

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：55401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06219

研究課題名(和文) バイオスティミュレーションを利用した地盤改良工法の研究

研究課題名(英文) A study on ground improvement method using bio-stimulation method

研究代表者

加納 誠二 (KANO, Seiji)

呉工業高等専門学校・環境都市工学分野・教授

研究者番号：40280408

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究はバイオスティミュレーション法を用いた地盤改良工法について検討している。検討には沖縄県のビーチから採取した試料と、広島県呉市で採取されたまさ土と2種類の校庭の砂を用いた。検討の結果、従来の方法と比較し、バイオスティミュレーション法を用いた方法では固化速度が若干遅いが、条件によっては十分な改良効果が見られた。また固化中の地中の菌叢変化を調べたところ、室温30℃下では改良が進むにつれてウレアーゼ活性が期待されるSporosarcina属の菌類が優占的となり、室温が低いと菌の成長が遅いことや、固化工程の前に地中内にウレアーゼ活性菌を培養した方が比較的均質に固化できることが確認された。

研究成果の概要(英文)：This study aims to examine the possibility of ground improvement method using bio-stimulation method. For the study, samples taken from the beach in Okinawa Prefecture and two kinds of schoolyards and a weathered granite collected in Kure City, Hiroshima Prefecture were used.

As a result of examination, a solidification rate was slightly slower in the method using the bio-stimulation method than in the conventional method, but sufficient improvement effect was observed on some samples. In addition, investigations of changes in the microflora of the formation during solidification revealed that fungi of the genus Sporosarcina, which are expected to have urease activity, become dominant as the improvement progresses at room temperature of 30 degree. When the room temperature is low, the growth of these fungus is very slow. It was also confirmed that relatively homogeneous solidification was possible by culturing urease-active bacteria in the ground before the solidification step.

研究分野：地盤工学

キーワード：地盤改良 バイオスティミュレーション 微生物

1. 研究開始当初の背景

欧米を中心に近年微生物を利用した地盤改良技術が提案され、注目を集めてきた。この工法は地盤中に微生物と微生物を利用した地盤改良工法が提案されている¹⁾。この工法は地中に微生物と餌となる栄養源、カルシウムイオンを投入し、微生物活動を利用して土中に炭酸カルシウムを生成させて固化する工法であり、環境への負荷が小さい次世代の地盤改良技術として非常に高い注目を浴びている。

研究代表者は、これまでに微生物を利用した地盤改良工法についての研究を行っている。平成 21 年から 22 年度科研費の援助を受けてこの方法を適用した地盤の静的・動的変形特性について研究している²⁾。その結果、非常に緩い砂試料に適用した場合でも、強度効果が見られ、液状化に伴う変形が抑えられる傾向にあることを明らかにし、また現在は豊浦砂以外への適用性を検討するため、まさ土(風化花崗岩質)など異なる岩質の砂への適用性について検討して、効果があることを確認している²⁾。

また平成 24 年～26 年の研究では、沖縄にあるビーチロックから採取した微生物の活用の可能性について検討し、ビーチロックから採取した微生物も活用可能であることを明らかにするとともに、牡蠣殻をカルシウム源として活用するためには、一度イオン化しなければ難しいこと、およびその際の塩分濃度が高すぎると微生物の活動が阻害され、固化できなくなることなどを明らかにしている。

しかし、これまでの方法では一旦ビーチロックや地盤から対象となる微生物を採取、単離、培養しなければならず、時間と費用が掛かる上、地盤改良技術を活用した地域の在来種への影響なども不明であった。

そこで、従来の微生物と栄養源を地盤に注入するバイオオーグメンテーション工法ではなく、地盤に定住している微生物を活用し、栄養源だけを地盤に注入して固化するバイオスティミュレーション工法による地盤改良工法の開発が望まれている。

2. 研究の目的

本研究ではバイオスティミュレーション工法を活用した地盤改良工法の開発を目的に、バイオスティミュレーションに工法による固化の可能性、どのような微生物が固化かに作用しているのか、育成環境(温度)の影響について明らかにすることを目的としている。

3. 研究の方法

(1) バイオスティミュレーション工法を活用した地盤固化の可能性

バイオスティミュレーション工法を活用した地盤改良工法の固化の可能性を明らかにするため、まず室内での検討を行った。

実験 では、試料中に尿素を分解できるウ

レアーゼ活性菌株が存在するかどうかを調べるため、ウレアーゼ活性試験を行った。チューブに培養液(尿素、酵母)、試料片を入れ 35 で菌株を培養し、48、72 時間後、1 週間後の pH を測定した。pH が 9 以上になれば活性ありとした。試料はビーチロック形成がみられる沖縄県の 9 か所(A:石垣島明石、B:石垣島伊原間、C:石垣島大浜、D:石垣島大浜、E:竹富島、F:黒島、H:西表島、I 小浜島細崎、)の海岸から、また、一般の地盤でも実用可能であるか検討するため、呉高専の 2 か所(J:環境都市工学科棟南側、K:武道場そば)から採取した試料を用いた。

実験 では、実際に炭酸カルシウムが析出できるかどうか、チューブに培養液(尿素、酵母、塩化カルシウム)と試料片を入れ、35 で 48 時間振とうし、炭酸カルシウム析出実験を行った。ここでは生成された炭酸カルシウムと培養された菌とを分離して取り出すことができなかつたため、両者の総量を求めることとした。

実験 では、ウレアーゼ活性が認められた試料から菌株を単離し、バイオオーグメンテーション用菌株として利用し、バイオスティミュレーション法を用いた場合とバイオオーグメンテーション法を用いた場合の改良効果の違いについて検討した。

ウレアーゼ活性菌株を単離できたのは 4 試料(A、G、J、K)であった。また従来法で用いられている培養液・セメンテーション溶液から酵母エキス、尿素、酢酸ナトリウム、塩化アンモニウムを含む液に変更して検討した。

実験 では改良効果を調べるため、アクリル製のシリンダー(直径 50mm × 高さ 120mm の円筒形)内に地盤から採取したままの試料を入れ、バイオオーグメンテーション法とバイオスティミュレーション法の両方で固化し、強度の比較を行った。

オーグメンテーション法に用いる試料は炉乾燥させて殺菌し、スティミュレーション法に用いる試料は自然乾燥とし、容器に相対密度が 70%程度になるように詰めた。

オーグメンテーション法では、単離した菌をセメンテーション溶液 X' 内で 48 時間培養した。培養後、オーグメンテーション法を行う供試体にのみ培養した菌株を注入し、菌の固定のため一晩静置した。その後セメンテーション溶液 X を全ての供試体に 12 時間ごとに注入し、供試体の改良を行った。表 1 に実験条件を示す。

表 1 実験 の実験条件

Test No.	試料	改良方法
Test11	A	オーグメンテーション法
Test12	A	スティミュレーション法
Test13	G	オーグメンテーション法
Test14	G	スティミュレーション法
Test15	J	オーグメンテーション法
Test16	J	スティミュレーション法
Test17	K	オーグメンテーション法
Test18	K	スティミュレーション法

なお、注入回数について、Test11~14 は 10 回(5 日間)、Test15~18 は 20 回(10 日間)とした。この理由は、H24 から 26 年までのバイオオーグメンテーション工法を用いた実験に比べ、カルシウムイオン濃度を下げたため、Test11~13 で固化が認められなかった。そのため、Test15 - 18 では注入回数を多くした。

供試体改良後、一軸圧縮試験を用い、力学特性について検討した。

実験 ~ により、バイオスティミュレーション法による地盤固化の可能性が確認する。

(2) バイオスティミュレーション法による地盤固化で活躍する菌株の種類について

実験 では、ビーチロックが形成されている沖縄県の3箇所(L: 沖縄県中頭郡読谷村 M: 沖縄県中頭郡読谷村日航アリビラ前、N: 沖縄県国頭郡群本部町エメラルドビーチのビーチからビーチロックとその周辺の砂を採取し、そこからウレアーゼ活性菌を単離し、ウレアーゼ活性菌株のDNAを抽出しPCR(ポリメラーゼ連鎖反応)を行った後、サンガーシデオキシ法による塩基配列解析を行った。

実験 では、改良中の地盤内の菌叢の変化を調べるために、模型地盤を用いた改良実験を実施し、固化中の菌叢の変化と地盤の強度について検討した。

用いた試料は、ビーチロックが掲載されている沖縄県国頭郡本部町Lおよび沖縄県中頭郡読谷村Nのビーチで採取した試料と、呉高専環境都市工学科棟南側校庭で採取した2種類の試料(O,P) 呉市で採取したまさ土(Q)の計5種類を用いた。どれも室内で2mmふるい通過分を自然乾燥させて用いた。

容器は2種類用いた。容器 は170×280×210mmで、容器 は100×240×160mmで、中ほどの仕切りで2分割に仕られている。培養液・セメンテーションは(1)で用いたXと同じものとした。本実験では、培養液・セメンテーション溶液を一旦試料下端から輩出し、下端のコックを閉じて容器上面から間隙の1.2倍程度の量を散布した。

セメンテーション溶液は1回目の散布後24時間放置し、その後は12時間ごとに液の交換を行った。

表2に実験条件を示す。培養期間とはセメンテーション液を流す前に培養液を流し、地盤中にウレアーゼ活性菌を培養した期間を示す。また呉高専 の試料は(1)の呉高専環境都市工学科棟南側と同じであるが、呉高専 はそこから15~20mぐら離れた同じような場所で採取された試料である。

また、これらの試験中で培養期間中、1日ごとに培養液を採取し、培養液益虫の菌叢の変化についてCTAB法とMiSeqを用いた次世代シーケンス(DNAメタ解析)により、DNA情報を収集し、NCBI(The National Center for Biotechnology Information)のBLASTを使いて遺伝子解析を行った。

表2 実験 の実験条件

TestNo	試料	室温	培養期間
Test21	Q	30	0
Test22	P	30	0
Test23	L	30	0
Test24	N	30	0
Test25	Q	30	7
Test26	O	30	7
Test27	N	30	7
Test28	Q	10	0
Test29	P	10	0
Test30	Q	20	0
Test31	O	20	0

なお、Test23、24については廃液の管理ミスにより正確な菌叢の変化を調べられなかったため、DNAメタ解析を行っていない。

(3) 育成環境(温度)の影響

バイオスティミュレーション法を用いた地盤改良工法では、微生物の活動度が改良効果に影響を及ぼすことが予想される。これまでの研究の多くは、ウレアーゼ活性が期待される菌(例えばSporosarcina Pastueri 菌)の至適温度である30度前後に室温をコントロールされていたが、本研究では10度と20度での環境でも実験(Test28~31)を行った。

実験 では、(2)で改良を行った模型地盤に対し小型コーン貫入試験を実施し、強度の深さ方向分布を調べた。用いたコーンは直径20mm、長さ50mmのコーンである。なお、通常コーン貫入試験ではコーンが全部地中に入ってから計測を開始するが、本実験では模型が小さいため、先端から計測を開始している。このため、試料上層では断面積が小さい影響で強度が極端に大きくなっている場合がある。おな、比較のため未改良地盤でも小型コーン貫入試験を実施している。

4. 研究成果

(1) バイオスティミュレーション工法を活用した地盤固化の可能性

表3に実験 の試験結果を示す。結果から、それぞれウレアーゼ活性がみられる時間に差はあるが、すべてに活性をもつ菌株が存在していることが分かった。

表3 ウレアーゼ活性試験結果

試料	0h	48h	72h	1w
A	x			
B	x			
C	x			
D	x			
E	x	x		
F	x	x	x	
H	x	x		
I	x	x	x	
J	x			
K	x			

pH9 以上、x pH9 未満

図1に実験 でも求めた炭酸カルシウムと菌の総量結果を示す。図からすべての試料で炭酸カルシウム析出が確認できたが、試料K(呉高専武道場西側)の試料が一番炭酸カル

シウムと菌株の質量が多いことがわかる。

また、沖縄県から採取した試料の中で最も炭酸カルシウムと菌株の質量が大きいのは試料 E(竹富島港西側)であるということもわかった。さらに、試料 C・D(石垣島大浜海岸・)は違う菌株が存在している可能性があることも読み取れる。(試料 I 細崎海岸は炭酸カルシウム析出は見られたが測定結果は負の値となり、測定不能となった。)

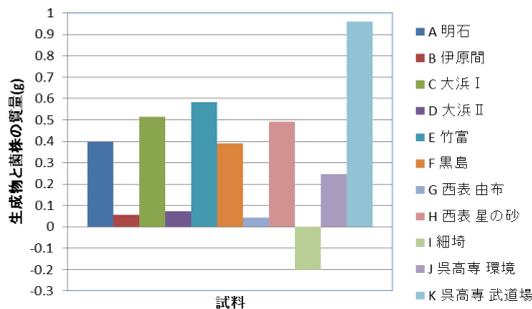


図1 生成物(炭酸カルシウム)と菌の質量

実験の結果から、採取できた菌株のいずれもXの溶液でも炭酸カルシウムの析出率が高いことが分かったため、これ以降の実験ではXを採用することにした。また、明石の菌株は他の菌株に比べてカルシウムを多く生成することも分かった。

実験では、改良中、尿素が分解されているか確かめるため、供試体にセメンテーション溶液を注入する際、pHを計測した。その結果、明石、呉高専2箇所合計3つの菌株はオーグメンテーション法では計測2日目に、由布の菌株は3日目にpH9を示した。一方スティミュレーション法では明石、由布、呉高専環境は3日目に、武道場は4日目にpH9を示した。このことから全ての試験で尿素は分解されているが、オーグメンテーション法の方がより速く尿素を分解することがわかった。これより、バイオスティミュレーション法を現場に用いるためには、培養液中の溶質の濃度と培養期間を適切に設定する必要があることが分かる。

改良後試料が自立したのはTest14~18の計5本であった。Test11~13について自立なかったため強度の測定が困難であった。

図2にTest14~18から得た圧縮応力ひずみ関係の図を示す。

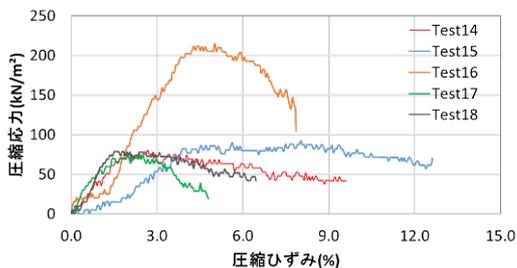


図2 一軸圧縮応力とひずみの関係

図3にそれぞれの最大圧縮強さを示す。図5からわかるように呉高専環境都市工学科

棟南側の試料を用いたスティミュレーション法による地盤改良が最も大きな圧縮応力を示した。呉高専で採取した試料は両方とも、同等または、オーグメンテーション法による改良法を用いたときよりも、スティミュレーション法による改良法を用いた方が強度は大きい値を示した。これより、地盤改良においてはスティミュレーション法でも十分改良効果が得られることが分かった。

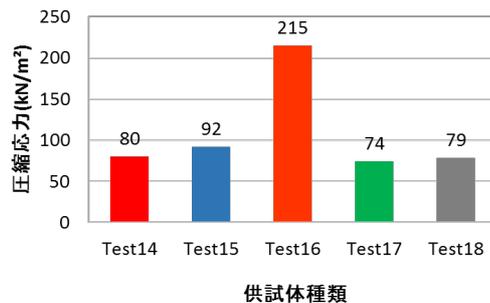


図3 最大一軸圧縮強さの比較

以上より、バイオスティミュレーション法により地盤を固化することが可能であるが、均質性や速度については未だ解明できておらず、実際の工事に適用するためには更なる検討が必要である。

(2) バイオスティミュレーション法による地盤固化で活躍する菌株の種類について

表6に実験で得られたDNA解析の結果を示す。表より、全ての試料で98%以上という高い相同性を示す菌を同定することができた。

表6 DNA解析結果

分離源	株名	最類縁種
読谷村 細かい砂	Yomitan 1号	Lysinibacillus macrolides : 100%
	Yomitan 2号	Lysinibacillus boronitolerans : 100%
読谷村 粗い砂	Yomitan 3号	pseudomonas aeruginosa : 100%
読谷村 岩片	Yomitan 4号	Massilia kyonggiensis : 98%
日航アリビラ 砂	Nikko 1号	Bacillus songkensis : 99%
日航アリビラ 岩片	Nikko 2号	Thalassospira povovilytica : 100%
エメラルドビーチ 砂	Emerald 1号	Lysinibacillus macrolides : 100%
	Emerald 2号	Lysinibacillus boronitolerans : 100%
エメラルドビーチ岩片	Emerald 3号	Bacillus fengquensis : 99%

(: 右の数値は相同性を示す。)

実験の結果を以下に示す。

まず培養菌を設けたTest25および26の結果を図4, 5に示す。Test25の1日目やTest26の1~2日目から分かるように、始めは必ずしも優占的な菌ではなかった土壌固化菌 Sporosarcina sp.を含むFirmicutes門が、培養液を流していくにつれて優占となっていることが分かる。

図4、図5の中で最も割合の高かったFirmicutes門の中の菌叢変化を調べると、Firmicutes門内での菌叢変化では、呉高専の土とまさ土どちらとも Sporosarcina sp.、Sporosarcina aquimarina、Sporosarcina globisporaを含む Sporosarcina の割合が高くなっており、そのことから Sporosarcina

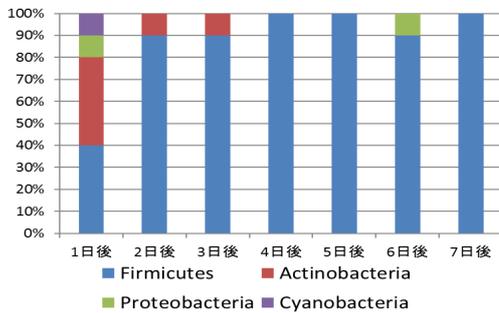


図4 培養中の菌叢変化 (Test25)

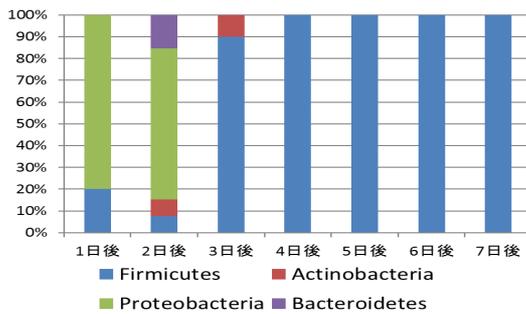


図5 培養中の菌叢変化 (Test26)

の土壌固化の効果が分かる。

一方、図は省略するが Test27 ではウレアーゼ活性が期待できる Sporosarcina 属の割合が3日目にはピークに達していたが、徐々に減少しており、この理由は明らかにできていない。実験中の pH の変化を調べると、2日目には pH が 9 前後に達した後 7 日目まではほぼ一定であったが、7 日目以降に急に 7 付近まで減少している。後述するコーン貫入抵抗値も上層の一部を除き、未改良のものと同程度であり、菌叢変化と整合する結果であった。

また固化前に培養しない Test21 や Test22 での菌叢変化の検討の結果、Test21 のまさ土ではもともと存在していた菌種の多様性が低く、セメンテーション溶液の散布に伴い、優占的であった Arthrobacter 属の菌が急激に減少する一方で Bacillus 属や Sporosarcina 属の菌が優占になっていることがわかった。他方、Test22 の呉高専の試料では、もともと多くの種類の菌が存在していたが、液を散布するにつれ、Sporosarcina 属 Bacillus 属が優占になっている。このことはバイオスティミュレーション法でもウレアーゼ活性菌が地中で優占的になり、固化が期待できることを示していると考えられる。

室温 10 度の Test28 および 29 では、ウレアーゼ活性菌である Sporosarcina 属や Bacillus 属の菌は増えてはいるものの、まだ少なく、改良効果が出るには至っていなかった。今回は実験の制約上期間を区切って行っているが、今後期間を長くすると改良効果が見られるのか検討が必要である。

(3) 育成環境 (温度) の影響

実験の結果を図6に示す。図6は Test21 ~ 31 までの改良後の深さ方向のコーン貫入抵抗値の深さ方向分布図を示す。

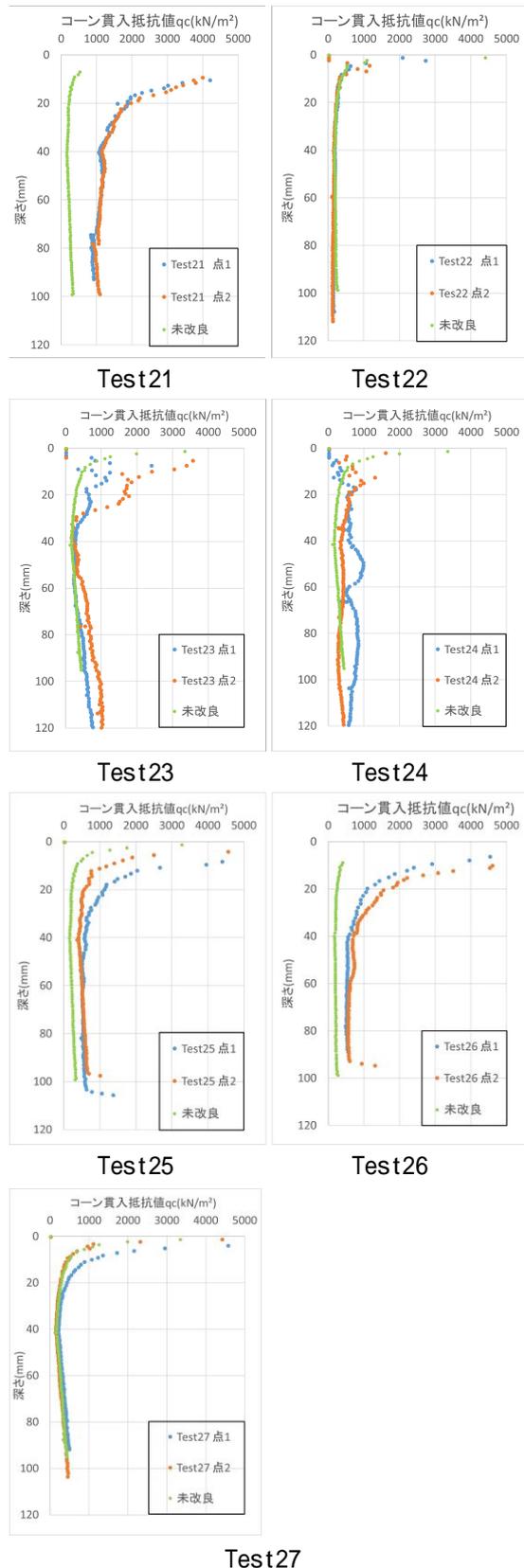


図6 コーン貫入抵抗値の深さ方向分布

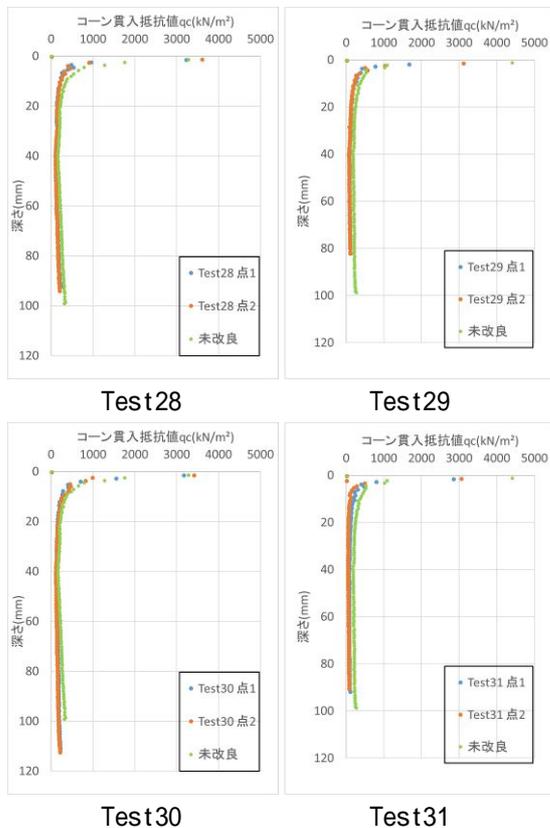


図6 コーン貫入抵抗値の深さ分布 (つづき)

この図より Test22 を除き、室温 30 のテストでは未改良地盤よりも上部から下層まで貫入抵抗値が大きくなっているが、10、20 のテストでは改良効果が見られない。また培養期間を設けた場合とそうでない場合とを比較する (Test25 と 21、Test26 と 22、Test27 と 24 を比較) と、培養期間を設けた場合は下層まで比較的均質に固化できているが、培養していない場合、ばらつきが大きいことが分かる。ただし、培養期間がないケースの方が強度が大きいケースも見られるなど、本工法を実地盤に適用する場合には、固化期間の設定等について更なる検討が必要である。

以上より、バイオスティミュレーション法を用いた地盤改良工法でも培養液・セメンテーション液を散布することで、土中のウレアーゼ活性菌の働きにより地盤中に炭酸カルシウムを生成し、地盤を固化できることが明らかとなった。しかしながら、ばらつきも認められるため、バイオスティミュレーション法を実工事に適用するためには、環境に合わせた固化期間の設定や、培養液・セメンテーション溶液の混合割合など更なる検討が必要であると思われる。

引用文献

1) 例えば、1) Jason T.DeJong、Brina M.Mortensen、Brian C.Martinez、Douglas C. Nelson : Bio-mediated soil improvement、

Ecological Engineering、pp5-13、2007.

2) 加納誠二：自然由来の微生物を用いた既存宅地の耐震補強工法の開発 (課題番号 21760373)、科学研究費補助金報告書 (若手研究(B)、2011、

3) 加納誠二：牡蠣殻と日本在来種の微生物を用いた地盤改良工法 (課題番号 24560614)、科学研究費補助金成果報告書 (基盤研究C)、2014.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

鹿瀬敏希、加納誠二、森脇武夫、重松尚久：バイオスティミュレーション法により改良した地盤の深さ方向の強度分布に及ぼす温度と培養期間の影響、平成 30 年度土木学会年次学術講演会、2018 年 8 月 29 日～31 日、北海道大学(北海道、札幌市)

鹿瀬敏希、加納誠二

バイオスティミュレーション法により改良した地盤の深さ方向の強度分布、第 69 回平成 29 年度土木学会中国支部研究発表会、2017 年 5 月 27 日、広島大学 (広島県、東広島市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加納 誠二 (KANO, Seiji)

呉工業高等専門学校・環境都市工学分野・教授

研究者番号：40280408

(4) 研究協力者

森脇 武夫 (MORIWAKI, Takeo)

広島工業大学・環境土木工学科・教授

研究者番号：00166456

木村 善一郎 (KIMURA, Zenichiro)

呉工業高等専門学校・環境都市工学分野・助教

研究者番号：60756617

田邊 俊朗 (TANABE, Toshiaki)

沖縄工業高等専門学校・生物資源工学科・准教授