

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：15401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2017～2021

課題番号：17K18909

研究課題名（和文）深海域保全・活用を目的とした新しい「海底微生物地盤工学」分野創出の試み

研究課題名（英文）The proposed on a new field of "submarine microbial geotechnics" for conservation and utilization of deep-sea areas

研究代表者

畠 俊郎（Hata, Toshiro）

広島大学・先進理工系科学研究科（工）・教授

研究者番号：30435424

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,700,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では深海域の鉱物・エネルギー資源の開発等への貢献を目指した「海底微生物地盤工学」の創出を目指し、既に現地に生息する微生物の機能を活用した地盤改良技術の提案などに取り組んだ。具体的には、低温・高圧の深海域で採取したコアサンプルの微生物群集構造を解析や、単離微生物の持つ結晶化機能を活用したセメント改良土の劣化抑制効果などを明らかにした。期間中の新型コロナウイルス感染拡大により、附属練習船による暴露試験体の設置・回収に制限を受けたため、緊急性が高く、地盤工学分野からの貢献が可能なマイクロプラスチックに焦点を当て、一般的に用いられている装置を用いた堆積物からのMP迅速検出法の提案に取り組んだ。

研究成果の学術的意義や社会的意義

海底に眠る未利用の鉱物・エネルギー資源の開発にあたっては原位置の生態系を可能な限り活用しつつ、環境への影響を最小限とした条件の下で必要とされる地盤強度等の機能強化が重要と考えられる。本研究では、このような観点を含めた「海底微生物地盤工学」の提案を目標とし、深海底から回収した土壌サンプルから自的微生物を効率的に単離する方法、セメントと微生物の組み合わせることによる長寿命化、新たな環境問題として関心が高まっているマイクロプラスチックの堆積層内への蓄積状況の迅速評価法の提案、を行った。本検討の結果から、地盤工学的観点からの海洋微生物活用方法と、地盤工学的視点からのMP迅速検出法を提案できた。

研究成果の概要（英文）：In this study, the creation of a new field of "seafloor microbial time engineering" is proposed that utilizes the functions of microorganisms already living in situ as a ground improvement technology applicable to the development of mineral and energy resources in the deep sea area, which is expected to be utilized in the near future. Specifically, we analyzed the microbial community structure of core samples collected from deep-sea areas at low temperatures and high pressures and evaluated the degradation characteristics of cement-improved soil using isolated microorganisms. The spread of the new coronavirus infection during the period of the project severely restricted sample installation and collection using the university's training ship. Therefore, we focused on microplastics, which are urgently needed, and proposed a method for detecting them in marine sediments using equipment commonly used in geotechnical engineering.

研究分野：地盤工学

キーワード：地盤工学 海洋環境 微生物固化 マイクロプラスチック

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

四方を海に囲まれた島国である日本は陸域面積が世界 61 位である一方、領海+EEZ(Exclusive Economic Zone:排他的経済水域)の面積は世界第 6 位となっている¹⁾。この海域は豊かな水産資源をもたらす「恵みの海」として我々の生活を支えている。この豊かな恵みをもたらす海洋環境の保全にとって課題とされているのが海洋プラスチックごみ(中でも 5mm 以下の微細なマイクロプラスチック)問題である。マイクロプラスチックは商品として利用されたプラスチックが紫外線や風雨にさらされて劣化・粒状化するものと、生産段階で発生するもの大きく 2 つに大別されるが、いずれも最終的には海底表層に堆積することとなり、堆積状況の把握等地盤工学的観点からの対応が必要と考えられる。

さらに、安全保障の観点から日本周辺海域を見た場合には、深海底に存在する豊富な鉱物・エネルギー資源の開発に向けた検討が必須となる。

海域(特に深海域)は生命発祥の場所と想定されていることに加え、人為的影響が少なく太古の地球環境を保全した領域であるとされる。そのため、現在の海底表層堆積物における人間活動の影響把握(堆積物中に含まれるマイクロプラスチックの迅速かつ安価な検出法の提案)と、可能な限り原位置生態系を活用した新しい地盤改良技術の提案、が今後の海域環境利用促進に必須であると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、1. で述べた今後の海域環境利用促進で必須と考えられる 2 つの項目についての検討を実施し、得られた成果を統合することで新たに「海底微生物地盤工学」の提案を目指すこととした。

なお、提案にあたっては地盤工学を専門とする技術者・研究者にとって可能な限り既存の設備が活用可能であり、新たな投資をできる限り抑える構成で実施可能であること、既存技術をベースとし、環境への配慮を行う中で原位置微生物の持つ機能を活用する方法とすること、の 2 項目に取り組むこととした。

3. 研究の方法

1. で述べた 2 つの項目それぞれに関する研究方法を以下に述べる。

3.1 海底堆積物からのマイクロプラスチック(MP)検出方法について

現在、年間 1000 万トンを超えるプラスチックごみが海洋に放出されているされ、SDGs14-1 において海洋ごみ等による海洋汚染の防止と削減がうたわれるなど海洋環境の保全において対策の推進が喫緊の課題とされている。

環境中に排出されたプラスチック類は、海洋生物が誤食して死に至るケースや、プラスチック類に含まれる有害化学物質や、海洋プラスチック表層に形成される生物膜を介した吸着による生物濃縮等による影響が懸念されている。

この海洋に排出されたプラスチック類の多くは海流の流れなどにより広範囲に移動することが知られている。この海面付近での移動時にプラスチック表層に形成されたバイオフィーム等を介して懸濁物質を吸着し、比重が重くなることにより最終的に海底表層に堆積することとなる。この海底表層に堆積したマイクロプラスチック類は表面に懸濁物質を吸着していることから密度の高い流体を用いた比重選別や有機物の分解といった前処理が必要となったり、前処理後の堆積物からの検出においても表面の色が堆積土砂類と類似しているため目視による検出が困難といった課題が指摘されている²⁾。加えて、マイクロプラスチックの識別・同定には目視や実体顕微鏡といった基本的な実験器具に加え、蛍光顕微鏡、電子顕微鏡を用いる場合や、さらにプラスチックポリマーの材質を調べ MP の種類を同定することを目的としてフーリエ変換赤外分光法(FT-IR)、ラマン分光といった化学分析が適用されることも少なくない。

本研究課題で対象としている地盤工学を専門とする技術者、研究者にとってこれら化学分析を適用することは困難である場合が少なくないことから一般的な地盤実験室で保有している(と考えられる)設備を使って堆積物からの MP 選別、MP 種類の推定までを可能とする新しい分級・染色方法の提案を行った。提案する手法の流れを図-1 に示す。

地盤工学分野で一般的に用いられている粒度試験方法を参考に湿式分級を行った後にプラスチック染色剤を用いた前処理(加温染色)を行う。分級・染色後の MP 交じり堆積物について目視もしくは光学顕微鏡による観察を行い MPs の検出を行う。なお、提案手法では加温温

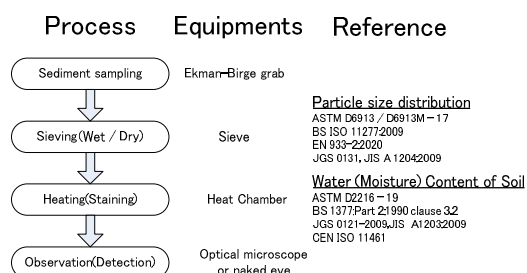


図-1 堆積物向分級 染色法手順

度を任意に設定することにより、簡易的ではあるがプラスチック種の確認が可能になるという利点を持つ。

3.2 目的微生物の単離手法の提案とセメント改良土と原位置微生物の組み合わせによる長期安定性確保について

「海底微生物地盤工学」の提案にあたっては、目的とする能力を持つ微生物が対象となる海底地盤にすでに存在しているかどうかの確認、対象となる微生物機能の活用による地盤工学的課題の解決が必須となる。研究期間内については深海底から採取したコアサンプルを用いた目的微生物の単離、については浅海・深海域での長期暴露試験による微生物固化併用セメント改良土の長期安定性向上効果、の2つに取り組むこととした。

以下、項目ごとに試験方法を述べる。

3.2.1 目的微生物単離手法の提案

本研究では堆積物内に生息しているであろう多様な微生物の中でも特に尿素の加水分解酵素である「ウレアーゼ」生産能力に着目し、浅海・深海中で採取した堆積物サンプルからの迅速スクリーニング手法に取り組むこととした。提案する単離手法を図-2に示す。サンプリング時は事前に器具をエタノール等で消毒するなどし、可能な限りコンタミネーションを抑制することとした。その後、滅菌済培地(TSBおよびNH₄-YE)に尿素添加有、無の条件で培養を行い、生育が認められたコロニーを単離し、ウレアーゼ活性の測定を行い、目的微生物の単離に適した単離手順についての知見を得ることとした。

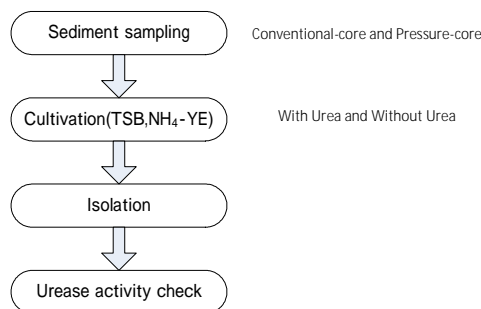
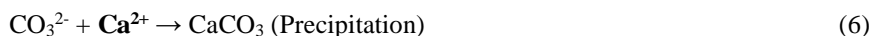
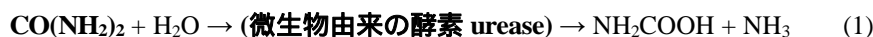


図-2 目的微生物単離手順

3.2.2 浅海・深海域での長期暴露による微生物固化併用セメント改良土の長期安定性向上効果

地盤改良分野で広く用いられているセメント改良土は、海水暴露環境下でカルシウム マグネシウム間のイオン交換により劣化が進行することが報告されている³⁾。この問題に対し、イオン交換に伴って溶出するカルシウム分を微生物機能により再度セメント改良土中に固定することで劣化を抑制する手法の有効性について検討することとした。

セメント改良土の劣化抑制メカニズムを式(1)～(6)に示す。なお、式(1)に示した尿素(CO(NH₂)₂)と酵素生産能力を持つ微生物は改良土施工時に添加することとし、セメント改良土の劣化により生成された空隙中に海水が浸透することで式(1)～(5)の反応が進行し、同時並行的に進行するカルシウム マグネシウム間のイオン交換(セメント改良土の劣化)により空隙中に溶出したカルシウムイオンを式(6)の反応を通じてセメント改良土中に炭酸カルシウムとして再固定する効果を期待している。



暴露試験は室内(実験室)、浅海域(富山湾および大村湾)、深海域(日本海)の計4か所で実施し、劣化抑制効果を劣化深さ等により評価することとした。

試験ケース一覧を表-1に示す。なお、試験には試験海域の底泥から単離されたウレアーゼ活性陽性菌(*Sporosarcina*属)を用いることとし、固化剤には普通ポルトランドセメントを用いた。

表-1 暴露試験配合一覧

Case	A	B	C	D
Clay [g]		1000 ($w = w_L \times 1.5 = 192.5\%$)		
OPC [kg/m ³]		75		100
Urea [g]	-	3.39	-	3.56
Bacterial culture solution [%]	-	6.20	-	6.20

4. 研究成果

4.1 海底堆積物からのマイクロプラスチック(MP)検出方法について

代表的なプラスチックとして選定した PP (ポリプロピレン), PE(ポリエチレン), PS(ポリスチレン)を対象として染色温度と染まり具合の関係を調べた結果を図-3 に示す. PE, PS は 60 以上で染色されるものの, PP の染色には 80 以上が必要であることが明らかとなった. PE と PS の区別が必要な場合には 40 等より低温での染色が必要と考えられる.

分級染色手法の基本的有効性が認められたため, 富山県射水市新湊港で採取した表層堆積物を対象とした検出を試みた.

結果を図-4 に示す.

5mm オーバーサイズについては, プラスチック類のみ染色され牡蠣殻等との違いが視覚的にも優位となり提案手法の利点を確認できた. 5mm 以下の Fraction 1(2000~5000 μ m)については目視での確認ができたものの, Fraction 2(850~2000 μ m)~6(75~106 μ m)については顕微鏡下で

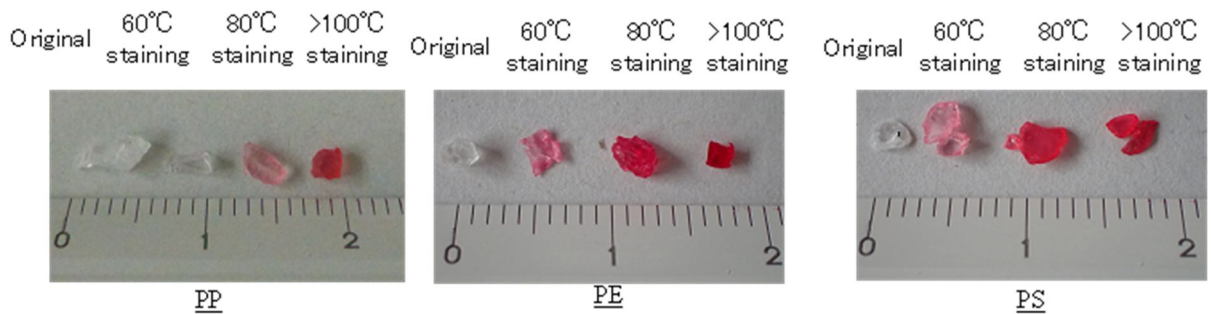


図-3 染色温度とプラスチック種の関係

の観察により MP の検出が可能となった.

なお, 75 μ m 以下については加温時に染色液そのものが析出することが明らかとなったため検出対象外とした. 別途行った海底下 15m のコアサンプルからは 75 μ m 以上の MP が検出されなかったことから地盤工学分野の研究室で一般的に保有している篩, ウォーターバス, 光学顕微鏡の組み合わせにより迅速かつ安価に堆積物に含まれるマイクロプラスチック類の検出が可能となる新たな試験方法を提案することができた.

4.2 目的微生物の単離手法の提案とセメント改良土と原位置微生物の組み合わせによる長期安定性確保について

4.2.1 目的微生物単離手法の提案

培地 2 種類と尿素添加の有, 無を組み合わせた計 4 種類の培地を用い, 1 か月間液体培養を行った後に単離・ウレアーゼ活性の評価を行った.

高いウレアーゼ活性を有するとともに, 微生物固化で広く検討が進められている *Sporosarcina pasteurii* の培養で用いられる NH₄-YE 培地を用いた培養では尿素添加の有無にかかわらず一般的な微生物の培養に用いられている TSB 培地と比較してコロニーを形成する微生物数が少ない傾向が明らかとなった. 一方, TSB 培地を用いた場合は多くのコロニーが形成される結果となった

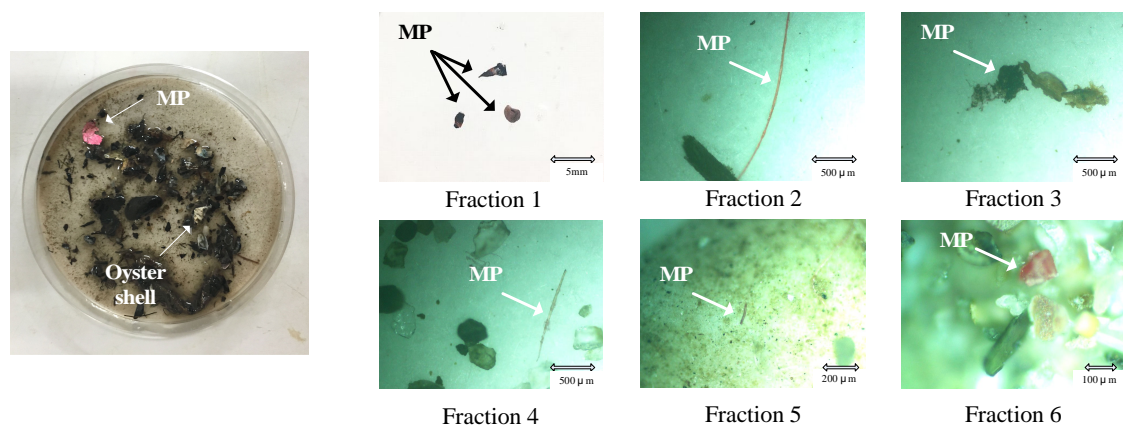


図-4 表層堆積物(新湊港)を対象とした検出結果

がウレアーゼ活性陽性を示す微生物の比率は尿素添加有の条件のほうが高かった。

単離後にウレアーゼ活性を測定し、特に高い酵素活性値を示した微生物について遺伝子工学的手法による同定を行った結果、*Sporosarcina* 属、*Lysinibacillus* 属、*Staphylococcus* 属等が対象となる土壤中にすでに生息していることが明らかとなった。

同定された属数も NH₄-YE 培地と比較して TSB 培地が多かったことから、目的微生物の単離には TSB + 尿素培地が有効であると考えられる。

4.2.2 浅海・深海域での長期暴露による微生物固化併用セメント改良土の長期安定性向上効果

屋外暴露試験期間中の海水温およびカルシウムおよびマグネシウムイオン濃度の推移を図-5 に示す。なお、深海域は定期的な海水分析が困難であったため初期の測定値を用いた。浅海域では海水中に含まれるイオン濃度が季節的に変動する傾向が認められた。

暴露期間中におけるカルシウム溶出量およびマグネシウム吸着量の推移を図-6 に示す。微生物由来の酵素による再結晶化を期待した case B, D について従来技術（セメントのみ）と比較してカルシウム溶出量が抑制される効果を確認することができ、提案技術の基本的有効性が明らかとなった。

セメント添加量 75kg/m³ で微生物添加の有無を比較した case A, B について試験後の暴露面撮影画像および XRF (FP 法) により求めた Ca 比率の比較結果を図-7 に示す。写真より従来技術(A)では表面の軟化が確認されるものの、提案技術(B)については表面に結晶鉱物が析出し、劣化抑制効果が期待できることが明らかとなった。

XRF (FP 法) による元素組成分析からも、健全部において Ca 含有量が高い状態を維持していることから供試体作成時に添加した微生物が改良土内で引き続き生存し、必要に応じて尿素の加水分解酵素を生産・炭酸カルシウムの結晶化促進に基づく劣化抑制効果を発揮できることが確認された。

4.3. まとめ

本研究では、環境への配慮を伴う「海底微生物地盤工学」の創出を目指し、地盤工学分野の実験室で一般的に保有している装置を用いた海底堆積物からの迅速 MP 検出法を提案するとともに、海底堆積物から尿素の加水分解酵素であるウレアーゼ産出能を持つ微生物の迅速スクリーニング法およびセメント改良土との組み合わせによる劣化抑制効果について取り組んだ。検討を通じて提案技術の有効性が示唆されたため、今後の普及活動につなげていきたい。

参考文献

- 1) 石川憲二：海底資源 - 海洋国日本の大きな隠し財産，pp.10-30，オーム社，2012
- 2) 中嶋亮太，山下麗：海洋マイクロプラスチックの採取・前処理・定量方法，海の研究，Vol. 29, No. 5, pp. 129-151, 2020
- 3) 原弘行，吉本憲正，狩生卓玲：海水環境下におけるセメント処理土の劣化促進手法の拡張とその手法による強度・変形特性の再現性，土木学会論文集中 C (地圏工学)，Vol. 77, No. 4, pp. 325-333，2021

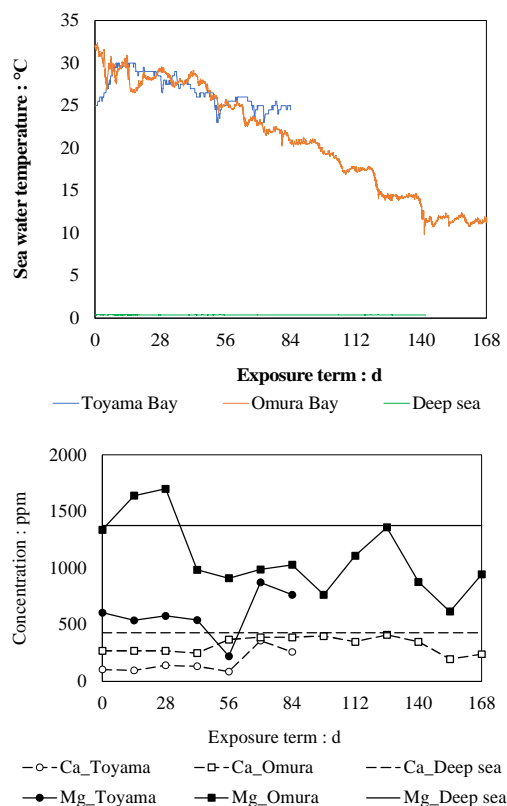


図-5 海水温, Ca²⁺, Mg²⁺濃度の推移

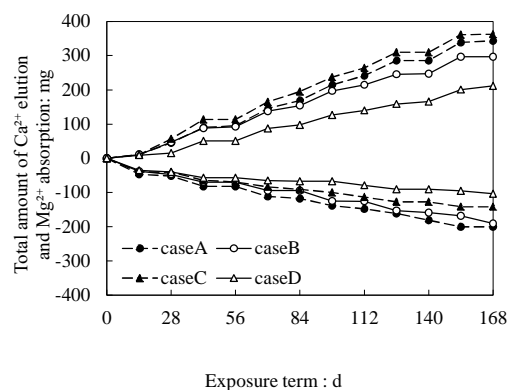


図-6 Ca 溶出および Mg 吸着量の推移

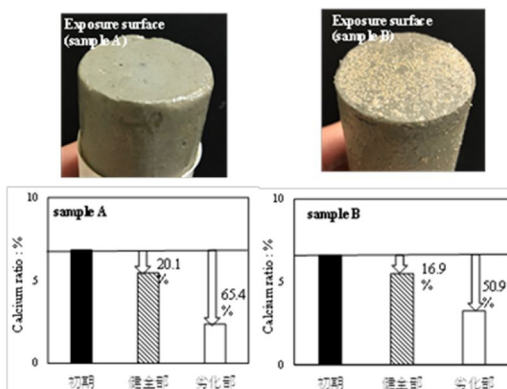


図-7 暴露後の表面と Ca 含有比率(XRF)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Jiang Ning-Jun, Hanson James L, Della Vecchia Gabriele, Zhu Cheng, Yi Yaolin, Arnepalli Dali N, Courcelles Benoit, He Jia, Horpibulsuk Suksun, Hoy Menglim, Takahashi Akihiro, Arulrajah Arul, Lin Chih-Ping, Dowoud Osama, Li Zili, Gao Zhiwei, Hata Toshiro et.al	4. 巻 Ahead of Print
2. 論文標題 Geotechnical and geoenvironmental engineering education during the pandemic	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Environmental Geotechnics	6. 最初と最後の頁 1~11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1680/jenge.20.00086	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Ikoma Satoru, Hata Toshiro, Yagi Mitsuharu, Senjyu Tomoharu	4. 巻 Ahead of Print
2. 論文標題 Mitigating deterioration of cement-treated clay by microbe-based calcite precipitation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Environmental Geotechnics	6. 最初と最後の頁 1~10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1680/jenge.20.00073	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kobayashi Tsunefumi, Yagi Mitsuharu, Kawaguchi Toshiya, Hata Toshiro, Shimizu Kenichi	4. 巻 169
2. 論文標題 Spatiotemporal variations of surface water microplastics near Kyushu, Japan: A qualitative analysis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Marine Pollution Bulletin	6. 最初と最後の頁 1-19
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/2021.03.22.436354	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 生駒聖, 畠俊郎	4. 巻 75
2. 論文標題 結晶析出機能を付加した機能性造粒物の表層固化技術への適用性評価	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 土木学会論文集B3(海洋開発)	6. 最初と最後の頁 995-1000
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2208/jscdjoe.75.1-995	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Toshiro HATA, Jun YONEDA and Koji YAMAMOTO
2. 発表標題 Mechanical properties of bio-mediated soils supported with deep-seabed microbes isolated from the methane hydrate-bearing layer around Japan islands
3. 学会等名 AGU fall meeting 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 生駒聖, 梶俊郎
2. 発表標題 EICPを併用した覆砂材の有効性に関する研究
3. 学会等名 令和元年度土木学会中部支部研究発表会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Toshiro HATA
2. 発表標題 Detecting microplastics from marine sediments via staining
3. 学会等名 ICFE2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yusui Murata and Toshiro HATA
2. 発表標題 Development of the modified EICP focused on the high strength under low calcite precipitation rate
3. 学会等名 GEOMATE2018 KL, 2018November (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 村田湧水, 畠俊郎
2. 発表標題 改良型炭酸カルシウム法による地盤固化効果の検討
3. 学会等名 第53回地盤工学研究発表会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 生駒聖, 畠俊郎, 千手智晴
2. 発表標題 微生物固化処理技術のセメント改良土への適用性に関する検討
3. 学会等名 平成30年度土木学会中部支部研究発表会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 村田湧水, 畠俊郎
2. 発表標題 改良型炭酸カルシウム法を用いた地盤改良技術の提案
3. 学会等名 平成30年度土木学会中部支部研究発表会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 林祐斗, 畠俊郎
2. 発表標題 減圧法によるMH生産時を想定した微生物固化による出砂対策としての有効性評価に関する検討
3. 学会等名 平成29年度土木学会中部支部研究発表会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 木谷龍平, 梶俊郎
2. 発表標題 表層型メタンハイドレートの有無が微生物固化処理土の強度特性に与える影響に関する検討
3. 学会等名 平成29年度土木学会中部支部研究発表会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 木谷龍平, 梶俊郎, 米田純, 山本晃司
2. 発表標題 表層型メタンハイドレートの有無が微生物固化処理土の強度特性に与える影響に関する研究
3. 学会等名 第9回メタンハイドレート総合シンポジウム プログラム
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 林 祐斗, 梶俊郎, 米田純, 山本晃司
2. 発表標題 減圧法によるMH生産時を想定した微生物固化による出砂対策としての有効性評価に関する検討
3. 学会等名 第9回メタンハイドレート総合シンポジウム プログラム
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 炭化水素回収方法及び炭化水素回収システム	発明者 山本晃司, 梶俊郎, 高橋裕里香	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2017-128959	出願年 2017年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	千葉 元 (Chiba Hajime) (20369961)	大島商船高等専門学校・商船学科・教授 (55502)	
研究分担者	八木 光晴 (Yagi Mitsuharu) (90605734)	長崎大学・水産・環境科学総合研究科(水産)・准教授 (17301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
インド	Indian Institute of Technology BOMBAY			
中国	Southeast University			
アメリカ	Arizona State Univeristy	University of Hawaii, Manoa		