

論文 異なる空隙構造を持つセメント系材料における微生物の量的変化

蔵富 千奈^{*1}・寺本 篤史^{*2}

要旨：コンクリートに生息する微生物はコンクリートが保持する水分や多孔質な空隙構造によって生育の程度が異なると考えられる。2つのコンクリート構造物に対して壁面のスワブ、トレント法による透気係数の測定を行い、微生物のDNA量と透気係数の関連性を調査した。また、構造物に空隙径の異なるセメント系サンプラーを設置しDNAの抽出を行った。その結果、微生物の生育に適する細孔径は0.1~10 μ m程度の範囲に存在すると考えられる。また、含水率変動は中長期的な微生物生息に影響している可能性が考えられた。

キーワード：微生物, DNA抽出, 空隙径分布, 透気係数, 含水率

1. はじめに

コンクリートは多孔質材料であり、建築物の供用期間中に細孔構造は経年変化する。例えば、コンクリートの代表的な劣化現象である中性化が発生すると、炭酸カルシウムの生成により、細孔溶液のイオン組成や細孔径分布に変化が生じる。また、アルカリ骨材反応(ASR)やエトリンガイトの遅延生成(DEF)などの膨張性劣化ではコンクリート内部に数十 μ m程度の微細ひび割れが発生し、場合によってはコンクリート表面に至るマクロなひび割れが発生する。このような空隙構造の変化やひび割れの発生は、コンクリート外部からの劣化因子の経路となることで劣化の進行を促進する。

緻密なコンクリートほど劣化因子の侵入が発生しづらいことから、コンクリートの品質を評価する因子として透気性が重要視されている。実コンクリート構造物の透気性を測定する方法として削孔法および表面法が挙げられるが、両者ともに結果が含水率に左右されること、専門の試験機が必要であること、測定位置の選定条件を考慮しなければならないなどの制限がある¹⁾²⁾。

著者らは、ヒトの健康状態が体温測定や唾液採取によるPCR検査など、特別な知識を持たない人にも実施できる方法でスクリーニングされるように、コンクリートに対しても微生物を用いたセンシングを導入することを着想した。

微生物は、雨水や有機物を含む汚れが表層の空隙構造に付着することで、建築材料上で繁殖することが分かっている。建築環境学分野では水が多く供給される環境における微生物(主にカビ)に関する研究が数多く報告されている。また、微生物は種ごとにそれぞれ大きさが異なる。コンクリートに生息する微生物はコンクリートが保持する水分や多孔質な空隙構造を条件として生育の程度が異なると考えられる。

コンクリート構造物から微生物試料を採取すること

でコンクリート構造物の状態が類推できるようになれば、専門技術者や機器を手配する必要が減じ、診断コストが大幅に削減されることや、構造物の損傷を最小限に抑えられることなどが期待される。

現状、コンクリート工学分野において材料の空隙構造と微生物の分布について体系的に論じた研究はほとんどなく、対象とする微生物を限定し、コンクリート側の性能を評価する研究事例がほとんどを占める。

本研究ではコンクリート構造物の材料性能および構造物を取り巻く環境が、コンクリート構造物に生息する微生物のDNA量に与える影響を調査した。また、構造物にセメント系材料で作製した空隙径の異なるサンプラーを設置し、空隙の粗密が微生物の生息量に及ぼす影響を検証した。

2. コンクリートの細孔構造と微生物

コンクリートは多孔質の材料であり、ゲル空隙や各水和物間に形成される毛細管空隙が多量に存在している。これらの空隙構造は使用材料や配(調)合、養生条件など様々な要因により変化する。コンクリートに発生する種々の劣化現象も細孔構造を変化させる要因であり、各種の劣化現象において細孔構造が変化するメカニズムが検討されている。

例えば、中性化が発生したコンクリート内では炭酸カルシウムが生成されて細孔径分布は小径側に移行し、数十nm程度の細孔の割合は小さくなり、10⁴~10⁵nmの細孔の割合が大きくなることが報告されている³⁾。

また、コンクリートの透気性に関与する細孔径に関して、羽原ら⁴⁾は数百nm以上の空隙との相関性が高いと述べている。氏家ら⁵⁾は円筒モデルを用いてコンクリートの透気性を空隙構造の観点から検討し、空気の粘性係数、全空隙率に加えてすべての空隙が透過に関与する場合の屈曲度を求め、透気に関与する細孔径を算出した結

*1 広島大学 先進理工系科学研究科 (学生会員)

*2 広島大学 先進理工系科学研究科 准教授 博士(工学)(正会員)

果、水セメント比が 40~60%のコンクリートの透気に関する細孔径は 350nm~546nm と算出している。

これらのナノオーダーの微細構造が、マイクロオーダーの寸法を持つ真核生物の生息領域になる可能性は低い、微生物の繁殖に必要な水分を保持する空隙として間接的に影響を与えている可能性は十分に考えられる。

なお微生物の生息領域の寸法に関して、コンクリートではそのデータは取得されていないものの、高分子表面に微細構造を転写し微生物付着量の制御を検討した研究⁶⁾が行われており、数十 μm と数 μm の二重構造が細菌および真菌の付着を抑制すること、数十 μm の表面構造が 5~10 μm の菌糸を持つ真菌類の付着量を顕著に増加させることが示されている。また、20~30 μm の格子状凹凸を有する微細構造を作製した高分子表面には麹菌類が強固に付着するとの報告もある⁷⁾。さらに、河床礫の表面構造に付着する微生物に着目した研究⁸⁾では、礫に形成される付着微生物群集は基層となる礫の表面構造を反映しており、岩石表面のクラックの大きさが支配的に存在する微生物に選択的に作用している可能性が示されている。

以上の既往研究からコンクリート表層部に生じる微細ひび割れのようなマイクロオーダーの空隙は、微生物の群集構造に影響を与えている可能性が高いと考えられるため、本研究では細孔構造が大きく異なるセメント系材料を用いて、細孔径分布が微生物の生息可能性に影響を及ぼしうるか検証を行った。

3. 調査概要

3.1 コンクリート壁面からの微生物採取

構造物壁面における微生物の多寡は壁面の材料特性および環境条件に左右されと考えられる。本実験では実コンクリート構造物壁面に付着している微生物を採取し、DNA を抽出することにより経時的な微生物量の変化を取得した。

(1) 微生物試料の採取

本実験ではスワブ法を用いて実構造物壁面から微生物試料の採取を行った。スワブ法とは滅菌されたガーゼや綿棒を用いてサンプリング面から微生物群集を採取す

る手法であり、本研究では乾燥したコンクリート表層を対象としているため採取効率を高めることを目的にスワブスティックを生理食塩水などの緩衝液に浸して湿った状態にして使用している。広島大学では 300×300mm、東広島消防署では 150×150mm の枠内を、生理食塩水に浸したスワブスティック (FLOQSwabs® 518C, Copan 社) で縦横にまんべんなくこすり取った。スワブスティックの先端は乾くたびに生理食塩水に浸し、使用した生理食塩水は孔径 0.22 μm のフィルターユニットで濾しとって回収した。採取日ごとに採取面を近接する面に移動して微生物を採取した。

微生物試料を採取したスワブスティックおよびフィルターはクーラーボックス内に保管し、おおよそ 3 時間以内に実験室に持ち帰った。DNA 抽出作業まで -80℃ の冷凍庫内に保管した。

(2) コンクリート壁面の粗密計測

コンクリート造屋外壁面の細孔構造の粗密と微生物の生息状況の関連性を調査するにあたり、本実験では透気係数によって壁面の密実性を評価した。透気係数はトレント法を用いて計測し、広島大学内の RC 建屋および東広島消防署の RC 壁面を対象に約 3 か月毎に調査を実施した。

3.2 セメント系サンプラーからの微生物採取

材料の細孔構造により水分保持力および微生物が生息する空間量が異なると考えられる。本実験では細孔構造が異なるモルタルサンプラーを作製し、実構造物壁面に設置して経時的に抽出される DNA 濃度および含水率を取得した。

(1) 試験体概要

本実験で試験体は松崎ら⁹⁾が開発した毛細管空隙を多量に有するセメント系材料を使用した。サンプラーの作製には、結合材として市販の普通ポルトランドセメント、骨材として砂およびフライアッシュを用いた。サンプラーの作製に使用した材料および配 (調) 合を表-1 に示す。wcf300, wcf500 はフライアッシュを外割 100%とした。表-1 の配 (調) 合条件で寸法 40×40×160mm の型枠に成型後、アルミテープで封緘養生を施し 60℃環境で

表-1 モルタル系サンプラーの配 (調) 合表

調合名	使用骨材	水セメント比 W/C(%)	骨材セメント比 A/C(%)	単位量(kg/m ³)		
				水	セメント	骨材
wc55	砂 (広島県東広島市黒瀬産石 英斑岩砕砂)	55	255	295.3	536.9	1369.1
wcf300	フライアッシュ	300	900	405.2	135	1215.6
wcf500	(中国電力三隅発電所産 JIS A 6201 II種)	500		531.7	106.3	958

7日間促進養生を行った。本実験で使用したサンプラーは40×40×160mmの角柱試験体を5mm厚程度に切断したものである。

サンプラーに曝露環境の微生物を付着させ、そのDNAを抽出するためには曝露前の微生物の影響は極力排除する必要がある。そこでサンプラーを切断した後、75%エタノールに24時間浸漬し、その後、75%、100%、100%エタノールに順次2時間ずつ浸漬させた。乾燥物に対して高濃度のエタノールでは微生物の不活化作用の低減が生じることが明らかになっており、70~80%エタノールの使用が一般に採用されている¹⁰⁾。本実験では75%エタノールを2回使用することで滅菌の完成度を高めた。100%エタノールを2回使用しているのは、試料から水分を吸収させ、モルタル中の水分を低下させることで乾燥中にセメントの水和が減少し、微細な構造変化を最小限に抑えるためである。最後に、滅菌したサンプラーを60℃の恒温槽で24時間乾燥させ、エタノール分を揮発させた。

(2) 細孔径分布測定

多くの真核生物の体長は数μm程度である。多孔質材料の内部に微生物が生息する場合には、微生物は空隙径を下回る大きさでなければ侵入できないと考えられる。

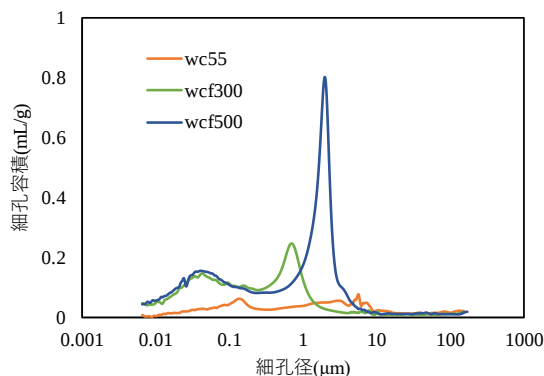


図-1 セメント系サンプラー細孔径分布

本実験で使用したセメント系材料は微生物の侵入可能性を考慮して空隙径分布を規定した。

各種サンプラーに対して水銀圧入式ポロシメータにより細孔径分布を測定した。細孔径および細孔容積を図-1に示す。水セメント比55%の普通モルタル製のサンプラーは0.1μm付近に細孔容積のピークを持つ。また水セメント比300%のサンプラーは0.7μm付近、水セメント比500%のサンプラーは2μm付近に細孔容積のピークを持つことが確認できる。

(3) 曝露試験

サンプラーを広島大学のRC造建屋の屋外壁面に設置し、約3ヵ月ごとに採取した。広島大学内RC造建屋の屋外壁面は南北に面している。設置箇所の外観を図-2に示す。スワブ法は図中四角形の範囲内、透気係数の測定は図中の丸印で行った。

また、東広島消防署のRC造屋外壁面、および執務室内壁面にもサンプラーを設置し、約3か月ごとに採取した。東広島消防署は屋内外の両壁面ともに打放しコンクリート仕上げである。本実験で設置対象としている屋外壁面は、一枚の壁の裏表両面からアクセスすることができ、本実験では片面に屋根を設置することで同一壁面上

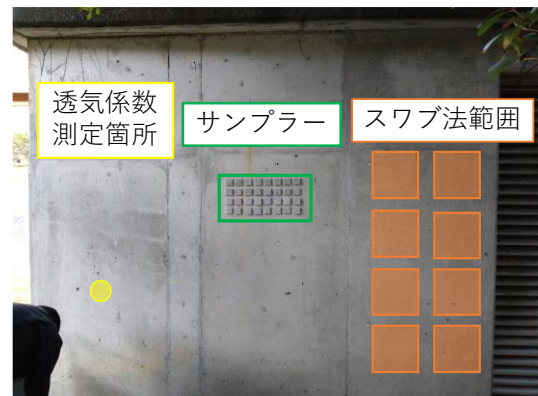
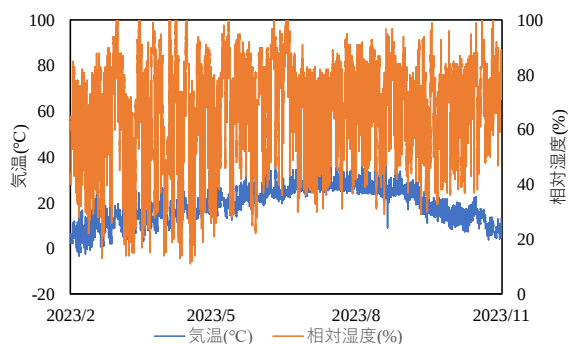
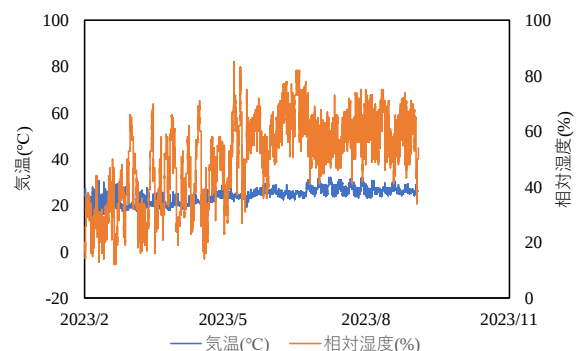


図-2 広大壁面外観（南面）



(a) 屋外壁面



(b) 屋内壁面

図-3 東広島消防署内の微生物試料採取箇所における温湿度

に雨がかり環境が異なる実験系を用意した。

東広島消防署内の微生物試料採取箇所から取得した温湿度を図-3に示す。設置上の不具合のため、2023年9月25日以降の屋内の温湿度データが欠損している。

サンプラーは設置地点のコンクリート壁面に3種類(wc55, wcf300, wcf500)×8枚ずつを両面テープで貼り付け、約3か月毎に1枚ずつ回収した。設置箇所から回収した後はクーラーボックス内に保管し、おおよそ3時間以内に実験室に持ち帰った。

実験室に持ち帰った後、含水率測定のためにサンプラーを3g程度の破片に砕いて質量を測定し、105℃の恒温槽にて24時間以上乾燥し、再び絶乾状態の質量を測定した。含水率測定用の破片に使用しなかった残りの試料はDNA抽出作業を実施するまで-20℃の冷凍庫で保管した。

(4) DNA抽出・濃度測定

本実験ではDNeasy PowerBiofilm Kit (QIAGEN)を使用し、著者らが報告しているDNA抽出プロトコル¹¹⁾に沿ってDNA抽出を行った。DNA抽出後、微量分光光度計(DS-11FX, Denovix社)を用いて蛍光度を測定し、DNA濃度を取得した。

4. コンクリート壁面の透気係数と抽出されたDNA濃度

4.1 コンクリート壁面から検出されたDNA濃度

広島大学内の屋外壁面から検出されたDNA濃度および透気係数の経時変化を図-4に示す。本実験では、(A)前回スワブを行った同一の面から採取する方法と、(B)同一壁面内でスワブの箇所を変えていく方法の二つのスワブ法を実施している。これは、一度のスワブ作業においてどの程度の微生物群集が取り除かれ、また、取り除かれた試験面に再度微生物が付着する時間と量を確認するためである。

(A)のスワブ後も同一箇所から採取を続けた実験結果に着目すると、二回目の採取時にDNA濃度が大きく減少し、その後夏季に再び増加している傾向が確認された。この結果から、スワブによって壁面からそぎ落とされた微生物群集が再び成長するまでの期間は少なくとも3か月以上必要であり、その速度は季節に依存することを資させている。一方、(B)の採取面を毎回変えて採取した試料は、測定回を追うごとにDNA濃度が増加する傾向が見られた。このことから微生物群集は立体的に成長する可能性が示唆される。

次に透気係数の実験結果を見ると北面は南面と比較して透気係数が小さく、またいずれの壁面でも透気係数の季節変動はほとんど見られなかった。

次に、東広島消防署内の屋内・屋外壁面から検出されたDNA濃度および透気係数を図-5に示す。なお、東広

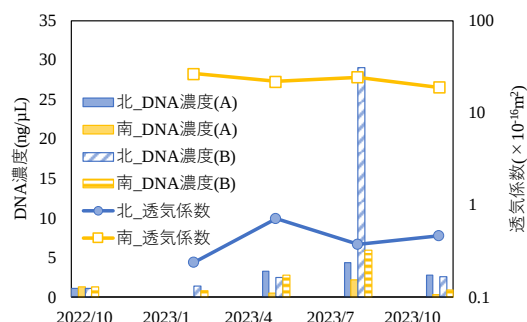


図-4 広島大学内壁面から検出されたDNA濃度および壁面の透気係数の経時変化

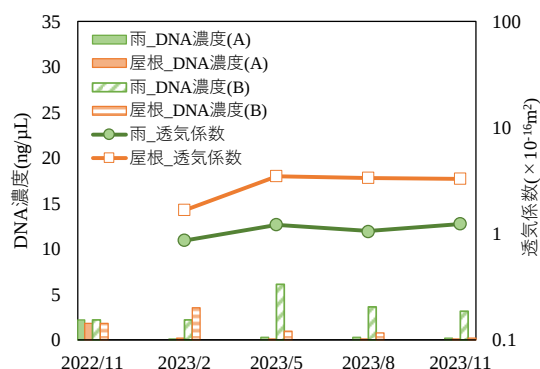


図-5 東広島消防署内壁面から採取されたDNA濃度および壁面の透気係数の経時変化

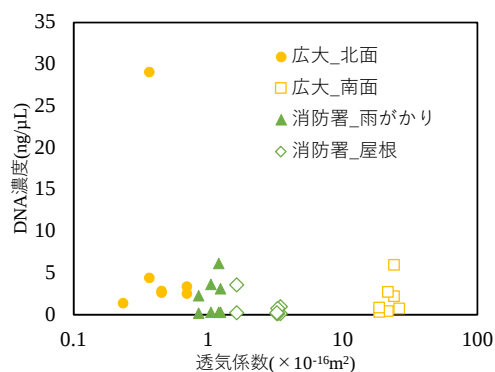


図-6 壁面におけるDNA濃度および透気係数

島消防署では屋内のRC壁面でも微生物の採取を実施しているが、屋内試料のDNA濃度は極めて低い値を保ったことからこの図には記載していない。

図-5の外壁面における雨がかりの有無に着目すると、雨がかりがない壁面では、1年を通してDNA濃度が小さく、2月の測定値が最大であるのに対し、雨がかり面では5月が最大であった。

また、透気係数の経時変化に着目すると雨がかりがない壁面が常に大きい透気係数を示した。この結果の一つの要因として定期的に雨水が供給されることにより、雨がかりがある壁面では表層の含水率が高く保たれていることが挙げられる。

透気係数と DNA 濃度(A), (B)の相関を示したものが図-6である。壁面から検出される DNA 濃度は透気係数に関わらずおおそ 5ng/μL 以下となり、透気係数と DNA 濃度には相関が見られなかった。2 章で述べたように、コンクリートの透気性は気体分子が移動することができる連続空隙の量および空隙内に移動を阻害する流体の有無によって決定し、数十から数百ナノメートルの空隙が大きな役割を果たす。図-6 にあるように広島大学内の外壁南面は他の測定箇所と比較して有意に透気係数が大きく粗大な空隙を有していると推察されるが、採取された DNA 濃度は他の試料と同等であった。このことから、本実験の範囲内では、一桁程度の透気係数差で評価される空隙構造の粗密は微生物の生育にほとんど影響しないと考えられる。

4.2 セメント系サンプラーから検出された DNA 濃度

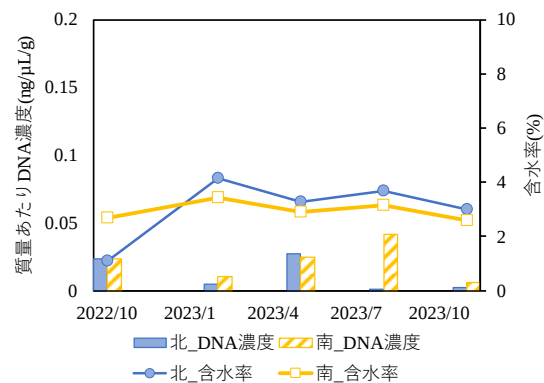
次に、マイクロオーダーの空隙径が微生物の生息に及ぼす影響を確認するため、セメント系サンプラーの比較を行う。

広島大学内に設置したセメント系サンプラーの質量あたり DNA 濃度および含水率の経時変化を図-7(a), (b), (c)に示す。図-7(a)に示すデータより wc55 では季節変動による DNA 濃度の増減はほとんど見られなかったものの、図-7(b), (c)に示すマイクロオーダーの空隙を有する wcf500 では DNA 濃度が春季から夏季にかけて増加し、秋季に向けて減少する傾向が見られた。また、北面の wcf500 では秋にかけても一様に増加傾向が継続していた。これらの変化は粗大な空隙内での微生物の省庁や、雨水などによる外部からの微生物の流入を示唆している。いずれの場合も 3 種のサンプラーを比較すると水セメント比が高いほど DNA 濃度の変化量が大きくなる傾向が見られた。

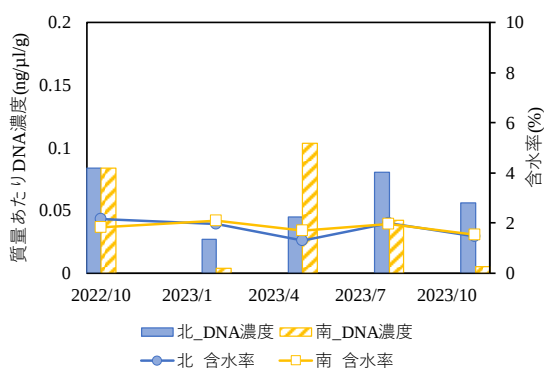
東広島消防署内の雨がかりのある屋外壁面に設置したセメント系サンプラーの質量あたりの DNA 濃度および含水率の経時変化を図-8 に示す。wc55 から抽出された DNA 濃度は極めて低い値を示しており経時的な変化がほとんど見られないのに対し、wcf300 および wcf500 の DNA 濃度は冬季から夏季にかけて DNA 濃度が向上し、wc55 の DNA 濃度と比較して数十倍から数千倍の値を示した。

以上の調査結果から、マイクロオーダーの空隙を持つサンプラーでは含水率の小さな変動に対して、DNA 濃度の絶対値および変化量が大きくなる傾向が確認された。

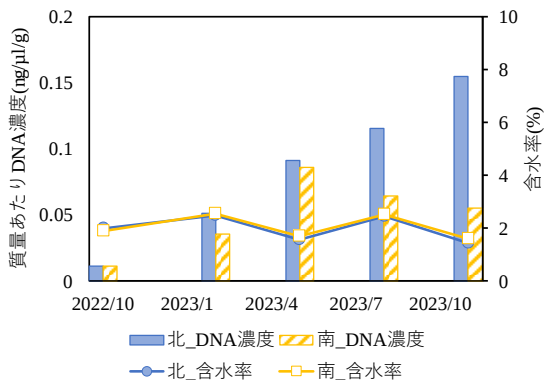
本研究と同様の傾向は石灰石を用いた実験でも確認されており、石灰石表層部における微生物の付着量を測定した既往研究¹²⁾では、0.1~1μm の細孔を多量に有する石灰石は空隙率の低い石灰石に対して 2 倍以上の細菌培養液を吸収し、微生物付着による質量増加が確認されて



(a) wc55



(b) wcf300



(c) wcf500

図-7 広島大学壁面に設置したサンプラーから抽出された DNA 濃度および含水率の経時変化

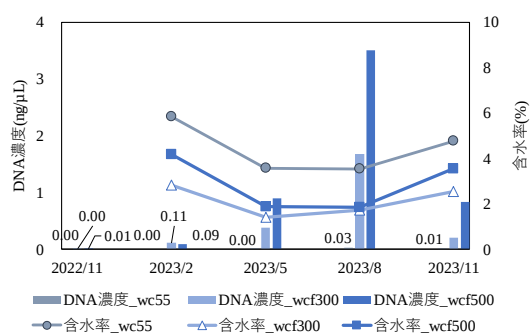


図-8 東広島消防署内壁面に設置したサンプラーから抽出された DNA 濃度および含水率の経時変化

いる。特に 1~10 μm の細孔構造を有する石灰石では石材の表面および内部に生物由来の結晶層が多量に形成されたことからマイクロオーダーの空隙は微生物の侵入および生育に適した細孔径であると推察される。

図-9 にサンプラーにおける DNA 濃度および含水率を示す。多数の試料において DNA 濃度が 0.5ng/ μL 以下、含水率が 6%以下の範囲に存在した。本実験で利用したサンプラーは特有の空隙構造を有するため、含水率 6%の時にどの空隙まで水で満たされる可能性があるのかを算出することが困難であるが、ALC では含水率 6%の時に 0.01 μm 程度以下の空隙まで吸着水が存在しているとの試算が報告されている¹³⁾。つまり、一般的な細菌の大きさと比較して 10~100 倍程度小さい径の細孔にしか吸着水が存在していないことになる。このことから環境湿度の変化によって生じる吸着水量の変化が、微生物が生息するような粗大な空隙中の水分量を直接表しているとは考えにくい。

一方で、季節変動に伴う DNA 濃度の変化が生じていることは事実であり、季節性の降雨により土壌微生物の群集構造や活性が変化する¹⁴⁾という既往研究を踏まえると、雨水の供給の影響を含めた含水率の履歴が中長期的な微生物生息に影響を与えている可能性が考えられる。

文献 14)では、降雨や季節変動が土壌中に存在する有機物に影響を与え、それが微生物群集の変化をもたらしている可能性が報告されており、コンクリートの細孔溶液中の有機物の変動も微生物の増減に寄与する可能性がある。

5. 結論

マイクロオーダーの空隙を持つサンプラーでは、含水率の変動に対して DNA 濃度の絶対値および変化量が大きくなったことから微生物の生息において 0.1~10 μm の微細な空隙構造が微生物群集構造の構成に重要な役割を果たしている可能性がある。また、コンクリート中の微生物挙動を把握するために水セメント比の大きい、コンクリートのごく表層部の情報に着目することが有用であると考えられる。

謝辞

本研究は、JST の創発的研究支援事業、科研費挑戦的研究（萌芽）(22K18845)、JCI 中国支部研究委員会の補助を受け実施した。

参考文献

- 1) 今本啓一、下澤和幸、山崎順二、二村誠二：実構造物の表層透気性の非・微破壊試験方法に関する研究の現状、コンクリート工学, Vol.44, No.2, pp.31-38,

2006

- 2) 半井健一郎ら：道路政策の質の向上に資する技術研究開発成果報告レポート No.28-6 新設コンクリート構造物における表層品質検査手法の確立、新道路技術会議, 2019
- 3) 佐伯竜彦, 大賀宏之, 長滝重義：中性化によるコンクリートの微細組織の変化, 土木学会論文集, 第 420 号/V-13, pp.33-42, 1990.8
- 4) 羽原俊祐, 沢木大介：硬化コンクリートの空隙構造とその物性, 石膏と石灰, No.240, pp.28-37, 1992
- 5) 氏家勲, 檜崎正尚, 長滝重義：コンクリートの透気性状と酸素および塩素イオンの拡散性状に関する研究, コンクリート工学年次論文報告集, Vol.15, No.1, pp.519-524, 1993
- 6) Osawa, S., Yabe, M., Miyamura M. and Mizuno, K.: Preparation of super-hydrophobic surface on biodegradable polymer by transcribing microscopic pattern of water-repellent leaf, Polymer, Vol.47, pp.3711-3714, 2006
- 7) 大澤敏, 谷田育弘, 成田武文：微細構造を有する生分解性高分子表面への微生物付着特性, 高分子論文集, Vol.67, No.2, pp.104-109, 2010.2
- 8) 國安理奈子, 森川和子：河床における礫の表面構造と付着微生物群集, 陸水学雑誌, Vol.67, pp.95-103, 2006
- 9) 松崎雅俊, 寺本篤史：フライアッシュを細骨材として活用した高吸水セメント系材料の開発に関する研究, 日本建築学会学術講演梗概集（北海道）, pp.625-626, 2022
- 10) 渡辺実, 野田伸司, 山田不二造：アルコール類のウイルス不活化作用に関する研究 エタノール消毒における生態試料の影響, 感染症学雑誌, 第 55 巻, 第 5 号, pp.367-372, 1981
- 11) 蔵富千奈, 寺本篤史, 藤吉奏, 丸山史人：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, コンクリート工学年次論文集, Vol.44, No.1, pp.1300-1305, 2022
- 12) Muynck, W.D. et al.: Influence of Pore Structure on the Effectiveness of a Biogenic Carbonate Surface Treatment for Limestone Conservation, Applied and Environmental Microbiology, Vol.77, No.19, pp.6808-6820, 2011
- 13) 多田眞作：ALC の空隙構造と水分特性, コンクリート工学論文集, Vol.1, No.1, pp.155-164, 1990
- 14) Pajares, S., Campo, J., Bohannan, B.J.M., Etchevers, J.D.: Environmental Controls on Soil Microbial Communities in a Seasonally Dry Tropical Forest, Applied and Environmental Microbiology, Vol.84, Issue 17, pp.1-19, 2018