

論文 吹付けコンクリートへのひび割れ自己治癒機能の付与を目的とした バクテリアの増殖性に及ぼす急結剤添加の影響の検討

川崎 浩長^{*1}・大橋 英紀^{*2}・春木 満^{*3}・Sanjay PAREEK^{*4}

要旨：トンネルを構成するコンクリートはひび割れや目地から漏水する可能性がある。この条件はバクテリアによるひび割れ自己治癒に適している。そこでバクテリアの増殖性に及ぼす吹付けコンクリート用急結剤添加の影響を検討する培養実験を行った。濁度測定や顕微鏡観察により増殖の傾向を把握し、pH の測定により濁度測定の欠点を補いつつ実験結果を裏付けることができた。本研究で用いた 2 種類の急結剤はバクテリアの増殖性には大きく影響せず、吹付けコンクリートへのバクテリアによるひび割れ自己治癒機能の付与の実現が期待できる。

キーワード：吹付けコンクリート, 急結剤, ひび割れ, 自己治癒, バクテリア, 増殖性, 長寿命化

1. はじめに

温室効果ガスの排出量増加に伴う地球温暖化の進行が問題視され、日本においては 2021 年 6 月に『2050 年カーボンニュートラルに伴うグリーン成長戦略¹⁾』が策定された。本戦略中ではセメント・コンクリート分野に関しても言及されており、既に脱炭素社会の実現に向けた様々な建築材料等の研究が行われている。その 1 つとして、バクテリアによりコンクリートのひび割れを自己治癒することが構造物の長寿命化により点検・補修や建替えに伴う CO₂ 排出の削減につながると期待されている。

これまでは、バクテリアとその栄養分で構成される混和材（以下、HA）を研究対象とし基礎的検討を実施した。コンクリート等の内部の pH を想定した培養実験や HA を添加したモルタルのひび割れに対する通水試験により、バクテリアによりひび割れの自己治癒がなされたことを確認した^{2), 3)}。

バクテリアを用いた自己治癒コンクリートの普及を促進するためには、様々な適用条件にてひび割れ治癒性能を示す必要がある。本研究ではトンネルの劣化機構に着目した。トンネルを構成するコンクリートにひび割れが発生した後、既設の排水機能の阻害や集中的な降雨が生じた場合にひび割れや目地から漏水する可能性がある⁴⁾。国土交通省発行の『道路トンネル定期点検要領⁵⁾』においてもひび割れや漏水も着目すべき点として挙げられており、これらへの対策の重要性が分かる。漏水はさらなるひび割れの拡大や交通の安全性の低下に繋がるため、早期のひび割れ補修が要求される。また、バクテリアが活性化しより高い自己治癒性能を発揮するためには栄養分や酸素に加え水分の供給が重要となる。トンネルのひ

び割れはバクテリアが治癒するのに適していると言える。さらに、バクテリアを用いた自己治癒コンクリートをトンネルに適用する試みは調査の限りでは見当たらなかったことから、本研究では吹付けコンクリートへのひび割れ自己治癒機能の付与を目的とした基礎的検討を実施した。バクテリアの活動を促進する培地に HA とコンクリート用急結剤を添加して培養し、バクテリアの増殖性に及ぼす急結剤添加の影響を検討した。

2. 実験詳細

2.1 実験概要

コンクリート等のひび割れ内部への水分供給による間隙水の pH 低下を想定した既往の培養実験³⁾では、低下前とした pH 12 ではバクテリアは活動せず低下後の pH 11, 10 では増殖が確認された。このことから本研究では漏水によるさらなる pH 低下を想定し pH9 の培地を使用した。pH9 におけるバクテリアの増殖性を確認するとともに、2 種類の急結剤をそれぞれ添加したサンプルを用意し増殖性への影響を検討した。

2.2 使用材料

本研究には、バクテリアとその栄養分である乳酸カルシウムに変化するポリ乳酸を混合した混和材（HA）、菌や細胞の培養に広く用いられる LB 培地、2 種類のコンクリート用急結剤（以下、L 及び P）を用いた。

図-1 に本研究に用いた HA を示す。既往の研究³⁾で用いた改良型の混和材である。これに含まれるバクテリアは好気性かつ好アルカリ性である枯草菌の一種（*Bacillus* 属の一種）であり、芽胞の形で添加されている。LB 培地の組成は培地 1L 当たりトリプトン 10.00g、塩化

*1 日本大学大学院 工学研究科建築学専攻 修士（工学）（学生会員）

*2 戸田建設（株） 技術研究所 社会基盤再生部 修士（工学）（正会員）

*3 日本大学 工学部生命応用化学科教授 理学博士

*4 日本大学 工学部建築学科教授 博士（工学）（正会員）

ナトリウム 10.00g, イーストエキス粉末 5.00g, リン酸水素二ナトリウム 1.42g, リン酸二水素ナトリウム 1.56g であり, 5M 水酸化ナトリウム水溶液を用いて pH9 に調整した。

表－1 に用いた急結剤の概要を示す。急結剤には, 酸性液体急結剤とカルシウムアルミネート系粉体助剤から成る急結剤 L とカルシウムアルミネート系粉体急結剤 P の 2 種類を使用した。

2.3 試験方法

試験管に LB 培地を 5mL, HA を 0.02g, 急結剤 L あるいは P をとりサンプルとし, 図－2 に示すように試験管を設置した濁度計を取り付けた中型恒温振とう培養機を用いて振とう培養を行った。培養温度は一般的に用いられる 37℃とした。急結剤の添加量について, L は主剤 0.01g-助剤 0.005g (以下, 1L), 0.02g-0.01g (2L), P は 0.01g (1P), 0.02g (2P) とした。急結剤の添加により培地の濁度が増加するため, 測定光の透過を検知し濁度の変化を計測できる範囲の添加量とした。振とうはより多くの酸素をバクテリアに供給し, かつ安全性と正確性を確保した最大速度を採用した。また, 液面の面積を大きくして培地中に酸素を供給するエアレーションを効率よく行うため, また攪拌性を向上し液中のバクテリアや急結剤粒子を培地中に均等に分散させ濁度の誤差を小さくするため, 設定可能な最も水平に近い角度である 30°に試験管を倒して培養した。なお, 試験管を密封しているが,



図－1 バクテリアとその栄養分を混合した混和材 (HA)

表－1 急結剤の概要

種類	密度 (g/cm ³)	主成分
L(主剤)	1.35	アルミニウム水溶性塩
L(助剤)	2.86	カルシウムアルミネート系
P	2.64	カルシウムアルミネート系

増殖に十分な酸素量が確保されていることを確認した。バクテリアの増殖によりサンプルが白濁するため, 同時に濁度計により濁度 (OD₆₀₀) を測定した。濁度が早く上昇するほどバクテリアの活動にとって適した環境ということになる。濁度は 0.00-2.55 まで測定可能であり, それ以上の値は 2.55 と表示される。急結剤粒子による濁度のばらつきの影響を考慮し測定間隔は 30min とした。条件ごとにサンプルを 3 本ずつ用意してその濁度の平均値を算出した。急結剤の添加が濁度の測定値に何らかの不具合をもたらすことを想定し, 培養後 (36 時間後) にサンプルの写真撮影, 顕微鏡観察, pH 測定も併せて実施した。細径電極の pH テスターを試験管内サンプルに挿入することで pH を測定した。

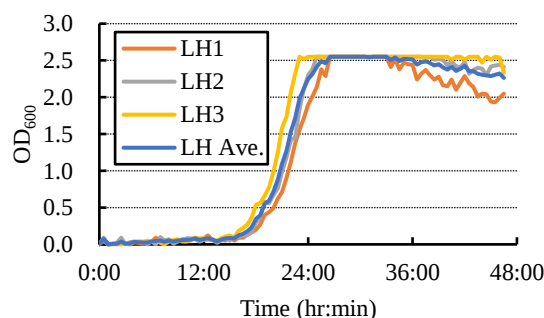
3. 実験結果

3.1 LB 培地と HA のみ

図－3 に LB 培地 5mL と HA 0.02g のみのサンプル (以下, LH) の時間の経過に伴う濁度の変化を示す。培養開始から約 15 時間後に濁度の上昇すなわちバクテリアの増殖が確認できた。3 サンプル全てにおいて約 24 時間後に濁度計が測定可能な最大値である 2.55 に達した。約 36 時間まではさらなる増殖をしたあるいはこれ以上バクテ



図－2 中型恒温振とう培養機



図－3 LB 培地と HA のみ (LH) の濁度 (OD₆₀₀)

リアが増殖しない定常期にあったと考えられる。その後は養分切れあるいは過剰な増殖防止のため、芽胞の形成による濁度の上昇や死滅と溶解による濁度の減少が混在し、濁度がばらつきつつ減少したと考えられる。これ以降は減少が継続するため約 48 時間で試験を終了した。その他の条件では増殖性の検討のため、本条件の濁度が測定可能な最大値 2.55 に到達したと判断できる 36 時間までの濁度に注目する。

3.2 急結剤 L の添加 (1L, 2L)

図-4 に LB 培地 5mL, HA 0.02g, 急結剤 L 主剤 0.01g-助剤 0.005g (1L) のサンプルの濁度測定の結果を示す。ばらつきが大きくなった原因としては培地中の急結剤粒子の影響が考えられる。1L の濁度増加の開始時期のばらつきについては、1L の急結剤の濃度が芽胞からの増殖開始に影響を与える臨界濃度付近である可能性が考えられる。LH と比較して増殖速度の低下は見られるものの 1L Ave. の最大濁度は 2.49 でありバクテリアは十分に増殖したと言える。

図-5 に LB 培地 5mL, HA 0.02g, 急結剤 L 主剤 0.02g-助剤 0.01g (2L) のサンプルの濁度測定の結果を示す。培地中の急結剤粒子の影響と見られるばらつきは生じた。LH や 1L と比較して増殖開始に遅延が見られるのは、急結剤の濃度が高く、芽胞からの増殖開始に与える影響が

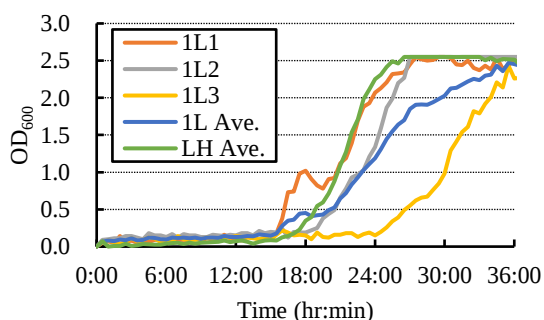


図-4 L 主剤 0.01g-助剤 0.005g (1L) を添加した濁度

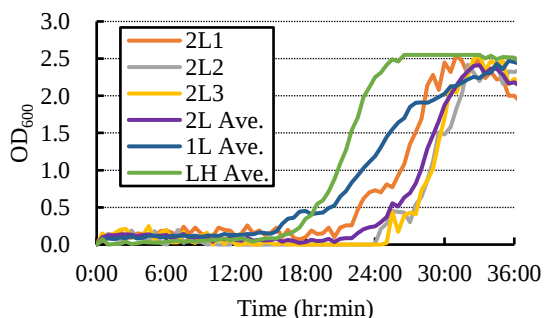


図-5 L 主剤 0.02g-助剤 0.01g (2L) を添加した濁度

大きいと考えられる。その後は 2L Ave. の濁度が他条件と同程度の 2.41 まで上昇したことからバクテリアが増殖に至ったことが確認できた。

以上より、急結剤 L の添加はバクテリアの増殖開始を遅延させるものの十分な増殖が確認できたことから吹付けコンクリート中でもひび割れを治癒することが期待できる。

3.3 急結剤 P の添加 (1P, 2P)

図-6 に LB 培地 5mL, HA 0.02g, 急結剤 P 0.01g (1P) のサンプルの濁度測定の結果を示す。急結剤粒子が大きいことが原因と考えられる試験管上部内壁への付着が発生し、濁度が 0 以下 (表示値は 0) になった。24 時間後に粒子を液中に戻したもののその後の濁度上昇から既にバクテリアが増殖していた可能性があったため測定を中止した。

そこで設定角度を 45° とし再度実験を行うこととした。角度により濁度の上昇の傾向に違いが生じると考え、LH 同士で比較した結果を図-7 に示す。LH30° Ave. は前出の LH Ave. と同様のデータである。45° のほうが 6 時間程度早く濁度の上昇が始まり、また一定期間内に細胞数が 2 倍に増える対数増殖期の勾配も大きく、早く終わる結果となった。これらの原因としては、角度を大きくしたことで攪拌性が低下してバクテリアが培地下部に集中し濁度の上昇として感知されやすくなったことが考えられる。45° はその後緩やかに上昇を続け、濁度が 2.55 に

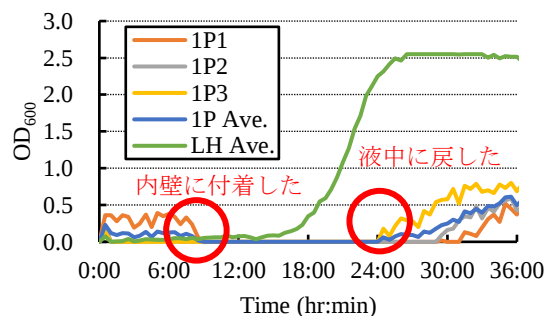


図-6 内壁への付着を生じた 1P の濁度

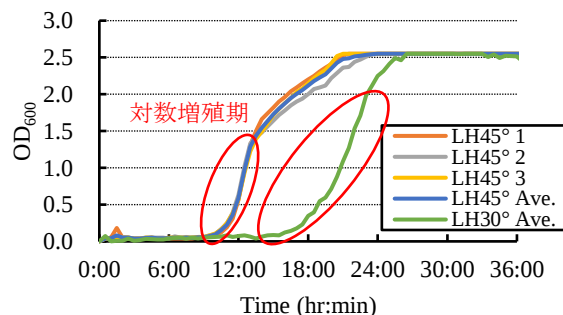


図-7 設定角度による濁度変化の比較

達した。これらのことは P の測定においても確認されると推測された。

図-8 に LB 培地 5mL, HA 0.02g, 急結剤 P 0.01g (1P) のサンプルの濁度測定の結果を示す。P においても培地中の急結剤粒子の影響と見られるばらつきは生じた。LH30° Ave.と比較してバクテリアの増殖開始が早いのはやはり角度の影響であると考えられる。LH45° Ave.とは増殖開始に大きな違いはなかったものの、対数増殖期の曲線が緩やかであった。その後も緩やかに上昇するものの 36 時間までの 1P Ave.の濁度の最大値は 0.99 であった。これは後述するサンプルの外観変化(図-12)から推察できることとして、試験管の角度を 45°にしたことにより攪拌性が低下し徐々に P の粒子の沈殿が生じたことで濁度の低下が起こり、急結剤とバクテリア濁度を合わせた見かけの濁度から、急結剤の濁度が差し引かれたことが挙げられる。その後はさらに濁度が上昇したサンプルも見られたが定常期を過ぎた LH のようなばらつきを生じた。以上のことから L の場合のような添加時の増殖開始の遅延を引き起こす可能性は低いものの、沈殿の影響を受けるため P の場合はバクテリアの濁度の上昇をはっきりと捉えることができなかった。

図-9 に LB 培地 5mL, HA 0.02g, 急結剤 P 0.02g (2P) のサンプルの濁度測定の結果を示す。1P と同様の傾向が

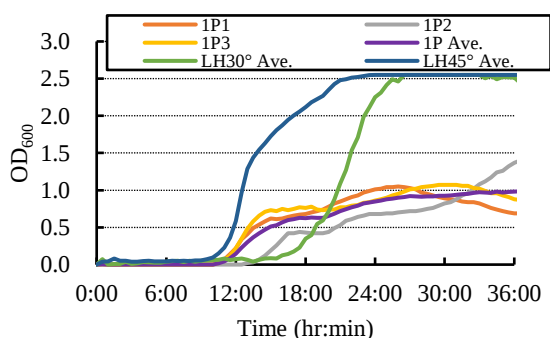


図-8 P 0.01g (1P) を添加した濁度

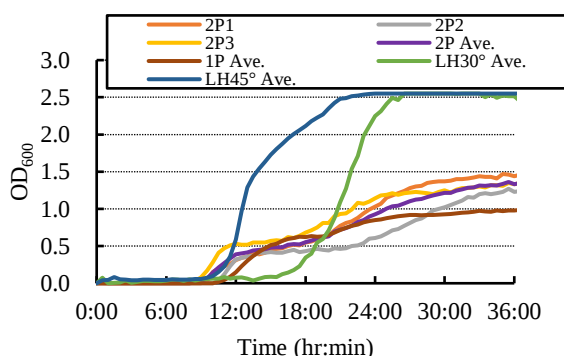


図-9 P 0.02g (2P) を添加した濁度

得られた。対数増殖期を含め緩やかに上昇し 36 時間までの 2P Ave.の濁度の最大値は 1.36 であった。その後も 1P と同様にばらつきが拡大した。

以上より、急結剤 P を添加した場合には角度を大きくすることで急結剤を液中に留まらせることはできたが沈殿を生じたためバクテリアの増殖を濁度として正確に捉えることはできなかった。しかしながら同様に好アルカリ性かつバシラス属の一種であるバクテリアを用いた研究⁹⁾では、OD₆₀₀が 0.8 程度でも十分にバクテリアが増殖して炭酸カルシウムを生成し、微細ひび割れを閉塞したことが報告されているため、L 及び P を添加した場合においてもひび割れ自己治癒効果が期待できる。

3.4 外観変化の撮影

図-10 に LH, 図-11 に 1L 及び 2L, 図-12 に 1P, 図-13 に 2P それぞれの培養前後のサンプルを撮影したものを示す。左端の透明なサンプルはイオン交換水である。LH では培養後に白濁しておりバクテリアが増殖したことが確認できた。L については急結剤の添加により培養開始時点で濁度が高かったことが分かるが、培養後にはさらなる濁りが確認できバクテリアが増殖したと分かる。P については 3.3 で述べたように濁度の低下の原因とみられる急結剤の沈殿が確認された。

3.5 顕微鏡によるバクテリアの撮影

HA や急結剤 L, P とともに滅菌された材料ではないため、顕微鏡を用いてサンプルを観察することは望ましい

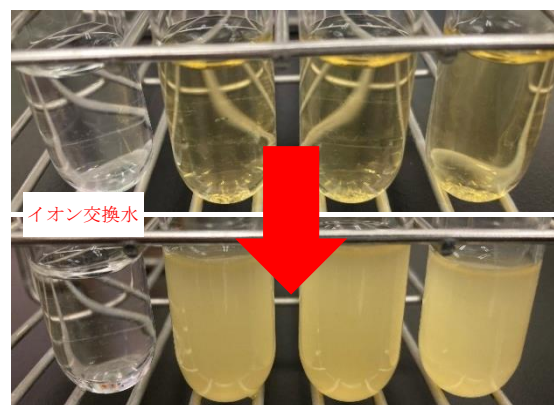


図-10 LH の培養前(上)と後(下)のサンプル

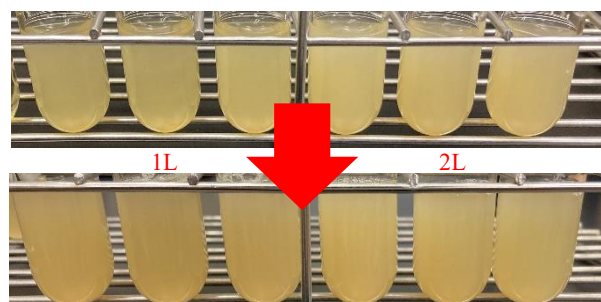


図-11 1L と 2L の培養前(上)と後(下)のサンプル

バクテリアが増殖していることを確認するのに有効である。図-14に LH, 図-15に 1L, 図-16に 2L, 図-17に 1P, 図-18に 2P を顕微鏡にて撮影 (1000 倍) したものを示す。バクテリアの代表的な例を○で囲んで示した。LH においてはバクテリアが大量に存在し層を成していたためその一部分のみの撮影が可能であった。L, P ともに LH ほどではないもののバクテリアの存在が確認できた。1P, 2P のサンプルについては撮影時に LH の定常期後のような大きなばらつきが生じ、撮影写真にも同様の傾向が確認されたため 3 サンプルのうちバクテリアの量が中間に位置するものを示す。

どのサンプルにおいてもバクテリアは増殖しておりその形状や大きさから増殖したのは同一のものであることが確認できた。

3.6 pH 測定

バクテリアは乳酸カルシウム ($\text{Ca}(\text{C}_3\text{H}_5\text{O}_3)_2$) を分解し、炭酸カルシウム (CaCO_3), 二酸化炭素 (CO_2) 及び水 (H_2O) を排出する。式(1)にこの化学反応式を示す。



このことからバクテリアが排出する CO_2 が培養液中に溶

出し培地の pH を低下させ、バクテリアの増殖性が高いほど pH の低下が著しくなることが推察される。図-19に各サンプルを作製する段階ごと及び培養後に pH を測定した結果を示す。条件ごとの平均値を用いた。LB 培地のみでは終始同様の pH であった。サンプル作製段階においては、HA は培地の pH を変化させず、急結剤添加の影響についてはそれぞれの液性及び添加量が反映された。1L, 2L で同程度まで pH が低下したことは 1L のほうがバクテリアの活動が活発だったことを裏付けている。1P, 2P ともに急結剤添加後には LH よりも pH が高くなったにもかかわらず LH と同程度まで pH が低下した。濁度

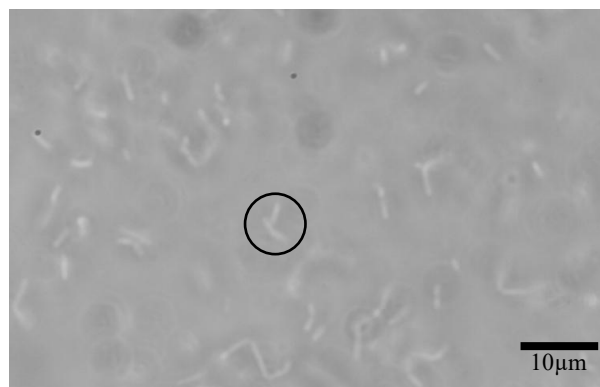


図-14 LH 中のバクテリア (×1000)

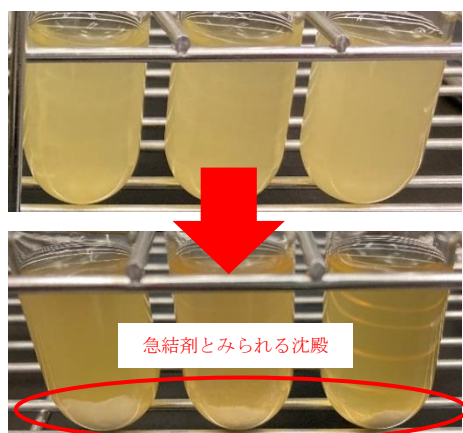


図-12 1P の培養前 (上) と後 (下) のサンプル

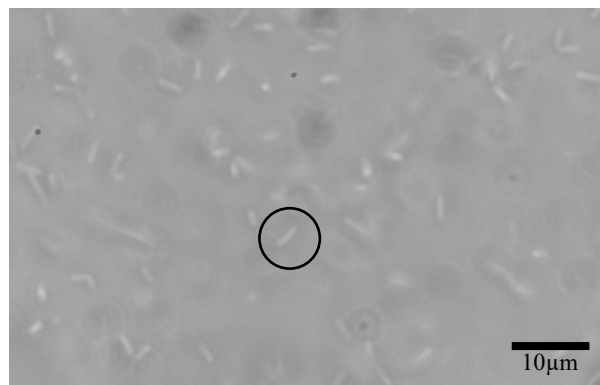


図-15 1L 中のバクテリア (×1000)



図-13 2P の培養前 (上) と後 (下) のサンプル

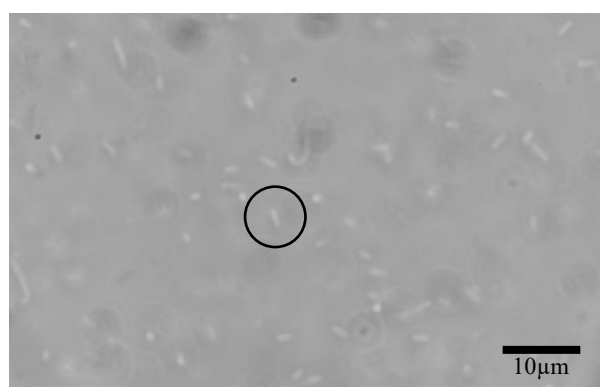


図-16 2L 中のバクテリア (×1000)

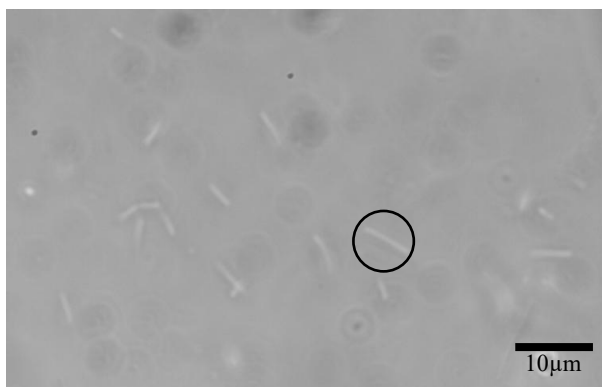


図-17 1P 中のバクテリア (×1000)

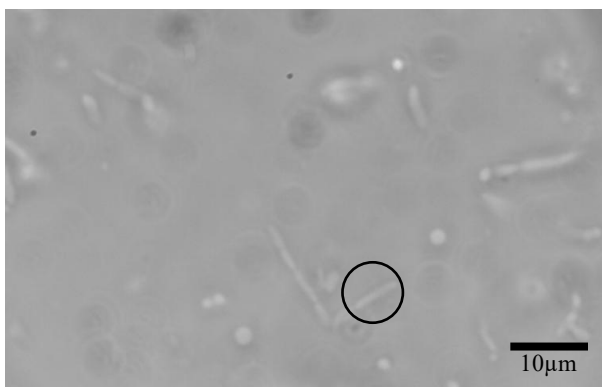


図-18 2P 中のバクテリア (×1000)

計では正確には計測し得なかったバクテリアの活動が存在したことを示した。以上より HA を添加したサンプルにおいては急結剤添加の有無を問わずバクテリアが活動したことが示された。

4. まとめ

バクテリアによるひび割れ自己治癒機能を吹付けコンクリートに付与することを目指し、バクテリアの増殖性に及ぼす急結剤添加の影響を明らかにすることを目的として実施した本培養実験により得られた主な知見を以下に示す。

- 1) pH9 では急結剤を添加した場合でもバクテリアの増殖による濁度の増加を確認できた。しかしながら、添加剤の粒子によっては振とうの過不足による試験管上部内壁への付着や沈殿の影響を受ける。
- 2) サンプルの外観の変化は急結剤を添加した場合でもバクテリアの増殖や粒子の沈殿による濁度変化の傾向を反映した。
- 3) サンプルを顕微鏡で撮影することでバクテリアの存在を確認し形状や大きさから種類を推定できる。本研究ではどの条件でも同一のものが増殖したと考えられる。

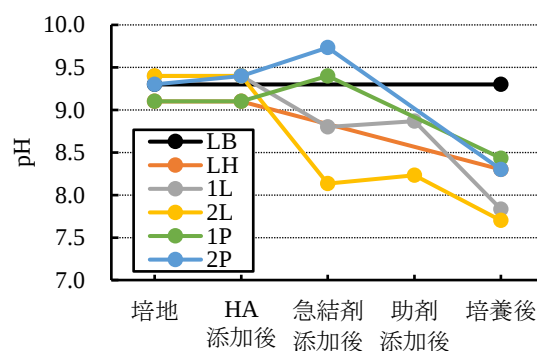


図-19 サンプル作製段階ごと及び培養後の pH

- 4) 培養前後に pH を測定することでバクテリアの活動の有無を確認できた。

以上より、本研究で用いた 2 種類の急結剤はバクテリアの増殖性には大きく影響せず、吹付けコンクリートへのバクテリアによるひび割れ自己治癒機能の付与の実現が期待できる。本研究は 37°C で培養した。今後は温度や pH について増殖性との関係を検討していく。

参考文献

- 1) 2050 年カーボンニュートラルに伴うグリーン成長戦略：
<https://www.meti.go.jp/press/2021/06/20210618005/20210618005-3.pdf> (閲覧日：2022 年 12 月 23 日)
- 2) 川崎浩長，大橋英紀，Henk JONKERS，Sanjay PAREEK：微生物を利用した自己治癒コンクリートの最適な調合に関する実験的検討，コンクリート工学年次論文集，Vol.43，No.1，pp.947-952，2021
- 3) 川崎浩長，Sanjay PAREEK，大橋英紀，春木満：バクテリアを含む改良型の粒を用いた pH 条件による繁殖性と添加量によるモルタルのひび割れ治癒性能の検討，コンクリート工学年次論文集，Vol.44，No.1，pp.1126-1131，2022
- 4) 大日向昭彦，岡崎健治，倉橋稔幸：漏水防止板背面のトンネル漏水状況の調査事例，寒地土木研究所月報，No.798，pp.38-43，2019.11
- 5) 道路トンネル定期点検要領：
https://www.mlit.go.jp/road/sisaku/yobohozen/tenken/yobo3_1_9.pdf (閲覧日：2022 年 12 月 23 日)
- 6) T. K. Sharma et al.: Alkaliphilic Bacillus species show potential application in concrete crack repair by virtue of rapid spore production and germination then extracellular calcite formation, Journal of Applied Microbiology, pp.1-12, Feb. 2017