, 例えば硫化水素の発生を促す微生物が硫酸塩劣化の原因としてよく知られている¹⁾。また, 近年ではウレアーゼを分解する微生物をコンクリートに内在させ, 炭酸カルシウムを析出することでひび割れなどの粗大空隙を閉塞する機能を期待した「自己治癒コンクリート」などの研究開発も進んでいる²⁾。

微生物の機能ではなく存在そのものがコンクリートの性能に影響を与える事例も報告されており, 海中コンクリート構造物では, コンクリート表層部に付着・増殖する微生物群集の集合体 (バイオフィルム) が, コンクリートの外的因子の浸透に対して抵抗性を高める可能性が指摘されている³⁾。

その他にもコンクリート内部の環境微生物を極力そのままの状態で微生物群集として採取し, 微生物の群集構造および多様性からコンクリートの劣化の特徴を評価しようと試みる研究も開始されている⁴⁾。

近年, PCR システムの廉価化やハイスループットシーケンサーの普及に伴い, 微生物の定性分析, 定量分析が以前より実施しやすい研究環境になってきており, コン

クリート工学分野でも, 今後さらに微生物を活用した種々の研究が展開されることが期待される。

しかしながら 2023 年時点において, コンクリートから微生物群集の採取・分析を実施した研究事例はまだ数が少なくその手法は確立されていない。そこで本研究では, コンクリートの内部および表層部の微生物群集の採取方法について既往研究の整理と基礎的な検討を実施した。

2. コンクリート試料から微生物を採取する手法に関する既往の研究

コンクリートに生息する微生物に関連する既往研究は, 特定の機能を有する微生物を採取する目的と, 環境に近い状態で群集として採取する目的に大別される。

微生物の特定の機能に着目した研究事例としては, 下水道のコンクリート構造物において散見される硫酸塩劣化を引き起こす微生物に関する研究が多く, 例えば, Nica et al. は, 下水道から採取した腐食コンクリート試料中の微生物を分離培養し 16S rRNA のアンプリコン解析を実施し, 2 種のチオ硫酸塩酸化細菌を劣化原因として特定している⁵⁾。

Okabe et al. は, 水セメント比 0.5 のモルタルを 40×18×8mm に成型し, 下水道に 174 日間曝露後, モルタルに付着した腐食生成物 (主に石膏) を金属へらで採取し滅菌蒸留水に溶解させ, 土壌用の DNA 抽出キットである Fast DNA spin kit (Bio 101; Qiogene, Inc.) を使用して溶解液約 0.2 ml から DNA を抽出している⁶⁾。

Gomez-Alvarez et al. も同様に, 実際のコンクリート製下水管の表層部から 4cm² 程度の腐食生成物を金属へらで採取し, Ultra Clean Soil DNA kit (MoBio Laboratories Inc.) を使用して DNA 抽出を行っている⁷⁾。

*1 広島大学 先進理工系科学研究科 准教授 博士 (工学) (正会員)

*2 広島大学 先進理工系科学研究科 (学生会員)

*3 広島大学 大学院国際協力研究科 助教 博士 (農学) (非会員)

*4 広島大学 大学院国際協力研究科 教授 博士 (薬学) (非会員)

Grengg et al.は、マンホール内の劣化したコンクリートから試料 1 g を採取し、0.9% NaCl 溶液 1 ml に懸濁させた懸濁液を Thiobacilli 濃縮用培地に接種し増殖させたあと、遠心分離によって回収し DNA を抽出している⁹⁾。

以上のように、硫酸塩劣化に関する研究では主にコンクリートの腐食生成物を試料として採取し、特定の微生物に着目して DNA 抽出を行っている事例が多い。

一方、コンクリート内部の DNA 抽出を行っている事例は数が少ない。Kim et al.は、炭酸カルシウムの析出を促す微生物を単離するためにコンクリートに生息している微生物群集のシーケンスを行っているが、DNA 抽出方法に関して詳細な記述はなく使用したキット (NucleoSpin Soil kit) の記述に留まっている⁸⁾。

Maresca et al.は、一般的な環境にあるコンクリート内部の群集構造を明らかにすることを目的として、 $\phi 152 \times 305\text{mm}$ の円柱試験体の表層から 3 インチのコンクリート塊を滅菌したハンマーで取り出した試料を用いてコンクリート内部からの DNA 抽出に取り組んでいる。DNA 抽出方法は複数実施しているが、一般的なコンクリート内部の DNA 濃度は極めて小さいため、MoBio PowerSoil, PowerMax DNA という市販の抽出キットでは十分な DNA 収量を確保できなかったと報告している。そこで次世代シーケンスに要する DNA 総量を確保するために独自のプロトコルを確立し、シーケンスを実施するためには 5g 程度のコンクリート試料が必要と報告している⁹⁾。

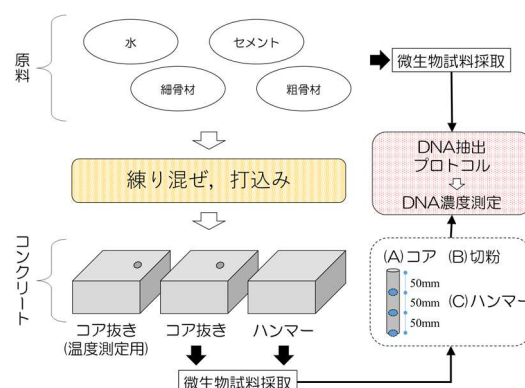
以上のように、コンクリート構造物に生息している微生物を採取するための方法は目的によって手法が異なっており、いまだ確立された方法がないばかりか、その方法について論文内での記載が少ないのが現状である。

3. シリーズ 1：コンクリート内部の試料採取実験

物性評価のためにコンクリート構造物から試験体を採取する方法としてはコア採取が一般的であり、なかでも湿式コアが多い。微生物分析用の試料の採取をコア抜き時に同時に行えると都合がよいが、コンクリートに生息する微生物を極力、原状のまま採取しようとする外から熱や水分を与える方法は望ましくない。特に湿式でコア抜きを行う際に滅菌した水を供給し続けるのは非現実的である。一方、乾式のコアドリルを使用する場合には、施工前にコアドリルを滅菌することで使用可能と考えられるが、コア抜き時にコンクリート内部に摩擦熱が発生し、コンクリート温度が上昇する懸念がある。

本章では、コンクリート試験体の内部から微生物試料を採取する方法として乾式コアドリルに着目し、乾式でコアを抜く際に生じる摩擦熱の分布および採取深さが抽出した DNA 濃度に与える影響を確認した。

DNA 抽出用に用いた試料は、1) 乾式コア、2) 乾式コ



図－１ 実験概要

表－１ 使用材料

W	水	水道水
C	セメント	普通ポルトランドセメント、密度 3.16g/cm ³
S	細骨材	黒瀬産石英斑岩砕砂、表乾密度 2.58g/cm ³
G	粗骨材	黒瀬産石英斑岩砕石（5-15mm、10-25mm）、表乾密度 2.64g/cm ³
混和剤		AE 減水剤：リグニンスルホン酸化合物とポリカルボン酸エーテルの複合体 空気量調整剤：変性ロジン酸化合物系陰イオン界面活性剤

表－２ 調査表

単位量(kg/m ³)					
W	C	S	G	混和剤	
160	320	847	1059	3.2	0.32

アを抜いた際に生じる切粉、3) ハンマーやノミを使用して非加熱で取り出した試験片という 3 種類で、それぞれ試験体の深さ方向をパラメータとして複数個の試料を採取した。本実験の概要を図－１に示す。

3.1 試験体概要

本実験で作製した試験体は、300×300×150mm の角柱試験体である。コンクリートの作製に使用した材料および調査を表－１、表－２に示す。

コンクリートの硬化時および養生時の微生物量、群集構造の変化を確認する目的で、コンクリートの練混ぜを行う前に、使用材料（セメント、細骨材、粗骨材）を採取し、無菌の密閉容器に保存し DNA 抽出作業を行うまで -80℃ のディープフリーザーで保管した。水道水については、開栓して 5 分間の水道水を滅菌したポリタンクに保存し、4.5～5L の水道水から孔径 0.2μm のメンブレンフィルターユニット (K020A047A, ADVANTEC) を用いて微生物をフィルタリングした。採取後のフィルタも原料と同様に、DNA 抽出まで -80℃ で保管した。

これらの原料とコンクリート試験体から得られた試料を、既報¹⁰⁾の DNA 抽出プロトコルに則り DNA を抽出し、微量分光光度計 (DS-11 FX+, DeNovix 社、測定レンジ：

0.5 pg/μL-4,000 ng/μL, 分解能 0.5 pg/μL)を用いて溶液の蛍光度および吸光度から、DNA 濃度を測定した。

3.2 乾式コア採取時の温度上昇量

微生物の量および群集構造は環境温度の変化に伴い変化することがよく知られている。そこで本項では乾式コア採取時にコンクリート表層部および内部で生じる温度上昇量を測定した。本実験ではφ22mm の乾式コアドリルを使用し、3.3 節に示す方法でコア抜きを行った。

試験体は微生物採取用のコンクリートと同寸法の 300×300×150 (mm) で、試験体内の温度分布を測定するために図-2 に示す位置に熱電対を 96 点配置した。なお、温度分布測定用の試験体と微生物採取用の試験体は別途作製しており、微生物採取用の角柱試験体には熱電対は設置されていない。

3.3 微生物試料の採取

コンクリート試験体から 3 種類の方法で微生物試料を採取した。

1) 乾式コアは、コアドリルによって角柱試験体から抜いたもので、コア抜き後、深さ方向に約 50mm, 100mm, 150mm (底面近傍) の位置から滅菌したハンマーで破片を取り出し微生物分析用の試料とした。

2) 乾式コアを抜いた際に生じる切粉は、コアドリルがおおよそ所定の深さに到達した時点でコア孔から出てくる切粉を採取し、微生物分析用の試料とした。なお、所定の深さに達する以前に発生する切粉は掃除機により随時取り除いている。

3) ハンマーやノミを使用して非加熱で取り出した試験片は、コア抜き用の試験体と同一材料・調査を用いて作製した同寸法の別の試験体から、ハンマーおよびノミを使用して手動で破壊し、所定の深さから採取した。

3.4 DNA 抽出

本実験では著者らが報告している DNA 抽出プロトコル¹⁰⁾に沿って、DNeasy® PowerBiofilm® Kit (QIAGEN) を使用し DNA 抽出を行った。

3.5 実験結果

(1) 温度上昇量

コアドリルは、試験体固定の都合上、中心位置からずれた位置(図-2 参照)に設置した。微生物分析用の試料として切粉を採取するときに、コアドリルが深さ方向の所定の位置に達した時点で停止する必要があるため、温度測定用の試験体でも同様の処置を行った。

図-2 に示す位置とそれに隣接する熱電対から得られた温度変化を図-4 に示す。図より、表層部からおおよそ 50mm 深さにコアドリルが達した時点から 50mm 深さにある熱電対が温度上昇を開始し、その後、100mm 深さまでの削孔中に最高温度 42℃を示したあと、熱電対のケ

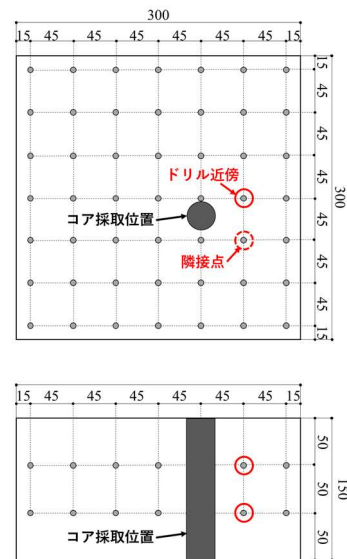


図-2 温度測定用試験体概要

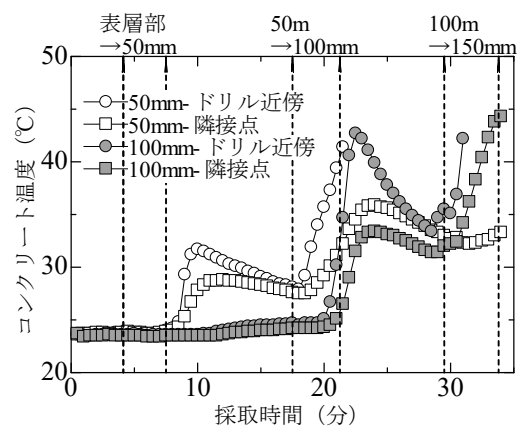


図-3 コアドリル近傍の温度測定結果

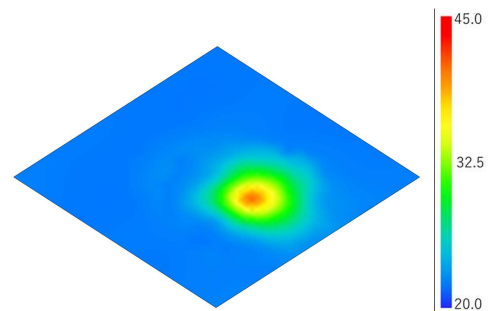


図-4 コア採取完了時の 100mm 深さの温度分布

ープルにコアドリルが接触しデータが途切れた。また、表層から 100mm 深さに埋め込んだ熱電対は、100mm 深さまでのコア抜きが完了した時点から急激な温度上昇が始まり 43℃程度に達した。試験体深さ 150mm まで抜き切る段階では、最もコアドリルに近い位置の熱電対が 43℃程度まで上昇したあと断線し、隣接する熱電対では 45℃程度まで温度上昇が確認された。

コア採取完了直後の温度データ(断線した熱電対を除いたもの)を使用して、100mm 深さに設置した熱電対から温度分布のコンター図(図-5)を作成した。図より、

コアドリルから 90mm 程度離れた位置まで温度上昇がみられるものの、その温度上昇量は 10℃以内であり、コア採取時に発生する温度上昇は、コア部周辺に限定的に生じていることが確認された。

今回の試験では熱電対の断線によりコンクリートの最高到達温度を取得することができなかったが、図-6 に示す表層部の赤外線サーモグラフィの結果から、コアドリルそのものは最大で 66.1℃まで温度上昇していることを確認しており、採取されたコアコンクリートも同程度の温度まで達している可能性がある。

(2) DNA 濃度

300×300×150 mm の角柱試験体の異なる深さ位置から採取した試料に対して、本実験プロトコルによって抽出された DNA 濃度の測定結果を図-6 に示す。採取した微生物分析用試料は 0.024-0.143g であり、以下の図では試料 1g から採取できる濃度として規定化している。

図より、コンクリート試験体から採取した抽出溶液の DNA 濃度は切粉>ハンマー>コアとなっており、コアドリルの摩擦によって同様の温度履歴を受けていると考えられる切粉とコアについても DNA 濃度の多寡には一定の傾向が見られなかった。そのため本実験の範囲内ではコアドリルによる摩擦熱が試料の DNA 量に及ぼす影響は軽微であると考えられる。

一方で、切粉から抽出した DNA の濃度が最も大きかった原因として、試料の比表面積が大きいことため試料採取中に空気中の微生物が混入しやすかった可能性が考えられる。今後、空気からの異物混入の影響を確認するため、取得した試料を用いて、16S rRNA 遺伝子を PCR にて増幅しシーケンスにより試料に含まれる微生物の種類や構成比を算出することで、試験体外から付着した微生物との分離評価を実施する予定である。

また、試験体からの採取位置による DNA 濃度の違いに着目すると、いずれの採取方法でも試験体中心部に近い領域でわずかに高い DNA 濃度が得られている結果であったが、コンクリートでは表層から 10mm 程度内部の位置でも、表層部と比較すると 100 から 1000 分の 1 程度の DNA 濃度になっているため、本実験で得られたコンクリートの深さ位置による DNA 濃度の差異は、表層部と比較すると無視しうる程度であった。

次に、コンクリート試験体の作製に使用した原料と、コンクリートから取得した試料の DNA 濃度の比較を行った。結果が図-7 である。ここでコンクリートの DNA 濃度は、全採取方法でデータの揃っている 50mm, 100mm, 150mm 位置の平均値を採用している。

図より、水道水の微生物濃度は極めて小さく、また、セメント粉末も骨材と比較して、DNA 濃度が一桁程度小さいことが確認できる。一般に、微生物の滅菌のために



図-5 赤外線サーモグラフィによる表層温度の測定結果

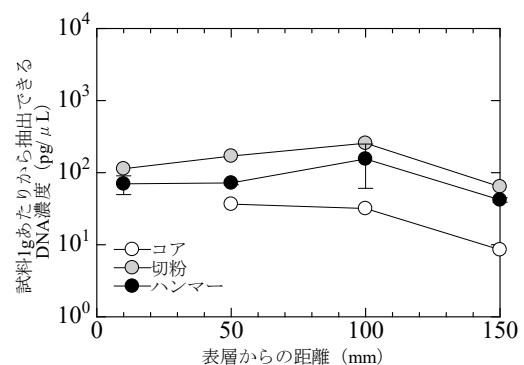


図-6 採取方法および試験体内位置の DNA 濃度の比較

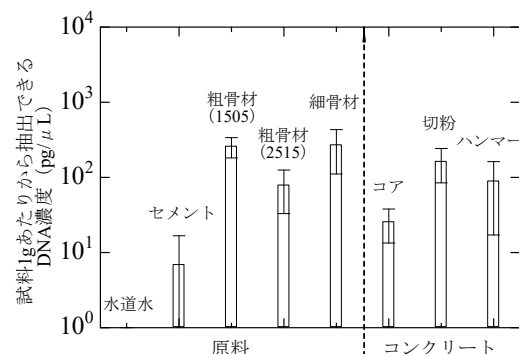


図-7 原料とコンクリートの DNA 濃度の比較

行われるオートクレーブ養生は 120℃、20 分程度に設定されることが多く、セメントの製造過程で、それよりはるかに高い温度に曝されることを考えるとこの測定結果は妥当である。

また、粗骨材、細骨材からは、コンクリートと同程度の DNA 濃度が得られた。既報¹⁰⁾では、骨材内部の試料から抽出した DNA 濃度は、モルタルマトリクスから抽出したものと比較して小さくなることが示唆されていたが、骨材の表層部まで含めて試料を採取すると、コンクリートと同程度の DNA 濃度が得られる結果であった。

本実験および既報¹⁰⁾から、コンクリートの表層部と内部では DNA 濃度が大きく異なること、コンクリート内

部の DNA 濃度は原料と大差ないことが確認された。このことから、コンクリートの表層部に生息する微生物は、健全で密な細孔構造を有するコンクリート内部に移動し大量に増殖する可能性は低いことが推察される。

しかしながらひび割れが生じたコンクリートや施工不良の粗な連続空隙を有するコンクリートでは、水の移流などに伴う内部への微生物の移動が想定されるため、今後は表層部から内部への微生物の移動の条件にも着目し検討を進める予定である。

4. 表層部の微生物採取方法の検討

微生物生態学分野の既往研究において、環境温湿度や材料表層部の物理的、化学的な組成が微生物の種類や量に影響を及ぼすことが明らかになっている。例えば、石碑の表層部に生息するシアノバクテリアの群集構造が石の CaO と SiO_2 の組成割合から影響を受ける可能性が示唆されている¹¹⁾。そのため、コンクリート構造物の表層部に付着、繁殖する微生物群集は、コンクリートが置かれている外部環境と、コンクリート表層部の諸特性（空隙構造、含水率、pH など）を反映する可能性がある。

コンクリート構造物の表層部から完全非破壊で採取した微生物群集から、外部環境や表層部特性に関する情報が得ることができれば、特別な知識を持たない利用者の協力を得ることや、ドローンなどの遠隔操作を行うことによってコンクリート構造物診断のスクリーニングを行える可能性がある。しかし現時点では、微生物分析に必要な試料の量を適切に採取するための標準的な方法は確立されていない。そこで本章では、コンクリート実構造物の表層部からスワブにより微生物試料を採取する手法に着目して基礎的検討を実施した。

実構造物のコンクリート外壁はブリージング等の影響により、コンクリートそのものの組成にばらつきがあるだけでなく、日射や雨がかり・水みちなどによって、汚れや微生物の付着の程度が異なっている可能性が高い。これら構造物そのもののばらつきと微生物分布の関係性は今後精査していく必要があるが、本論文ではまず、スワブ方法によって採取できる DNA 濃度にどの程度の差異が生じるかを確認した。

本研究で使用したスワブスティックは Copan 社製 FLOQSwabs® 518C である。スワブスティックの形状によって採取効率が変化することが指摘されている¹²⁾が、本研究では、著者らが建築内外壁の微生物採取に実績¹³⁾のある商品を採用した。

多孔質材料に対して乾燥したスワブスティックを使用すると微生物の採取効率が低くなるため、滅菌した生理食塩水に浸し、湿らせた状態で物体表面を擦り取ることが一般に行われる。しかしコンクリート外壁に上記の

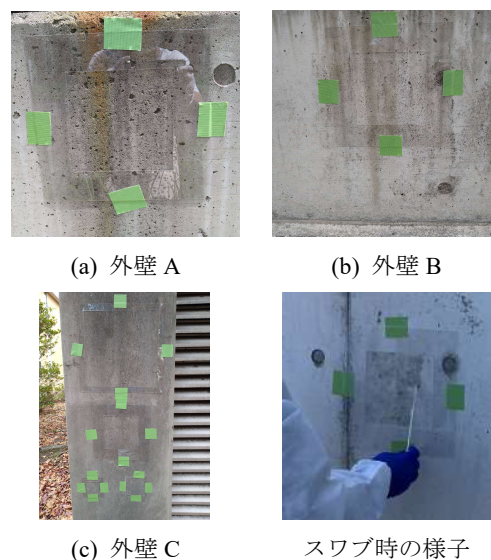


図-8 スワブの対象壁面と採取方法

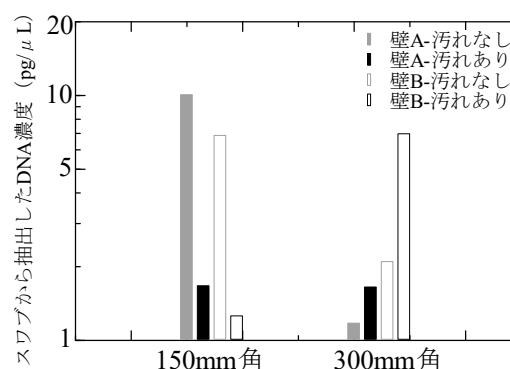


図-9 外壁 A, B からのスワブ採取により得られた DNA 濃度

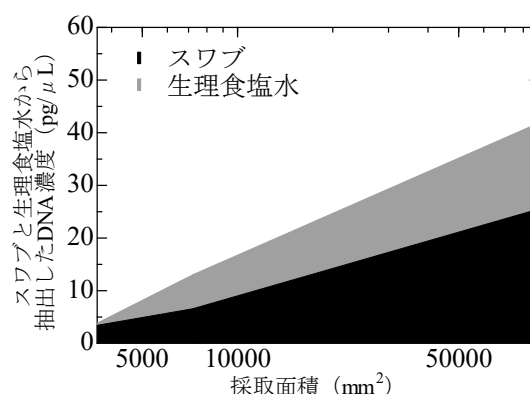


図-10 採取面積の影響

方法を用いる場合、生理食塩水が外壁に吸水され、十分な採取面積を確保できない。

図-9 は、図-8 (a), (b) のように汚れの目立つ外壁を対象に、汚れた部分と比較的汚れが少ない部分を目視で判別し、スワブ前に一度だけスワブスティックを湿らせた条件で、それぞれ 150mm 角、300mm 角の領域をスワブした際に得られた DNA 濃度の結果である。図より採取面積や外壁面の汚れの有無に関わらず DNA 濃度 10pg/μL 以下で、測定値にばらつきが見られる。この結

果は、採取面積を広くとった場合にも、スワブスティックが乾燥している場合には、効率よく微生物を採取できない可能性を示唆している。

一方で、生理食塩水に繰り返しスワブを浸す場合には、スワブスティックを適切な湿り気に保てる半面、採取した微生物が生理食塩水に移動するため、生理食塩水そのものの微生物分析も必要になる。

図-10 は、図-8 (c) のように一面に同程度の汚れが見られる外壁を対象に、60mm 角、85mm 角、150mm 角 300mm 角の範囲から、スワブスティックが乾燥しないよう繰り返し生理食塩水に浸漬する方法で得られた DNA 濃度の測定結果である。ここで、生理食塩水に含まれる微生物は孔径 0.22mm のフィルターユニットに採取してから DNA 抽出処理を行っている。

図より、スワブスティックと生理食塩水から得られた DNA 濃度を合算すると、採取面積に対しておおよそ対数的に増加していく傾向が確認された。ハイスループットシーケンスを精度よく実施するために必要な DNA 総量は 2ng 程度といわれているため、本実験で使ったキットのように DNA 抽出溶液収量が 80~100μL 程度の場合には、おおよそ 20000mm² 程度以上 (約 150mm 角) の領域でスワブをすればよいことが分かる。なお、採取面積に対して線形的に増加しなかったのは、繰り返しスワブスティックを浸漬し、微生物を含んだ状態の生理食塩水がコンクリートに吸水されたことが原因と考えられるため、生理食塩水の量を増やすことで、より採取効率が向上する可能性がある。

5. 結論

コンクリートの内部および表部から、より環境条件に近い状態で微生物群集を採取する方法について検討を実施した。その結果、コアドリルによる加熱は、抽出した DNA 濃度に大きな影響を及ぼさないこと、骨材とコンクリートの DNA 濃度はおおよそ同程度であること、コンクリート外壁の表層部から微生物を採取する場合には、スワブスティックを湿らせた状態で実施することで採取効率が向上すること、コンクリート表層部のスワブ範囲はおおよそ 150mm 角以上を目安とできることなどが明らかになった。

本研究で得られた試料は、現在、16S rRNA 遺伝子のアンプリコン解析を行っており、微生物群集構造の観点からも採取方法の信頼性の検証を行う予定である。

謝辞

本研究は、JST の創発的研究支援事業、JCI 中国支部研究委員会、科研費国際共同研究加速基金(国際共同研究強化(B)) (22KK0064) の補助を受け実施した。

参考文献

- 1) C.Grengg et al. Microbiologically induced concrete corrosion: A case study from a combined sewer network, *Cement and Concrete Research* 77 (2015) 16–25
- 2) M.Bagga et al. Advancements in bacteria based self-healing concrete and the promise of modelling, *Construction and Building Materials* 358 (2022) 129412
- 3) S. Karaci et al. The effect of time and surface type on the composition of biofilm communities on concrete exposed to seawater, *International Biodeterioration & Biodegradation* 173 (2022) 105458
- 4) E.A. Kiledal et al. :Bacterial Communities in Concrete Reflect Its Composite Nature and Change with Weathering, *American society for Microbiology*, e01153-20, Issue3, Vol. 6, 2021
- 5) D. Nica et al., Isolation and characterization of microorganisms involved in the biodeterioration of concrete in sewers, *International Biodeterioration & Biodegradation* 46 (2000) 61-68
- 6) S. Okabe et al..Succession of Sulfur-Oxidizing Bacteria in the Microbial Community on Corroding Concrete in Sewer Systems, *American society for Microbiology*, 971-980, 2007
- 7) V. Gomez-Alvarez et al., Metagenome analyses of corroded concrete wastewater pipe biofilms reveal a complex microbial system, *BMC Microbiology*, 12:122, 2012
- 8) Kim et al. Calcium carbonate precipitation by *Bacillus* and *Sporosarcina* Strains isolated from concrete and analysis of the bacterial community of concrete, *Journal of Microbiol Biotechnolo.* (2016) 26(3) 540-548
- 9) J. A. Maresca, Analysis of bacterial communities in and on concrete, *Materials and Structures* (2017) 50:25
- 10) 蔵富千奈ほか：コンクリートにおける微生物検出手法に関する基礎的検討，日本コンクリート工学会年次論文集，2022
- 11) B. O. Ortega-Morales et al, Orientation affects *Trentepohlia*-dominated biofilms on Mayan monuments of the Rio Bec style, *International Biodeterioration & Biodegradation* 84 (2013) 351-356
- 12) V. Vashist et al., A systematic review on materials, design, and manufacturing of swabs, *Annals of 3D Printed Medicine*, Vol.9, 2023, 100092
- 13) M. Kokubo et al.: Relationship between the Microbiome and Indoor Temperature/Humidity in a Traditional Japanese House with a Thatched Roof in Kyoto, Japan, *Diversity*, 13,475, 2021