論 文

高機能コンクリート開発に寄与する強アルカリ耐性菌の獲得

中村 孝道 *1・林 俊斉 *2・齋藤 淳 *3

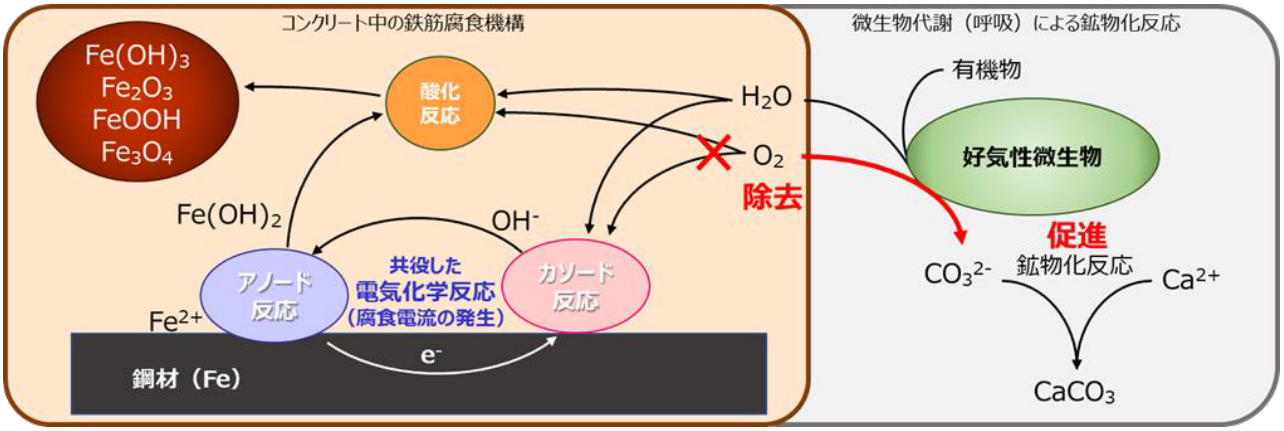
微生物代謝を利用した自己治癒コンクリートが開発されているが，コンクリートのような強アルカリ環境下では微生物が十分に機能しない課題がある．そこで，強アルカリ環境下で代謝可能な細菌を単離しその特性を調査した．強アルカリ条件下での選抜実験の結果，2 種類の強アルカリ耐性菌を獲得した．実験的検証により，この 2 菌株が自己治癒機能と防錆機能を併せ持った高性能コンクリートの開発に有利な特性を保有することを確かめた．さらに，ゲノム解析の結果，2 菌株は *Bacillus altitudinis* に最も近縁であり，芽胞形成とアルカリ適応に関与する遺伝子を保有することが明らかとなった．

キーワード： 強アルカリ環境，微生物代謝，アルカリ耐性菌，自己治癒機能，防錆機能，高機能コンクリート

1．はじめに

1．1　微生物代謝を利用したコンクリート

地球上の多くの生物は，酸素を使って有機物を酸化分解しエネルギーを獲得することで生命活動を行っている．これを生物学的に呼吸という．酸素以外の化学物質を使う場合はあるものの微生物も呼吸を行い，有機物を代謝しエネルギーを獲得することで生命活動が可能となる[1)]．酸素を使った呼吸の場合，有機物は最終的に二酸化炭素まで分解される．このとき発生した二酸化炭素は，アルカリ条件下においてカルシウムイオンなどの二価金属イオンと共存すると，鉱物化反応が促進され炭酸塩が析出される（**図－1**右：微生物代謝（呼吸）による鉱物化反応）．この微生物機能により促進される鉱物化反応を MICP（Microbially-induced carbonate precipitation）という．MICP は地盤改良技術やモルタル材料の開発に応用されている[2, 3, 4, 5)]．コンクリート材料に関しては，微生物機能を利用した自己治癒コンクリートが開発されている．芽胞形成能を持つ *Bacillus* 属細菌，なかでも鉱物化反応に有利なアルカリ条件（pH 9～10 程度）下で生育可能な好アルカリ菌が利用されている．既に市販されているコンクリート用自己治癒材料[6)]では，オランダで取得された好アルカリ菌[7)]が使用されている．自己治癒機能の発現メカニズムは，以下の 3 ステップに集約される[6)]．①休眠状態である芽胞細胞（微生物）と栄養分（ポリ乳酸）を配合しコンクリートを作製する．②ひび割れが発生することで水と酸素が浸入し pH 10 以下になると，微生物が活動し始める．③微生物は乳酸カルシウムを分解し，炭酸カルシウムを析出しひびを閉塞していく．しかしながら，pH 12～13 というような強アルカリ条件下では微生物が十分に機能できないため，自己治癒機



図－1　コンクリート内で期待される微生物機能

*1 環境研究部　*2 研究開発推進部　*3 構造・材料研究部

能の発現にはある程度の風化（中性化）が必要であることに注意が必要である．

１．２　強アルカリ耐性菌の有用性

コンクリート内で効率よく自己治癒機能を発現させるには，芽胞形成能を持ち高い耐久性を持つことに加え，強アルカリ環境下で十分な代謝が可能な強アルカリ耐性菌が有用であると考えられる．強アルカリ耐性菌であれば，中性化を待たずに反応することで，ひび割れを速やかに閉塞すると考えられる．また，強アルカリ環境下で呼吸が可能であることは，コンクリート中で酸素を消費し除去することを意味する．つまり，強アルカリ耐性菌がコンクリート内部の酸素濃度を積極的に低下させ，カソード反応に必要な酸素を除去する．その結果，電気化学反応（腐食電流の発生）を抑制し防錆機能を付加できると考えられる．（**図－１**左：コンクリート中の鉄筋腐食機構）．

筆者らはこれまでに，食経験があることから安全性が高い*Bacillus* 属細菌である，納豆菌を利用した自己治癒コンクリートの開発を進めてきた[8]．芽胞形成能があること，好気性微生物であり酸素除去能力が期待できることから，納豆菌はコンクリートへの適用性が高いと考えられた．納豆菌の栄養源として生分解性プラスチックの検討も進め[9] 納豆菌コンクリートの製品化を見据えていたが，納豆菌は好アルカリ性を示すものの強アルカリ条件下ではあまり機能しないという課題が残っていた．

そこで，強アルカリ耐性菌を獲得すべくアルカリ性に調整した培地を用いた単離培養実験を行った．獲得した強アルカリ耐性菌の特性を調査し，自己治癒機能と防錆機能を併せ持った高機能コンクリートの開発に有用であるか確認した．

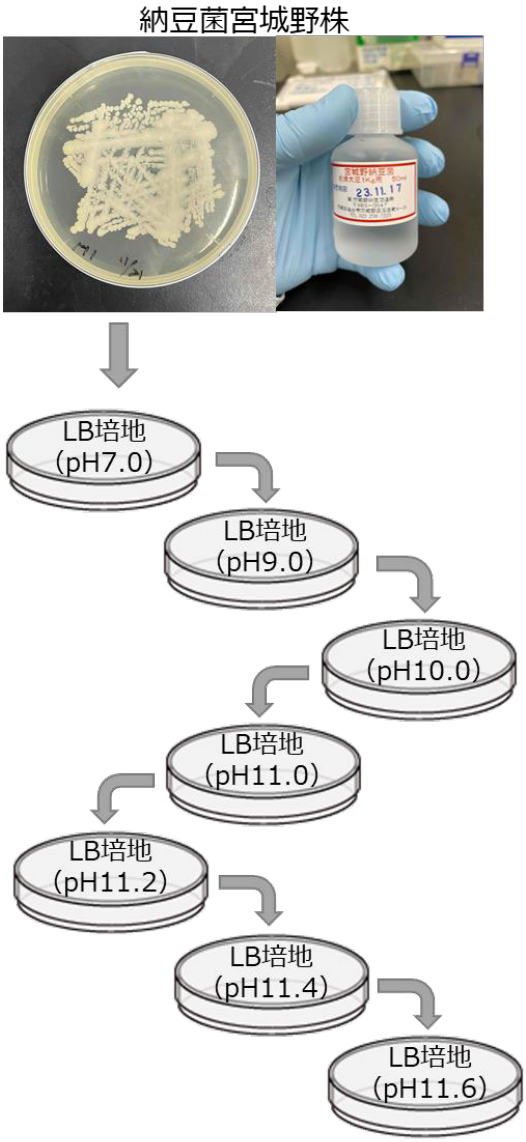
２．強アルカリ耐性菌の単離

２．１　アルカリ選抜実験

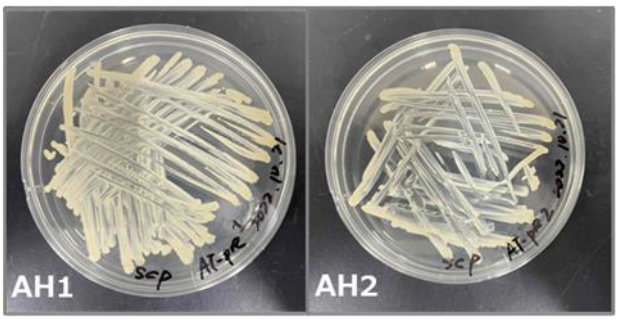
これまでに使用していた納豆菌宮城野株（宮城野納豆製作所製[10]）をアルカリ性に順応させ，アルカリ耐性能を獲得させる戦略をとった．具体的には，納豆菌の培養に使用しているLB培地（**表－1**）を1N NaOHを用いてアルカリ性に調整し，納豆菌を播種した（培養温度：37℃，静置培養）．増殖した納豆菌を段階的に高いpHのLB培地に播種し，pH 11以上の強アルカリ性に順応した菌株を得た（**図－2**）．pH 10.0までは良好な増殖が観察された．pH 11.0以降は増殖が困難になった

表－１　培地成分

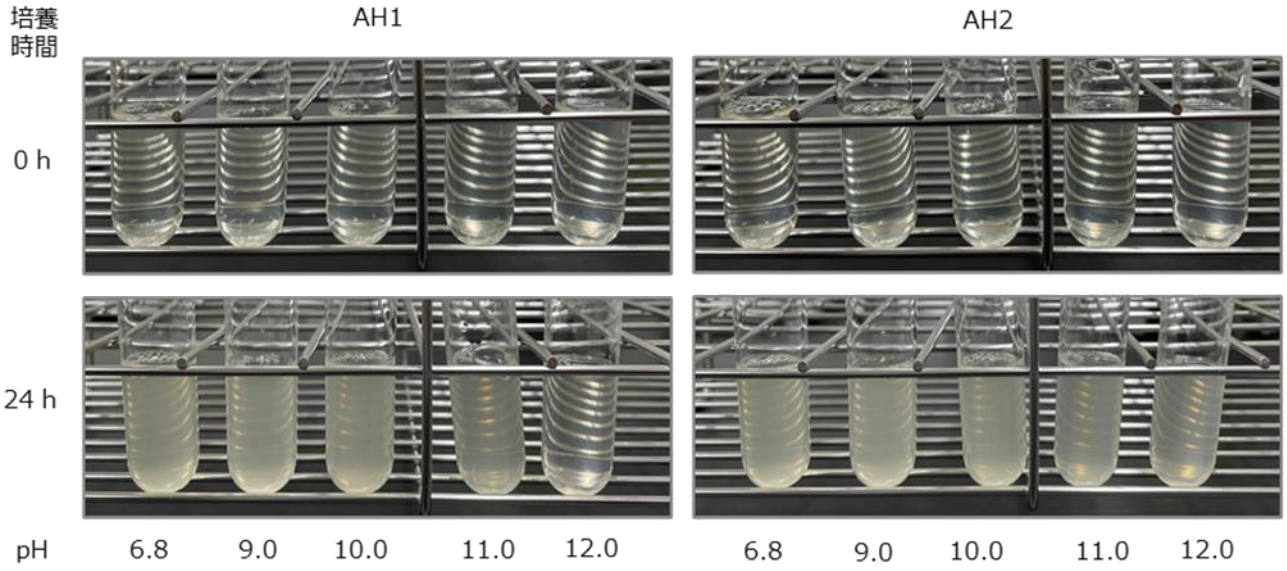
培地	成分　(g/L)		
	トリプトン	酵母エキス	NaCl
LB	10.0	5.0	10.0



図－２　微生物のアルカリ選抜実験



写真－１　単離した強アルカリ耐性菌



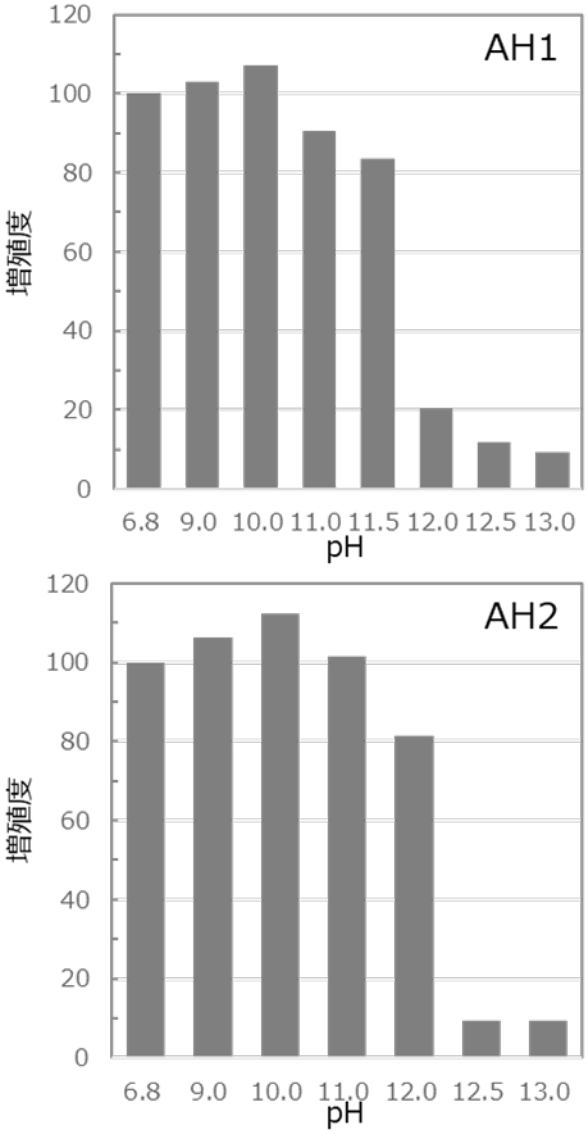
写真－2　pH 耐性試験

が,最終的に pH 11.6 の LB 培地から 2 つのコロニー（増殖した菌体塊）を得た．アルカリ条件で生育可能（Alkaline Habitable）であることから，2 つの菌株は AH1 および AH2 と名付けた（**写真－1**）.

2．2　アルカリ耐性能の評価

pH を調整した LB 培地を入れた試験管を用いて，アルカリ耐性を評価するための培養実験（培養温度 :30℃，振とう速度 :100rpm）を行った．培養開始時，培養液は無色透明である（**写真－2** 上段）．培養時間が経過し菌が増殖すると，培養液は濁りが確認できる（**写真－2** 下段）．デジタル比色計（簡易 OD モニター Miniphoto 620,タイテック社製）を使用して培養 24 時間後の培養液濁度を測定し，pH 無調整培地（pH 6.8）での濁度を 100 として，アルカリ性に調整した培地での増殖度を比較した（**図－3**）.

AH1 株は pH 10.0 を至適とし，pH 11.5 まで良好な増殖が確認された．AH2 株は pH 10.0 を至適とし，pH 12.0 まで良好な増殖が確認された．これらの結果より，選抜された AH1 および AH2 の 2 つの菌株は，pH 11 以上の強アルカリ条件下で代謝が可能な強アルカリ耐性菌であることが明らかとなった.

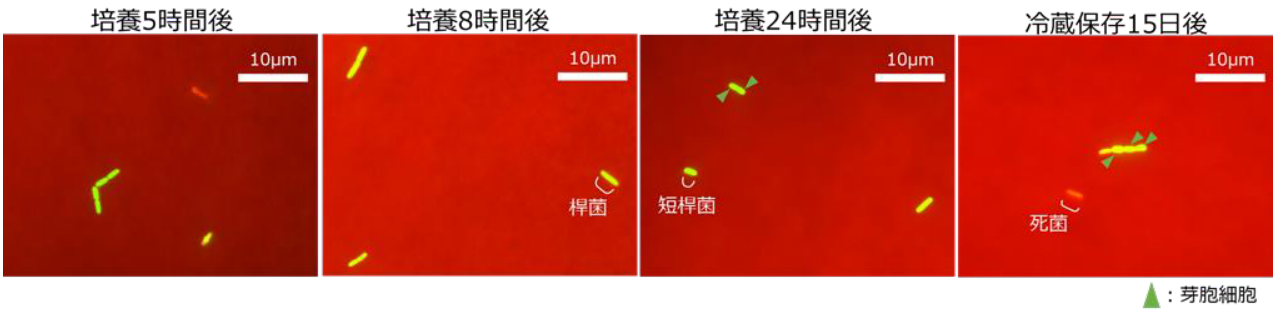


図－3　pH の増殖への影響

3．実験的特性調査

3．1　芽胞形成能の評価

納豆菌が属する *Bacillus* 属細菌は，芽胞形成細菌として知られている．芽胞形成細菌は，栄養のある環境下では分裂増殖を行う栄養細胞の形態（桿菌）となるが，栄養状態が悪くなると芽胞細胞に形態（短桿菌あるい



写真－3　蛍光顕微鏡による細胞形態観察（AH2）

は球菌）を変化し休眠状態となり，生育不適環境下においての生存を図る[11]．芽胞細胞は様々なストレスに抵抗性があり，極めて高い耐久性を持つ．例えば，*Bacillus* 属細菌の芽胞は 100℃での煮沸に約 20 時間耐えることができる[11]．強アルカリだけでなく水和熱の発生や十分な栄養がないなど，コンクリート環境は微生物にとって過酷な環境であるといえる．したがって，芽胞形成能を持つ微生物が，コンクリートへの適用に有用であると考えられる．

そこで，蛍光顕微鏡（BZ-X800，キーエンス社製）により細胞形態を観察することで，AH2 株の芽胞形成能を評価した（**写真－3**）．ここでは，SYBR green Ⅰ（Life Technologies 社製）と PI（同仁化学研究所社製）の 2 種類の蛍光染色剤を使用した．SYBR green Ⅰは，細胞膜に対し透過性を有する．細胞膜が健全な生菌の核酸（DNA）に結合し緑色蛍光を呈する．一方，PI は膜不透過性であるため，細胞膜に損傷のある死菌の核酸に結合し赤色蛍光を呈する．観察対象は，LB 培地（**表－1**）で培養した培養液と培養 24 時間後の培養液を 15 日間冷蔵庫（4℃）に保管したものとした．

細胞形態観察結果をまとめると以下のようになる．

・培養 5 時間後，8 時間後

1 μ m × 3 ～ 6 μ m の桿菌が観察された．観察された細胞は栄養細胞であると考えられる．

・培養 24 時間後

1 μ m × 2 ～ 3 μ m の短桿菌が観察された．短桿菌化が観察され芽胞形成中であると考えられる．

・冷蔵保存 15 日後

〈1 μ m × 1 ～ 2 μ m の短桿菌あるいは球菌が観察された．球菌化が観察され芽胞細胞が形成されたと考えられる．

赤色に呈色された死菌も観察された．生菌数を全菌数（生菌数と死菌数の和）で除し生菌率を求めたところ，生菌率は 69.0% であった．これは，69.0% の細胞が芽胞形成し低温環境下を生存したことを意味する．

細胞形態観察から，AH2 株は芽胞形成能を有することが明らかとなった．AH2 株は様々な環境ストレスに対し高い耐久性を持ち，生育不適環境下においても生存する性質がある．コンクリート環境に対し，AH2 株の有用性が高いことが示唆される．

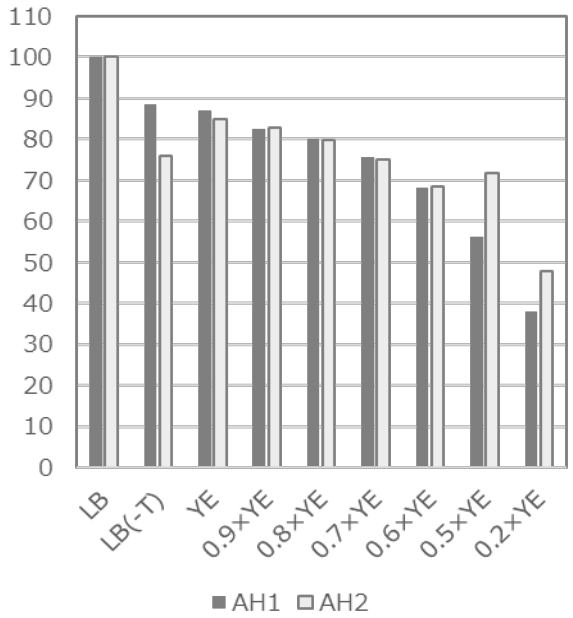
表－2　培地成分

培地	成分　(g/L)	
	酵母エキス	NaCl
LB(-T)	5.0	10.0
YE	5.0	-
0.9×YE	4.5	-
0.8×YE	4.0	-
0.7×YE	3.5	-
0.6×YE	3.0	-
0.5×YE	2.5	-
0.2×YE	1.0	-

3．2　培地成分の最適化

微生物培養に汎用的に使用されている LB 培地の成分は，窒素源および炭素源としてトリプトン（ペプトン），ビタミンなどの生育促進物質として酵母エキス（イーストエキストラクト），細胞浸透圧調整のための塩化ナトリウム（NaCl）で構成されている（**表－1**）[12]．納豆菌を使用したコンクリートを製造する際，培養に用いる LB 培地をそのまま使用していたが，スランプおよび空気量が増大しコンクリートのフレッシュ性状に影響があった[8]．この原因は，培地中に有機物や発酵代謝物が多く含まれるためと考えられた．また，防錆機能コンクリート製造を想定した場合，鉄筋腐食の原因となる塩化ナトリウムは除外したい．そこで代謝に必要な最低限の栄養源を把握することと塩分を除外することを目的に，培地成分の最適化を検討した．検討した培地成分を**表－2** に示す．酵母エキスはビタミンやミネラルを多く含むため生育促進物質として考えられているが，アミノ酸や核酸なども多く含まれるため総合的

な栄養源として機能すると考えられる．そこで酵母エキスのみを栄養源とする最適化を検討した．LB 培地での培養 24 時間後の濁度を 100 として，各種成分の異なる培地での増殖度を比較した（**図－4**）．



図－4　培地成分の違いによる増殖への影響

まず，栄養源の絞り込みとしてトリプトンを除外した培地（LB（-T））で試験した．主要な窒素源および炭素源であり含有量も多いため，トリプトンの除外は増殖への影響が認められたものの大きく減少することはなかった．酵母エキスが総合的な栄養源として十分に機能することが確かめられた．

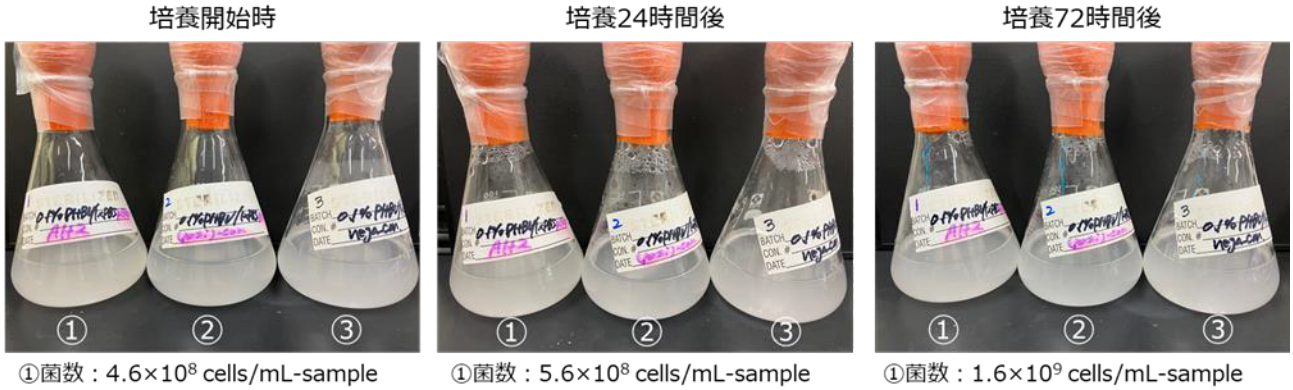
次に，塩化ナトリウムを除外し酵母エキスのみの培地（YE）で試験した．塩化ナトリウムの除外は増殖に全く影響しなかった．2 菌株とも酵母エキスのみで十分に増殖することが確かめられた．さらに酵母エキスの含有量の絞り込みを行った．0.8 倍量まで増殖度 80% を維持できることがわかった．

培地成分の最適化により，コンクリート製造時に投入する栄養源を最小限にすることで余計な添加物の混入を制限できると考えられる．微生物コンクリートのフレッシュ性状への影響を低減できることが示唆される．

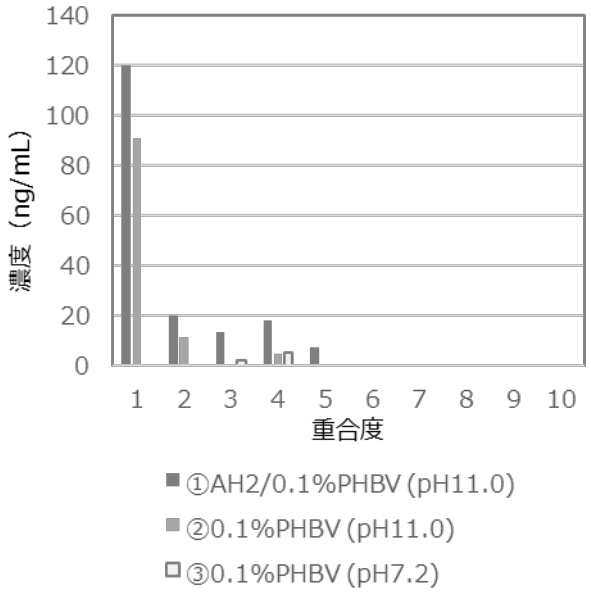
３．３　生分解性プラスチック資化性試験

納豆菌を利用した自己治癒コンクリートの開発では，コンクリート中での納豆菌の栄養源として，生分解性プラスチックである PHBV（poly（3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate））を使用する検討を進めてきた[9]．PHBV はアルカリ環境下で加水分解されて微生物の有機炭素源となると推測されているが，微生物が分解し炭素源として利用しているかは不明である．そこで，PHBV を唯一の成分とした培地を用いて AH2 株の PHBV 資化性（炭素源およびエネルギー源として利用すること）試験を実施した．

リン酸緩衝食塩水（PBS buffer；NaCl：8.00 g/L，KCl：0.20 g/L，Na2HPO4：1.44 g/L，KH2PO4：0.24 g/L，pH 7.2）を溶媒とし，0.1%（w/v）PHBV（ハイケム社製）のみを成分とした培地を作成した．1N NaOH を用いて pH 11.0 に調整した．LB 培地で前培養し十分に増殖した AH2 株細胞を PBS buffer で洗浄し，培養液由来の有機物を除去したうえで 0.1% PHBV 培地に植菌し，培養実験（培養温度：30℃，振とう速度：100rpm）を行った．この実験では，AH2 株を投与した試験系①と並行して，微生物を投与していない試験系②(pH 11.0)，試験系③(pH 7.2)の培養も実施している（**写真－4**）．PHBV は不溶性であるため，いずれも白濁しており見た目では分解されているか判断ができない．そこで，培養 144 時間後の各試料液を回収し，PHBV 分解物である 3-ヒドロキシ酪酸(3-HB)モノマーおよび 10 量体までの重合体（オリゴマー）を対象とした定量分析を行った（**図－5**）．分析試料は各試料液を孔径 0.2 μm シリンジフィルターでろ過したろ



写真－4　PHBV 分解実験



図－5 PHBV 分解物定量分析

液とし，液体クロマトグラフィー高分解能質量分析（LC-OrbitrapMS）法（LC: NexeraX2, 島津製作所製；OrbitrapMS: Q Exactive HF,Thermofisher Scientific 製）により分析した．

試験結果をまとめると以下のようになる．

・試験系①（AH2/pH 11.0）

核酸に結合する蛍光染色剤（SYBR green Ⅰ，Life Technologies 社製）を用いた蛍光顕微鏡（BZ-X800，キーエンス社製）観察により，AH2 株の細胞数を計測した．培養開始時は 4.6×10^{8}cells/mL-sample であったが，培養 72 時間後では 1.6×10^{9}cells/mL-sample と AH2 株の増殖が認められた．

モノマーが 120ng/mL，2 ～ 5 量体のオリゴマーが 7.3 ～ 20ng/mL 検出された．アルカリによる加水分解に加え AH2 株の代謝により，最も PHBV 分解が進行していたと考えられる．

・試験系②（微生物無 /pH 11.0）

モノマーが 91ng/mL，2 量体が 11ng/mL，4 量体が 4.5ng/mL 検出された．本実験条件下（pH 11，30℃，144h）では，アルカリによる加水分解はあまり起こっていないと考えられる．

・試験系③（微生物無 /pH 7.2）

モノマーは検出されなかった．2 量体が 2.1ng/mL，4 量体が 5.0ng/mL 検出された．中性条件下では PHBV はほとんど分解されなかった．

PHBV 資化性試験と PHBV 分解物分析の結果から，強アルカリ条件下において AH2 株は PHBV の分解能および資化能を有することが示された．生分解性プラスチックである PHBV が，コンクリート中における AH 株の栄養源として機能することが示唆される．

４．ゲノム解析による遺伝的特性調査

４．１　AH 株のゲノム解析

AH1 株と AH2 株は，納豆菌[10]をアルカリに順応させるアルカリ選抜実験によって得られた強アルカリ耐性菌である．納豆菌は分類学上 *Bacillus subtilis*（枯草菌）に属している[13]．枯草菌は古くから研究されている微生物の一種であり，大腸菌同様モデル的な実験室微生物株である[14]．1997 年にゲノム（全遺伝情報）解読がなされており，ゲノムサイズは 4.19Mbp（塩基対）であり，遺伝子数は 4，101 と推定されている[15]．モデル微生物として微生物機能と遺伝子の関係が詳細に研究されている[16]．納豆菌のゲノム解析もなされており，全ゲノム長（ゲノムサイズ）は 4.18Mbp（塩基対），遺伝子数は 4，375 と推定されている[17]．うち 82% の遺伝子は枯草菌と同じ機能をもつと予想されている[17]．枯草菌の増殖可能な pH 範囲は 5.5 ～ 8.5 とされており[14]，遺伝的に近縁な納豆菌も同程度と考えられている．そこで，強アルカリ耐性能が遺伝的特性によって獲得されたものなのかを確認すべく，AH 株のゲノム解析を実施した．

AH1 株および AH2 株の培養物から，Quick-DNA MiniPrep Kit（ZYMO RESEARCH 社製）を用いてそれぞれのゲノム DNA を抽出した．QIAseq FX DNA Library Kit（QIAGEN 社製）を用いて抽出ゲノム DNA のライブラリ調製を行った．このライブラリ調製後に，高速 DNA 配列解読装置（NextSeq2000，Illumina 社製）を用いてショートリードシーケンス解析を行った．さらに，微細孔 DNA 配列解読装置（MinION，Oxford Nanopore Technology 社製）を用いてロングリードシーケンス解析を行った．続いて，フリーソフトウェアであるゲノムアセンブラツール（MaSuRCA），ゲノムアセンブル補正ツール（POLCA），生物系統分類ツール（GTDBTk）等のゲノム解析ツールを使用して，ゲノムデータのアッセンブルや遺伝子機能のアノテーションを行った．

AH1 株はゲノムサイズが 3.76Mbp，保有する遺伝子数は 3，872，AH2 株はゲノムサイズが 3.77Mbp，保有する遺伝子数は 3，873 であった（**表－3**）．ゲノムはほぼ同一ではあるもののそれぞれ独立した株であることが分かった．AH1 および AH2 株のゲノムは，ゲノムサイズや遺伝子数が枯草菌や納豆菌と大きく異なっていた．AH1 および AH2 株のゲノム配列の生物系統を分類した結果，*Bacillus altitudinis* 41KF2b 株[18]と最近縁であると

表－3　ゲノム解析結果概要および保有遺伝子

	AH1	AH2	41KF2b
ゲノムサイズ(Mbp)	3.76	3.77	3.68
保有遺伝子数	3,872	3,873	3,811
芽胞形成遺伝子	AH1	AH2	41KF2b
spo, ytr	○	○	○
cot, ssp, sps	○	○	○
ger	○	○	○
アルカリ適応遺伝子	AH1	AH2	OF4
tua	○	○	－
ythAB	○	○	○
cydAB	○	○	－
ctaCDEF	○	○	○
slpA	－	－	－
capABC	○	○	－
epsDEFHI	○	○	－
epsJO	－	－	－
epsKLMN	○	○	－
mrp	○	○	○
ktrAB	－	－	○
ktrCD	○	○	○
walKR	○	○	○
bceSR	○	○	○
liaRS	○	○	○
yvrG	○	○	－
cssSR	○	○	○
fabH	○	○	○
PHA分解遺伝子	AH1	AH2	
phaZ23	－	－	
phaY	－	－	
hbd	○	○	
加水分解酵素遺伝子	AH1	AH2	
gloB	○	○	
gloC	○	○	
mhqD	○	○	
hsaD	○	○	
todF	○	○	
酸化酵素遺伝子	AH1	AH2	
rl5	○	○	

○：保有　－：不保有

推定された．41KF2b 株は，インド半島のほぼ中央に位置するハイデラバードの上空 41km までの空間から採取された空気中に見いだされた微生物である．糖類，アルコール類，炭水化物など多種にわたり有機物資化性を有し，45℃と比較的高温度域でも増殖が可能な芽胞形成細菌である．また，塩分耐性や複数の抗生物質に対し抵抗性を示す，様々な環境ストレスに耐性のある微生物種である[19]．納豆菌宮城野株がアルカリ性に順応しアルカリ耐性能を獲得したのではなく，アルカリ選抜実験のプロセスの中で浮遊菌などのコンタミネーションが起こり，強アルカリ耐性菌が選抜された結果，AH1 株と AH2 株が獲得されたものと考えられる．

４．２　アルカリ適応遺伝子

pH 11 まで生育可能な *Bacillus halodurans* C-125 株[20]や pH 11.4 まで生育可能な *Bacillus pseudofirmus* OF4 株[21]のゲノム解析データから，好アルカリ性菌のアルカリ適応機構が推定されている[22]．細胞壁の構造物（*tua*，*slp*，*cap*，*eps*），細胞膜中の電子伝達系（*yth*，*cyd*，*cta*），カチオン交換輸送体（*mrp*，*ktr*），細胞表層ストレス応答（*wal*，*bce*，*lia*，*yvr*，*css*，*fab*）などの遺伝子の存在とその機能がアルカリ適応に関連していると指摘されている．AH1 株と AH2 株は，これらの遺伝子をほぼすべて保有していた．pH 11.4 まで生育可能な OF4 株と比較すると，アルカリ適応に関連が指摘されている遺伝子をより保有していることが分かった（**表－3**）．AH1 株と AH2 株が pH 11.5 以上で生育可能であることが，遺伝的特性からも示された．

４．３　生分解性プラスチック分解遺伝子

PHBV は，poly（3-hydroxyalkanoates）（PHA）と呼ばれる微生物が生産するポリエステル樹脂の一種である．PHA は微生物産生であることから生分解性を有していることが知られている．PHA 加水分解酵素遺伝子（*pha*）や PHA 構成モノマーである 3-ヒドロキシ酪酸（3-HB）の脱水素酵素遺伝子（*hbd*）が PHA の分解に関与している[23]．AH1 株と AH2 株は *pha* を保有していなかったが *hbd* を保有していた．その他 PHA 分解に関連が考えられる遺伝子を検索した結果，5 種類の加水分解酵素遺伝子（*gloB*, *gloC*,*mhqD*,*hsaD*,*todF*）と炭化水素酸化酵素遺伝子（*rl5*）が見いだされた（**表－3**）．これら酵素遺伝子の一部機能を利用して PHA を分解していると考えられる．したがって，AH1 株と AH2 株は積極的に PHA を分解する能力はないものの，アルカリによる加水分解に加え，加水分解酵素や酸化酵素を利用して PHA を少しずつ分解することで資化すると考えられる．

ゲノム解析による遺伝的特性を調査した結果，同じ *Bacillus* 属細菌ではあるものの，AH1 株と AH2 株は枯草菌（納豆菌）とは異なる遺伝系統である *Bacillus altitudinis* であることが判明した．さらに，AH1 株と AH2 株が強アルカリ耐性であることおよび生分解性プラスチック資化能を持つことが遺伝的特性からも支持された．

５．まとめ

コンクリートのような強アルカリ環境下で代謝可能な細菌を単離するためにアルカリ条件下での選抜実験を実施した結果，pH 11 以上で生育可能な強アルカリ耐性菌 AH1 株および AH2 株の獲得に成功した．2 菌株の特性を実験的および遺伝学的に検証した結果，以下の特性を持つことが確かめられた．

- *Bacillus altitudinis* に近縁な新たな強アルカリ耐性菌である．
- 強アルカリ条件（pH11 ～ 12）下にて代謝が可能である．
- 芽胞形成能を有し，環境ストレスに対し耐久性を持ち生存能力が高い．
- 生分解性プラスチックである PHBV の分解能および資化能を有する．

強アルカリ環境下であるコンクリート内で生存し，必要に応じ代謝活動を行うことができる強アルカリ耐性菌（AH1，AH2）は，以下の機能を持つと考えられる．

- 速やかな微生物代謝による炭酸塩析出（MICP）促進による迅速な自己治癒機能．
- 強アルカリ環境下の呼吸による酸素除去に起因した鉄筋腐食反応の抑制機能．

以上のことから，強アルカリ耐性菌 AH1 株および AH2 株は，自己治癒機能と防錆機能を併せ持った高機能コンクリートの開発に極めて高い有用性があると考えられる．

謝辞

強アルカリ耐性菌選抜実験の実施にあたっては，株式会社計測企画の中島史暁氏に多大なる協力をいただいた．また，PHBV 分解物の分析は株式会社島津テクノリサーチ，AH 株のゲノム解析は bitBiome 株式会社の協力により実施された．ここに記し謝意を表する．

参　考　文　献

1）森浩二：呼吸する，日本微生物生態学会誌，Vol.21，No.2，pp.63 ～ 64，2006
2）川﨑了：微生物機能を利用した地盤改良技術の現状，Journal of MMIJ，Vol.131，No.5，pp.155 ～ 163，2015
3）生駒聖，畠俊郎，八木光晴，千手智晴：MICP を利用したセメント改良土の劣化抑制技術の粘性土に対する適用性評価，土木学会論文集 B3（海洋開発），Vol. 76，No. 2，I_618 ～ I_623，2020
4）中村孝道：環境低負荷資材を利用した土壌固化・地盤改良技術の開発とその可能性，建設機械施工，Vol. 73，No. 11，pp.107 ～ 111，2021
5）Nakamura，T.，Taniguchi，E.，Kawamura，D.，Sakai，Y.：Development of simple and environmentally friendly soil solidification technique，Japanese Geotechnical Society Special Publication，Vol.9，No.6，pp.277 ～ 281，2021
6）會澤高圧コンクリート；自己治癒コンクリート Basilisk（バジリスク），https://basilisk.co.jp/（2024.08 参照）
7）Jonkers，H.M.，Thijssen，A.，Muyzer，G.，Copuroglu，O.，Schlangen，E.：Application of bacteria as self-healing agent for the development of sustainable concrete，Ecological Engineering，Vol.36，No.2，pp.230 ～ 235，2010
8）林俊斉，齋藤淳，河合慶有，西田孝弘：微生物代謝を活用したコンクリートの基礎的物性の把握，コンクリート工学年次論文集，Vol.46，No.1，pp.1291 ～ 1296，2024
9）西田孝弘，河合慶有，林俊斉，中村孝道：微生物を自己治癒材として用いた場合の生分解性プラスチック添加の影響評価，第 78 回セメント技術大会講演要旨集，pp.66 ～ 67，2024.
10）宮城野納豆製作所；納豆菌を利用してみませんか，https://www.miyagino-nattou.com/other.html（2024.08 参照）
11）渡部一仁:細胞芽胞（胞子）日本 PDA 学術誌 GMP とバリデーション，Vol.3，No.2，pp.67 ～ 73，2001
12）駒大輔，山中勇人，森芳邦彦，大本貴士：培地の成分しっていますか？，生物工学会誌，Vol.89，No.4，pp.195 ～ 199，2011
13）木村啓太郎，久保雄司：納豆菌と枯草菌の共通点と違い，日本醸造協会誌，Vol.106，No.11，pp.756 ～ 762，2011
14）Logan，N.A.，Vos，P.D.：*Bacillus*，Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria，DOI:10.1002/9781118960608.gbm00530，2009
15）Kunst，F.，Ogasawara，N.，Moszer，I.，Albertini，A.M.，Alloni，G.，Azevedo，V.，Bertero，M.G.，Bessieres，P.，Bolotin，A.，Borchert，S.，Borriss，R.，Boursier，L.，Brans，A.，Braun，M.，Brignell，S.C.，Bron，S.，Brouillet，S.，Bruschi，C.V.，Caldwell，B.，Capuano，V.，Carter，N.M.，Choi，S.K.，Codani，J.J.，Connerton，I.F.，Danchin，A.，and et al：The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*，Nature，Vol.390，No.，pp.249 ～ 256，1997
16）藤田泰太郎：枯草菌全ゲノム配列からわかったこと，化学と生物，Vol.36，No.2，pp.106 ～ 112，1998
17）Nishito，Y.，Osana，Y.，Hachiya，T.，Popendorf，K.，Toyoda，A.，Fujiyama，A.，Itaya，M.，Sakakibara，Y.：Whole genome assembly of a natto production strain *Bacillus subtilis* natto from very short read data，BMC Genomics，Vol.11，243，2010
18）The National Center for Biotechnology Information；*Bacillus altitudinis* 41KF2b genome assembly ASM69114v1，

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/genome/GCF_000691145.1/ (2024.08 参照)

19) Shivaji, S., Chaturvedi, P., Suresh, K., Reddy, G.S.N., Dutt, C.B.S., Wainwright, M., Narlikar, J.V., Bhargava, P.M. : *Bacillus aerius* sp. nov., *Bacillus aerophilus* sp. nov., *Bacillus stratosphericus* sp. nov. and *Bacillus altitudinis* sp. nov., isolated from cryogenic tubes used for collecting air samples from high altitudes, International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, Vol.56, pp.1465 ～ 1473, 2006

20) Takami, H., Nakasone, K., Takaki, Y., Maeno, G., Sasaki, R., Masui, N., Fuji, F., Hirama, C., Nakamura, Y., Ogasawara, N., Kuhara, S., Horikoshi, K : Complete genome sequence of the alkaliphilic bacterium *Bacillus halodurans* and genomic sequence comparison with *Bacillus subtillis*, Nucleic Acids Research, Vol.28, No.21, pp.4317 ～ 4331, 2000

21) Janto, B., Ahmed, A., Ito, M., Liu, J., Hicks, D.B., Pagni, S., Fackelmayer, O.J., Smith, T-A., Earl, J., Elbourne, L.D.H., Hassan, K., Paulsen, I.T., Kolstø,A-B., Tourasse,N.J., Ehrlich,G.D., Boissy,R., Ivey, D.M., Li, G., Xue, Y., Ma, Y., Hu, F.Z., Krulwich, T.A. : The genome of alkaliphilic *Bacillus pseudofirmus* OF4 revealsadaptations that support the ability to grow in an external pH range from 7.5 to 11.4, Environmental Microbiology, Vol.12, No.12, pp.3289 ～ 3309, 2011

22) 藤浪俊, 守野正人, 伊藤政博：好アルカリ性細菌のアルカリ適応機構, 生物工学会誌, Vol.90, No.11, pp.692 ～ 695, 2012

23) Lu, J., Takahashi, A., Ueda, S. : 3-Hydroxybutyrate oligomer hydrolase and 3-hydroxybutyrate dehydrogenase participate in intracellular polyhydroxybutyrate and polyhydroxyvalerate degradation in *Paracoccus denitrificans*, Applied and Environmental Microbiology, Vol.80, No.3, pp.986 ～ 993, 2014

Isolation of strong alkali-resistant bacteria for contribution of the high performance concrete

Takamichi NAKAMURA, Toshinari HAYASHI and Atsushi SAITO

Self-healing concrete that utilizes a bacterial metabolism has been developed. However, there is technical problem that microorganisms do not function adequately in a strong alkaline environment such as concrete. To overcome this technical challenge, bacteria that has metabolic activities in strong alkaline environments were isolated and their properties investigated. Selection experiments were conducted using a medium adjusted to high pH, and two strong alkali-resistant bacteria were obtained. Experimental validation indicated that the two strains possess advantageous properties for the development of high-performance concrete that combines self-healing and anti-corrosion resistance. In addition, genome analysis revealed that the two strains are most closely related to *Bacillus altitudinis* and possess genes involved in sporulation and alkaline tolerance.

報 告

バイオスマートコンクリート®(BiSCo)の開発 ―AH株大量培養技術の開発とBiSCo試験施工―

中村 孝道 *1・齋藤 淳 *1・林 俊斉 *2

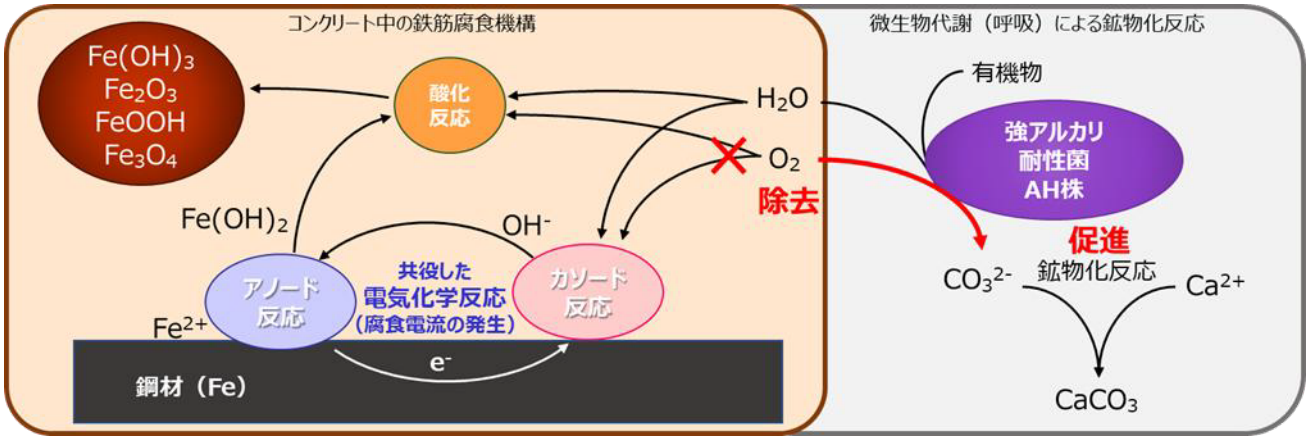
独自に発見した強アルカリ耐性菌（AH株）を利用した高機能コンクリート，バイオスマートコンクリート®（BiSCo）の実用化を目指した研究開発を進めている．強アルカリ条件下でも代謝活動が可能で増殖することができるAH株と栄養源をコンクリートに添加することにより，炭酸カルシウムを析出してひび割れを早期閉塞する自己治癒機能と，溶存酸素を積極的に消費して鉄筋の防錆機能を発揮する．BiSCo実用化を実現するために，AH株の大量培養技術開発に取り組み，1度の培養で生コンクリート200m^{3}分以上のAH株生産技術を確立した．港湾施設において試験施工を実施，防潮壁にAH株を利用したBiSCoを10m^{3}打設した．

キーワード： 微生物コンクリート，高機能コンクリート，自己治癒機能，防錆機能，強アルカリ耐性菌

1．はじめに

これまでに，微生物機能を利用した自己治癒コンクリートが開発されている[1,2]が，pH12～13というような強アルカリ条件下では微生物が十分に機能できない．そのため，自己治癒機能の発現にはある程度の風化（中性化）が必要であるという課題があった．この課題を解決するために，コンクリートのような強アルカリ環境下で活動が可能な強アルカリ耐性菌（AH株）を獲得することに成功した[3,4]．AH株はpH11～12といった強アルカリ条件下において酸素を使った呼吸が可能である．これは，コンクリート中で酸素を消費し除去することを意味し，強アルカリ耐性菌がコンクリート内部の酸素濃度を積極的に低下させ，カソード反応に必要な酸素を除去することができる．その結果，電気化学反応（腐食電流の発生）を抑制し防錆機能を付加できると考えられる（**図－1**左：コンクリート中の鉄筋腐食機構）．また呼吸による有機物分解の結果発生する二酸化炭素は，強アルカリ条件下にて速やかな鉱物化反応により炭酸カルシウムが析出され，自己治癒機能を発揮すると考えられる（**図－1**右：微生物代謝（呼吸）による鉱物化反応）．したがって，AH株を利用することで，防錆機能と自己治癒機能を併せ持った高機能コンクリートの開発が可能となる．この微生物を利用した高機能コンクリートを“バイオスマートコンクリート®（Bio-Smart Concrete®，通称BiSCo）”と名付け，商標登録を行っている．

本稿では，BiSCo実用化を実現するための技術開発の取組みとして実施した，施工スケールレベルのAH株培養技術の開発と港湾施設における試験施工について報告する．



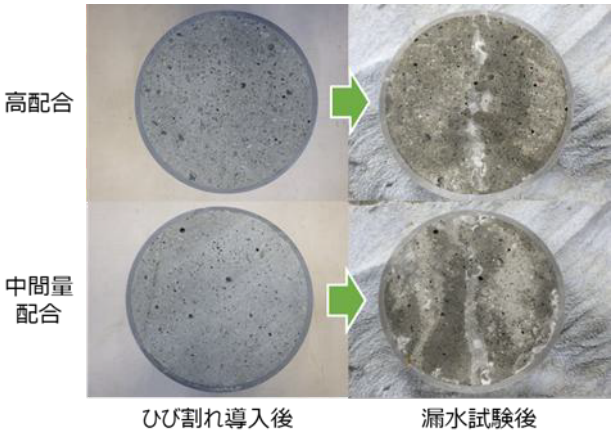
図－1 バイオスマートコンクリート®の機能

*1 土木研究部 *2 研究開発推進部

２．微生物と栄養源の配合量の検討

AH 株を使用した試験練りにより供試体を作製し，漏水試験による自己治癒機能の確認を実施し，BiSCo の機能評価を行った[4,5,6]．コンクリートのひび割れ閉塞による自己治癒機能を確認するための漏水試験はモルタルの試験体で実施している既往の文献[7]を参考にした．コンクリート試験体は，塩ビ管とアクリル板で作製した型枠（内径 140 mm,高さ 80 mm）に打込み,48 時間後に脱型し，材齢 28 日まで標準水中養生とした．その後，20℃，60%RH 環境下で 7 日間気中養生し，気中養生中に載荷試験装置を用いて割裂ひび割れを導入した．ひび割れ幅は下面で測定した．割裂した供試体は塩ビ管型枠に戻し，供試体との隙間をシーリング材で被覆し，漏水試験に用いた（**図－2**）．

試験練り時の微生物と栄養源の配合量については，自己治癒コンクリート先行開発品である Basilisk[1]を参考にした．ベースコンクートはプレキャスト床版用コンクリートとした．コンクリートの配合を**表－1** に示す．Basilisk[1]では生コンクリート 1m^3 あたりに微生物と栄養源としてのポリ乳酸が約 5kg 外割で添加される．

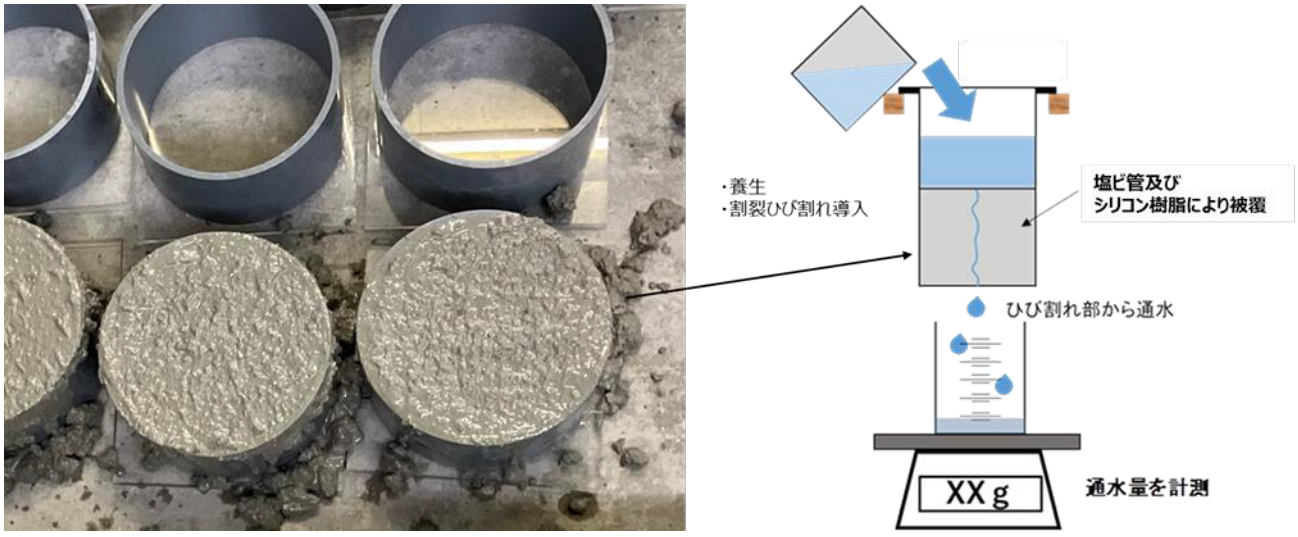


写真－1　漏水試験前後の試験体底面の状況

BiSCo では，確実に機能を発現させるため生コンクリート 1m^3 あたり AH 株を 2.0 × 10^{13}cells 投入することにした．なお，AH 株は pH11 まで活動可能な AH1 株と pH12 まで活動可能な AH2 株があるが，以降の試験では AH2 株を使用する．BiSCo で使用する栄養源は，微生物培地の最適化検討と生分解性プラスチック資化性試験の結果，酵母エキス（YE，Solabia Biokar Diagnostics 社製）とポリ(3-ヒドロキシブチレート-co-3-ヒドロキシバレレート)（PHBV，ハイケム社製）を使用することとした[3,4]．

表－1　コンクリート配合

配合	W/C (%)	s/a (%)	単位量 (kg/m^3)							外割		
			W	C	S	G	AD			微生物栄養源		微生物
				H	山砂	砕石	高性能減水剤	AE剤	消泡剤	YE (g/m^3)	PHBV (g/m^3)	AH2 (cells/m^3)
栄養源高配合	34.0	41.0	156	459	699	1020	C×0.675%	5A	4T	156	4000	2.0×10^{13}
栄養源中間量配合	34.0	41.0	156	459	699	1020	C×0.65%	5A	－	78	2000	2.0×10^{13}



図－2　漏水試験の試験体と試験概要

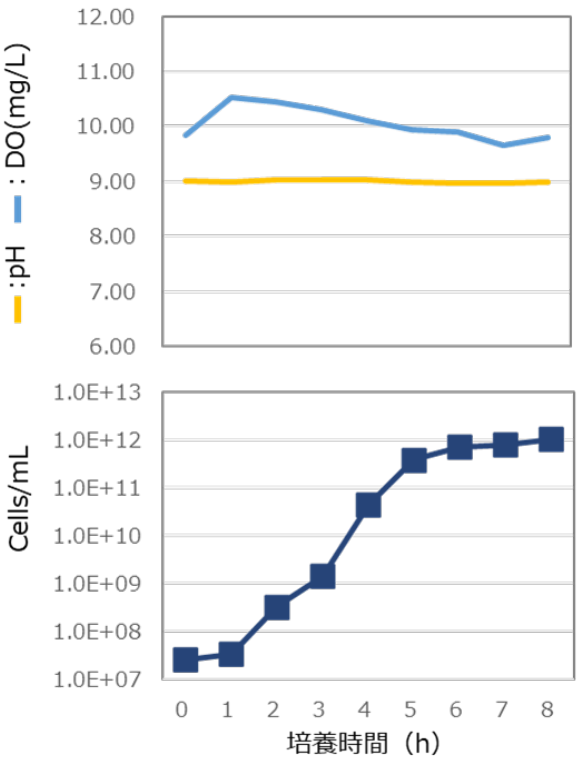
栄養源の投入量は，Basilisk の外割 5kg を参考にした高配合（YE:156g，PHBV:4kg）と中間量配合（YE:78g，PHBV:2kg）を検討した．

両配合ケースにおいて，測定材齢 7 日以内に漏水量が低下し 10 日程度で漏水が止まり，ひび割れの閉塞が確認された．漏水試験後の試験体底面を観察すると，ひび割れ部に白い析出物（炭酸カルシウム）が顕著に発生していた（**写真－1**）．これらの結果から，BiSCo の微生物と栄養源の配合は，生コンクリート $1m^3$ あたり AH 株は 2.0×10^{13}cells 以上，栄養源は YE:78g，PHBV:2kg を外割で添加することとした．

３．微生物大量培養技術の開発

試験管を用いた培養（培養液量 5 ～ 10mL）では，培養 24 時間で 10^9cell/mL 程度にしか増殖させることができない．10L 分の培養を行うことで 10^{13}cells，つまり生コンクリート $1m^3$ 分の微生物生産が可能となる．仮に生コンクリート $100m^3$ 分に対応するには，1000L（$1m^3$）分の培養が必要となるが，試験管培養で対応するには現実的でない．そこで，施工スケールレベルの AH 株を生産可能な培養体制を構築した．

微生物を大量培養する設備として，全容 10L ジャーファーメンター（エイブル社製，**写真－2**）を導入した．温度，pH，通気量といった培養条件を制御することができ，培養液最大 5L での培養が可能である．槽内部に 2 段のディスクタービンが搭載されており，上部直動攪拌方式での培養液の強力攪拌が可能である．この強力な攪拌により，飽和溶存酸素量（8.26mg/L，1 気圧・25℃）を超えた濃度での培養液中への酸素供給を実現する．pH・DO（溶存酸素）および温度センサーが搭載されており，各種データを取得することができる．好気性微生物である AH 株は，十分な栄養と酸素の供給により，速く高い増殖が期待できる．



図－3　DO，pH，細胞数の推移

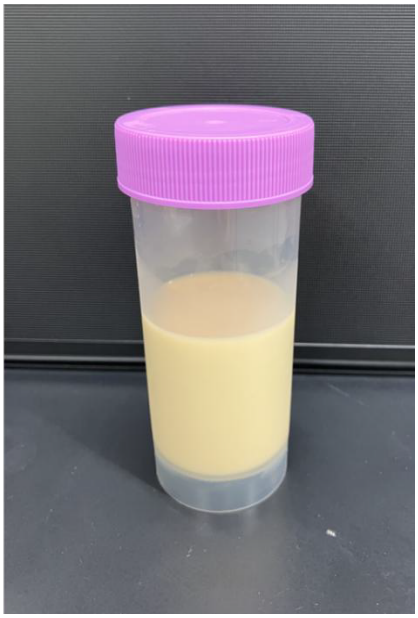
5L の LB 培地（Becton，Dickinson 社製）を使用してジャーファーメンターによる AH 株の培養実験を実施し



写真－2　全容 10L ジャーファーメンター



写真－3　培養 5 時間後の培養液



写真－4　AH 株濃縮液

た（**写真－3**）．培地の初期 pH は 9.0 とし，攪拌回転数 500rpm の設定で溶存酸素量を約 10mg/L をキープして培養を行った．溶存酸素は，培養初期に 10mg/L を超えたが，細胞数の増加に伴って 10mg/L を下回ったが，大幅に減少することはなかった（**図－3** 上）．pH については，培養実験を通して 8.97 ～ 9.02 の範囲で推移しており，ほぼ 9.0 を維持していた（**図－3** 上）．微生物細胞内の核酸に結合する蛍光染色剤（SYBR green Ⅰ，Life Technologies 社製）を用いた蛍光顕微鏡（BZ-X800，キーエンス社製）観察により，培養液中の AH2 株細胞数を計測した．初期細胞濃度は 2.7×10^{7}cells/mL であったが培養時間 2 時間で 3.3×10^{8}cells/mL と 10 倍以上に増加した．5 時間後には 3.9×10^{11}cells/mL と初期濃度比で 10000 倍以上に達し，最終的には 1.1×10^{12}cells/mL となった．全培養液（5L）に含まれる細胞数は 5.3×10^{15}cells と算出された．生コンクリート $1m^3$ あたりに必要な AH 株細胞量 2.0×10^{13}cells を基に計算すると，ジャーファーメンターによる 8 時間の培養で生コンクリート $263m^3$ 分の AH 株を生産することができた．生産された AH 株は遠心分離により細胞を回収し，リン酸緩衝食塩水（PBS buffer；NaCl:8.00g/L，KCl:0.20g/L，Na_2HPO_4：1.44g/L，KH_2PO_4:0.24g/L，pH7.2）に懸濁することで濃縮液として冷蔵保存した（**写真－4**）．製造するコンクリート量に応じ，必要細胞数が含まれる AH 株濃縮液（10 ～ 500mL）を作製して BiSCo 製造に使用した．

4．BiSCo 試験施工

BiSCo は微生物機能を活用しているため，十分な機能発現には水の存在が重要である．したがって，防潮堤，桟橋などの港湾施設やトンネル，橋梁，のり面などの道路設備など水濡れが起こりやすい場所が，機能を発揮しやすく適用性が高いと考えられる．そこで，四国支店が施工中の港湾施設工事において，護岸張り出し桟橋の防潮壁の一区画に BiSCo を試験適用することにした．

4．1　BiSCo 試験練り

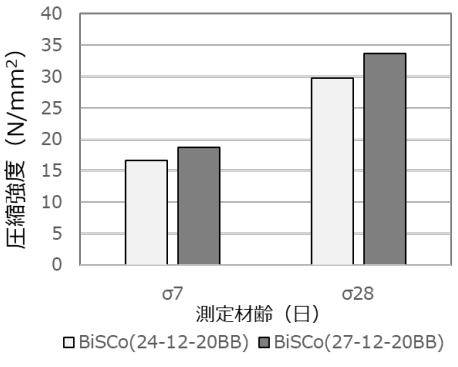
まず，工事で使用している生コンクリート工場において室内試験練りを実施し，BiSCo が設計基準強度を満足するか確認した．24-12-20BB および 27-12-20BB の標準配合に対し外割で栄養源と微生物を混合し，試験練り（30L/ バッチ）を実施した．試験練りのコンクリート配合を**表－2** に示す．AH 株は必要細胞数（6.0×10^{11}cells）を含んだ 10mL の濃縮液を用意し，練り水に添加した．栄養源は必要量（YE:2.3g，PHBV:60g）を骨材とセメントを混合するタイミングで投入した．各試験結果を**表－3** に示す．両配合ともスランプは許容範囲内（12cm ± 2.5cm）であった．24-12-20BB の場合，空

表－2　コンクリート配合

試験分類	配合	W/C (%)	s/a (%)	単位量 (kg/m³)					外割		
				W	C	S	G	AD	微生物栄養源		微生物
					BB	山砂	砕石	減水剤	YE (g/m³)	PHBV (g/m³)	AH2 (cells/m³)
室内試験 (4月3日)	24-12-20BB BiSCo	58.5	46.3	174	298	845	992	C×0.2%	78	2000	2.0×10^{13}
	27-12-20BB BiSCo	53.8	45.4	173	322	818	1000	C×0.2%	78	2000	2.0×10^{13}
実機試験 (5月9日)	24-12-20BB BiSCo	58.5	46.3	174	298	845	992	C×0.2%	78	2000	2.0×10^{13}

表－3　品質確認試験結果

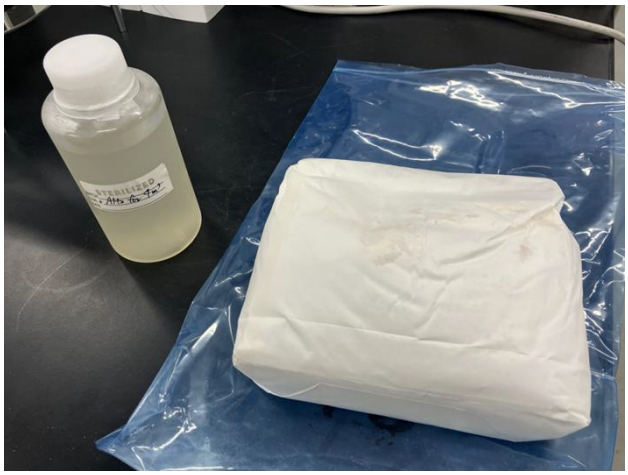
試験分類	配合種別	試料採取	品質確認試験		
			スランプ (cm)	空気量 (%)	コンクリート温度 (℃)
室内試験 (4月3日)	24-12-20BB BiSCo	－	13.5	5.1	16
	27-12-20BB BiSCo	－	12.5	4.3	16
実機試験 (5月9日)	24-12-20BB BiSCo	最初部	13.5	3.4	19
		中間部	14.5	3.9	19
		最後部	14.5	4.2	19



図－4　圧縮強度試験結果

気量が大きくなったが，AE 剤で調整可能な範囲である．圧縮強度試験結果を**図－4** に示す．材齢 28 日強度は 24-12-20BB で 29.8N/mm^2，27-12-20BB で 33.7N/mm^2 であった．いずれも設計基準強度を上回ったことから，今回の BiSCo 製造のベースコンクリートの配合は 24-12-20BB とした．

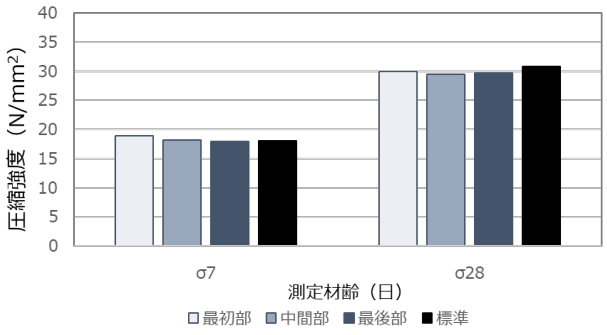
次に，トラックアジテータ車のドラムに栄養源と微生物を後添加する方法による実機試験練り（練り量 1.5m^3）



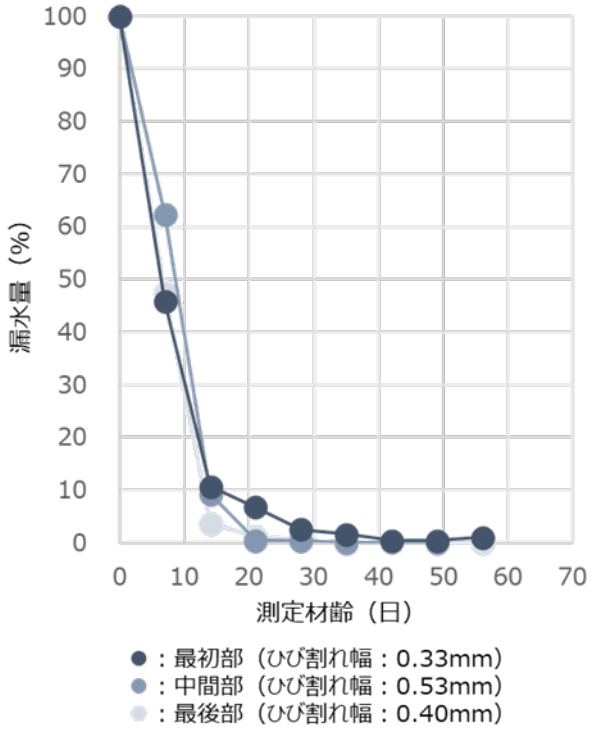
写真－5　AH 株濃縮液と栄養源バッグ



写真－6　実機試験練り結果



図－5　圧縮強度試験結果



図－6　漏水試験結果

を実施し，施工性に影響を及ぼさないか確認した．AH 株は必要細胞数（3.0 × 10^{13}cells）を含んだ 100mL の濃縮液を用意した．栄養源は，水溶性紙袋に YE:20g と PHBV:500g を袋詰めした栄養源バッグを 6 袋用意した(**写真－5**)．バッチャープラントで製造されたベースコンクリートを 4t アジテータ車に投入した後，栄養源バッグ 6 袋と AH 株濃縮液をホッパよりドラム内部に投入した．微生物と栄養源を投入後，ドラムを 2 分間高速回転して投入した資材を混合した．最初部，中間部および最後部の 3 回にわけて受入れ試験と供試体の採取を実施した（**写真－6**)．

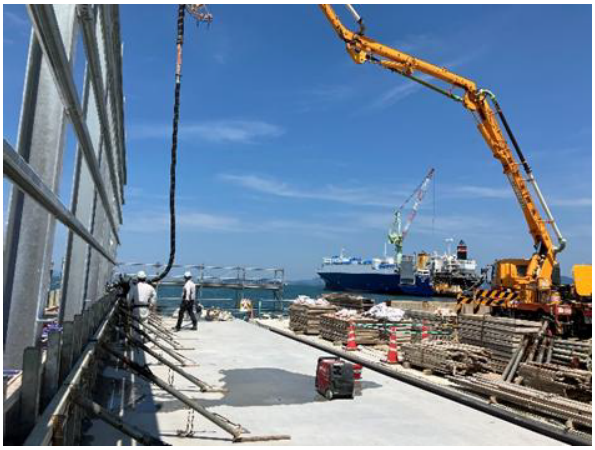
品質確認試験結果を**表－3** に示す．3 回ともスランプは許容範囲内（12cm ± 2.5cm）であった．空気量は最後部になるにつれて増加する傾向が観察されたものの，コンクリートのワーカビリティーへの影響は小さいものと考えられた．圧縮強度試験結果を**図－5** に示す．材齢 28 日強度は標準 30.8N/mm^2 に対し，最初部 30.0N/mm^2，中間部 29.5N/mm^2，最後部 29.7N/mm^2 であった．BiSCo 仕様でない標準と比べ 2.6 ～ 4.2% の強度低下はあるものの，設計基準強度 24N/mm^2 を十分に上回った．さらに，漏水試験を実施し，試験体の自己治癒機能を確認した（**図－6**)．いずれの試験体も測定材齢 14 日で漏水量は 90% 程度減少した．最初部（ひび割れ幅 :0.33mm）と中間部（ひび割れ幅 :0.53mm）は測定材齢 21 日，最後部（ひび割れ幅 :0.40mm）は測定材齢 42 日で止水が確認された．



写真－7　高速回転による BiSCo 製造



写真－8　BiSCo 受入試験



写真－9　BiSCo 打設状況

表－4　受入れ試験結果

	配合	受入れ検査		
		スランプ (cm)	空気量 (%)	コンクリート温度 (℃)
1台目	24-12-20BB BiSCo	12.5	4.5	32
2台目		13.0	4.9	31
3台目		12.5	4.7	30

現地の生コンクリート工場での試験練りを実施し，以下を確認した．

- BiSCo 配合で設計基準強度 24N/mm^2 を満足する．
- 空気量は必要に応じて AE 剤で調整する．
- アジテータ車のドラムに栄養源と微生物を後添加する方法による BiSCo の製造はコンクリートのワーカビリティーに大きな影響を与えない．

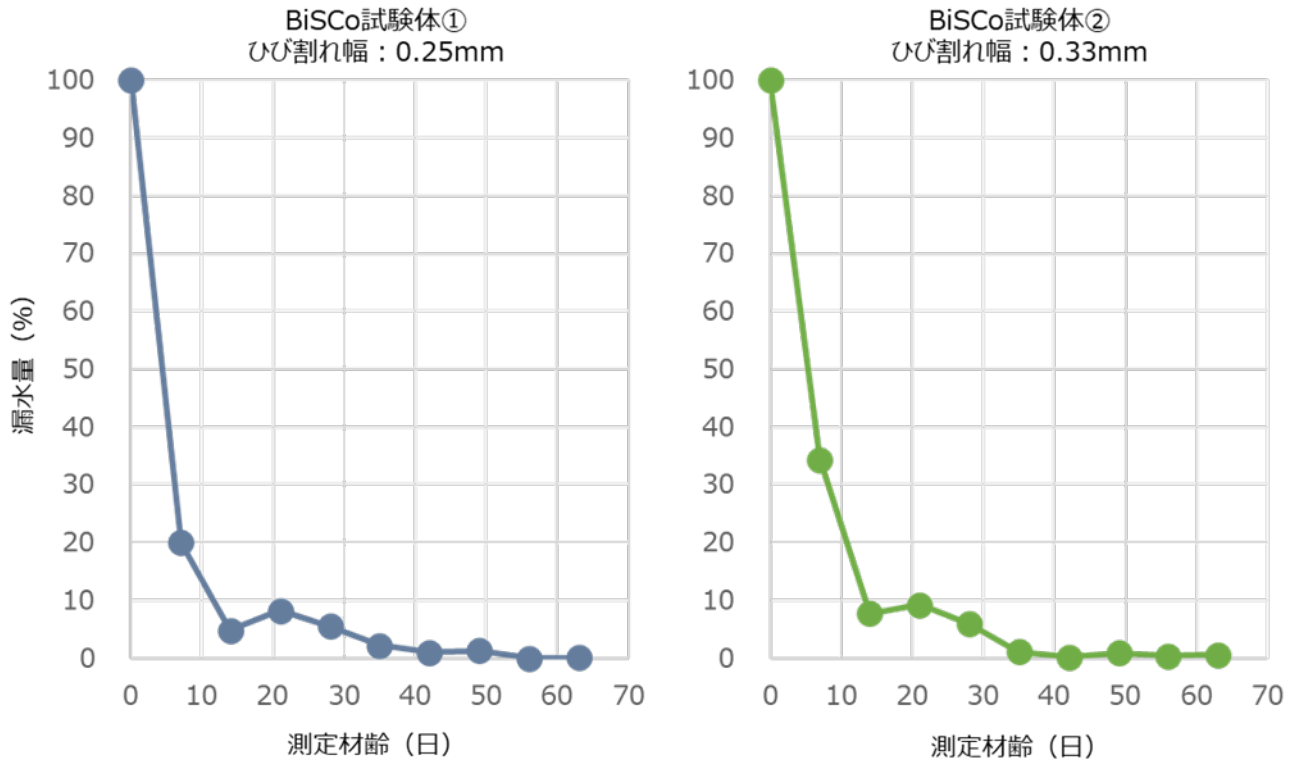


写真－10　完成した防潮壁
（赤破線枠が BiSco）

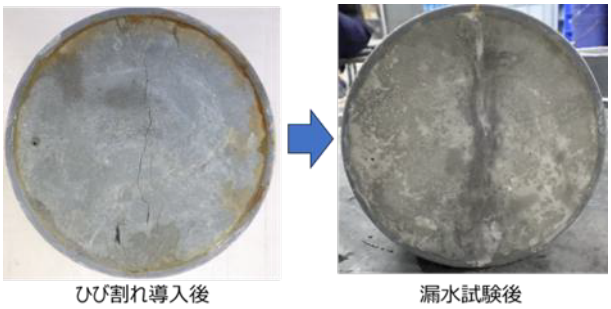
4．2　BiSCo 打設

BiSCo の試験施工場所は，新設する桟橋上の防潮壁とした．打設数量は 10.8m^3 であり，生コンクリート 4m^3 を投入したアジテータ車 3 台分で計画された．アジテータ車 1 台あたり，必要細胞数（8.0 × 10^{13}cells）を含んだ 500mL の AH 株濃縮液と栄養源バッグ（YE:20g と PHBV:500g）を 16 袋用意した（**写真－5**）．BiSCo の製造工程は以下の通りである．生コンクリート工場で製造された生コンクリートをアジテータ車で打設現場に運搬した（運搬時間：約 20 分）．打設現場近くで，栄養源と微生物を投入し BiSCo を製造した（約 15 分，**写真－7**）．受入れ試験と供試体採取（約 15 分，**写真－8**）を実施し，試験結果を確認した後，圧送ポンプにより打設した（**写真－9**）．

受入れ試験結果を**表－4** に示す．コンクリートのフレッシュ性状は，3 台とも大きな違いはなかった．ワーカビリティーへの影響は少なく，ポンプ圧送，締固め作業および仕上げ作業などの打設計画に影響を及ぼすことなく施工することができた．



図－7　漏水試験結果



写真－11　漏水試験前後の試験体底面の状況

4．3　BiSCo の自己治癒機能の評価

打設時に採取し作製した試験体を用いて，漏水試験を実施した．漏水試験結果を**図－7** に示す．いずれの試験体も測定材齢 14 日で漏水量は 90% 程度減少した．測定材齢 14 日以降も漏水量は減少し続け，BiSCo 試験体①（ひび割れ幅 :0.25mm）は測定材齢 56 日，BiSCo 試験体②（ひび割れ幅 :0.33mm）は測定材齢 42 日で止水が確認された．漏水試験後の試験体底面を観察すると，ひび割れ部に白い析出物（炭酸カルシウム）の発生が確認できた（**写真－11**）．BiSCo 試験体では AH 株の呼吸に起因した鉱物化反応によるひび割れ閉塞機能が発現したものと考えられる．

5．まとめ

強アルカリ耐性菌 AH 株を利用した高機能コンクリートであるバイオスマートコンクリート®（BiSCo）の実用化を目指す技術開発に取り組んだ．この開発を通して，AH 株の施工スケールレベルの大量生産技術を確立し，アジテータ車のドラムに栄養源と微生物を後添加する BiSCo 製造方法を考案した．さらに，港湾施設（護岸張り出し桟橋の防潮壁）への試験施工を実施し，実構造物の建設を通して BiSCo 製造法および施工法を実証することができた．BiSCo の機能については，漏水試験の実施により短期的な自己治癒機能の発現は確認された．今後，定期的かつ長期的なモニタリングによって BiSCo 機能を評価していく必要がある．

今回の試験練りや試験施工ではフレッシュ性状に大きな影響は見られなかったが，BiSCo は空気量が多くなる傾向がある．また，骨材や練り水の違いによってスランプ値が大きくなることも確認されている．さらに，栄養源の配合量については最適化（減量化）の余地がある．今後，これらの課題を解決し BiSCo 配合設計の高度化を図りたい．

謝辞

試験施工の実施にあたっては，株式会社新来島どっく大西工場および株式会社カナックスに多大なる協力をいただいた．また，BiSCo の試験練りおよび打設は今治小野田レミコン株式会社の協力により実施された．ここに記し謝意を表する．

参 考 文 献

1）會澤高圧コンクリート;自己治癒コンクリート Basilisk（バジリスク），https://basilisk.co.jp/（2025.11 参照）
2）Jonkers,H.M.，Thijssen,A.，Muyzer,G.，Copuroglu,O.，Schlangen,E.：Application of bacteria as self-healing agent for the development of sustainable concrete, Ecological Engineering, Vol.36, No.2, pp.230 ～ 235, 2010
3）中村孝道，林俊斉，齋藤淳：高機能コンクリート開発に寄与する強アルカリ耐性菌の獲得，安藤ハザマ研究年報，Vol.12，6，2024
4）Nakamura T.,Hayashi T.,Saito A.,Nishida T,Kawaai K. and Koike K.：Isolation of strong alkaline-resistant bacteria for contribution of the Bio-Smart Concrete. Proceedings of the 5th International Symposium on Concrete and Structures for the Next Generation, pp.374-382，2025.
5）林俊斉，中村孝道，齋藤淳，西田孝弘，河合慶有，小池賢太郎：好気性微生物の代謝を活用した鉄筋コンクリートの腐食抑制技術の開発，防錆管理，Vol.69，No.2，pp.47 ～ 52，2025
6）安藤ハザマ：微生物を高度利用したバイオスマートコンクリートを産学官連携で共同開発，https://www.ad-hzm.co.jp/info/2025/20240108.php（2025.11 参照）
7）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研究，コンクリート工学年次論文集，Vol.43, No.1，2021

The development of Bio-Smart Concrete® (BiSCo)
- Development of large-scale cultivation technology for the AH strain and trial construction of BiSCo -

Takamichi NAKAMURA, Atsushi SAITO and Toshinari HAYASHI

Bio-Smart Concrete® (BiSCo) is a high-performance concrete developed using a strong alkali-resistant bacterium (AH strain) discovered by our research team. Ongoing research and development aim to achieve its practical application. Adding the AH strain, which can survive under strong alkali conditions, and nutrients to concrete enables it to precipitate calcium carbonate, thereby providing self-healing properties that rapidly seal cracks. It also actively consumes dissolved oxygen, thereby providing a rust-proofing effect for reinforcing bars. To demonstrate the practical application of BiSCo, the development of large-scale cultivation technology for the AH strain was undertaken, successfully producing AH strain sufficient for over 200m³ of fresh concrete in a single cultivation. A trial construction was carried out at a port facility, with 10m³ of cast-in-place BiSCo using the AH strain being placed in the flood barrier.