

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 26 日現在

機関番号：55401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24560614

研究課題名(和文) 牡蠣殻と日本在来種の微生物を用いた地盤改良工法

研究課題名(英文) Ground improvement technique using oyster shells and micro-organisms which live in Japan

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) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は自然由来の微生物を用いた地盤改良工法に、カルシウム分として廃棄された牡蠣殻を用いることで環境負荷の少ない地盤改良工法の開発を目指している。

本研究では沖縄県のビーチロックから本工法に利用可能なウレアーゼ活性菌の採取を行い、採取した菌株により改良した試料の一軸圧縮試験を行ったところ、一部の菌株では、試料作製条件によってはスポロサルシナ菌(SP)を用いた試料と同等な圧縮強度を示し、SP株に代わる改良効果を持った日本に存在する菌株であることが期待できる。また、カルシウム分に牡蠣殻を用いた場合でも、菌株によっては同様な改良効果が表れ、地盤改良工法への適用性が示された。

研究成果の概要(英文)：Soil improvement techniques using microorganisms have recently been focused on as the low cost and environmentally friendly technique for practical use in Japan. *Sporosarcina pasteurii* is mainly used for this technique in almost all researches. In this paper, three laboratory tests were carried out to examine urease microorganisms which live in Japan for this bio-treatment technique. Results revealed that the urease microorganisms were found in all natural beach rocks from Okinawa that these microorganisms could reproduce calcium carbonates in soil. It was also found that the unconfirmed compression strength of the specimen treated with microorganism from beach rocks showed almost the same strength as the one with *Sporosarcina Pastuerii*. Therefore this microorganism is useful for the bio-treatment technique, instead of *Sporosarcina pasteurii*. Furthermore dissolved oyster shells can be used to this technique as a Calcium ion.

研究分野：地盤工学

キーワード：地盤改良 微生物 ビーチロック 牡蠣殻 圧縮強度

1. 研究開始当初の背景

地盤改良工法の内、地盤を固結させる固結工法は、セメント固化が主流で、多くの工事で採用されている。近年は廃棄物処理の問題からフライアッシュなどの廃棄物を利用した工法も開発されている。しかし、これらは自然地盤内に人工物を入れるという観点から環境への負荷が大きい。

そのような中、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¹⁾。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⁾。

しかし、この工法を実務に適用するには、まだ問題があり、特に 利用する微生物の環境への負荷、 地中にカルシウム分をどのような形で混入するか、 微生物の地盤への混入方法の 3 点は重要な課題である。

2. 研究の目的

本研究では、微生物を利用した地盤改良工法の実用化に向けて上記に記載した 3 点について検討を行うことを目的としている。

(1) 自然に生成される砂岩(ビーチロック)から採取される微生物の利用

殆どの研究でアメリカから輸入した微生物(*Sporosarcina Pasteurii*、以下 SP 菌株と記す)を利用しているが、日本の環境への負荷がどのくらいか不明である。そこで微生物に代わるものとして、海岸線でみられる砂岩などの構成過程を調べ、検討する。特にビーチロックと呼ばれる、砂浜に突如みられる砂岩は、その形成過程で圧力などを受けておらず、微生物による作用であると考えられている。そこで、この岩から微生物を抽出・培養して、その微生物が育ちやすい環境について検討するとともに、地盤改良工法への適用性について検討する。

(2) カルシウム分の地中への投入方法

これまでカルシウムイオン源として塩化カルシウムを利用していたが、塩化カルシウムの代わりに、牡蠣殻を粉碎したものを地盤に混入する方法を検討する。かき養殖業者から排出される牡蠣殻は年間約 10 万トン近くになり、多くは廃棄されるが、一部は農地

への肥料や建設材料として利用され、牡蠣殻は環境負荷が少ないことがわかる。

そこで本研究では、牡蠣殻を粉碎した粉末を地盤に混入した場合の改良効果について、実験的に検討する。

(3) 微生物と栄養源をゼリー状に固化して混入する方法

微生物を注入する方法として栄養源と一緒に注入する方法が良い。現在は実験室レベルであるため、地表面から徐々に重力で流下していく方法を取っている。しかし、実務に適用した場合、地盤内で不均質になる可能性がある。それに代わる方法として、本研究では微生物を含む溶液をゼリー状に固め、地盤内に混入する方法について検討する。

以上の 3 点について検討し、日本に生存する微生物と牡蠣殻を利用した環境負荷の少ない地盤改良工法の有効性を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 国内の利用可能な微生物の培養

まず、ビーチロックから本研究に使用する菌株を採取する。採取したビーチロックの場所は図-1 に示すように、石川県輪島市[三ツ子浜(A)]、沖縄県国頭郡今帰仁村字[古宇利大橋(B)] 国頭郡本部町備瀬[エメラルドビーチ(C)] 国頭郡恩納村瀬良垣[万座ビーチ(D)]読谷ビーチ(E)日航アリビラ(F)の 6 つよりセメンテーション効果があるかどうか検討した。

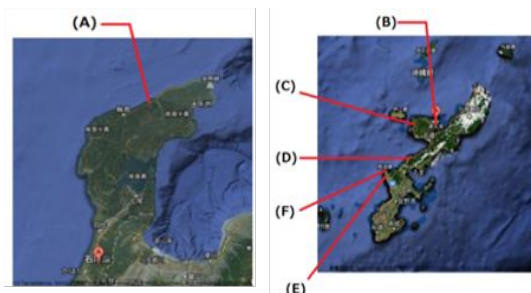


図-1 採取場所の位置

採取した菌株がウレアーゼ活性を示すか検討した。検討方法は、尿素、酵母エキスが入った培養液に試料、フェノールフタレイン液を入れ攪拌し、所定の時間ごとに色の変化を確認し、ウレアーゼ活性の有無を調べた。

ウレアーゼ活性を示した菌株の RNA 解析を行い、どのような菌株に近いかが検討した。

さらに、炭酸カルシウム生成能力を調べるため、フラスコ内に菌株、酵母エキスやカルシウムイオンを含むインジェクション液を入れ、48 時間振とうさせたのち、ろ過して生成物の量を測定した。

(2) 牡蠣殻を用いた改良方法の検討

次に採取した菌株を用いて、室内で供試体(直径 50 mm × 高さ 100 ~ 120 mm の円柱形)を固化して、強度特性を調べた。用いた砂は豊

浦砂を用いた。

まず、牡蠣殻を粉碎し、そのまま試料に混ぜ、SP 菌株と栄養源を注入し、改良効果について検討した。粉碎した牡蠣殻は直径 0.84mm 以下のものを砂に混入した。牡蠣殻購入率は重量比で 10%とし、牡蠣殻を混合したもののみ、牡蠣殻を混合したものにウレアーゼ活性菌のみ注入したもの、ウレアーゼ活性菌 + カルシウムイオンを注入したものの 3 種類を作成した。実験は圧密排水試験とし、拘束圧は 100kPa と 200 kPa とした。

次に牡蠣殻の利用方法として、牡蠣殻を希塩酸で溶かしてカルシウムイオンとし、それを培養液に混ぜて利用する方法について検討した。検討項目は炭酸カルシウム生成の能力と改良した供試体の強度について検討した。

生成能力については の実験で改良効果が高いと思われる菌株 2 つと、従来の研究で使われている SP 菌株を用いた。また強度試験では、牡蠣殻を希塩酸に溶かしたものを培養液に混ぜて改良した試料を作成し、強度試験を行った。供試体は直径 50 mm × 高さ 100 mm の円柱形とし、豊浦砂を用いた。試料作成時には 100kN/m² の載荷を行った。強度特性については一軸圧縮試験により検討した。

(3) 寒天を用いた微生物の投入方法

採取した菌株を寒天上で培養し、培養後寒天を粉碎し、土試料に混ぜて模型を作り、カルシウムイオンを含むインジェクション液を流し、地盤を固化させる。その後供試体を切り出し、一面せん断試験によって強度特性を検討した。

4. 研究成果

(1) 国内の利用可能な微生物の培養

表-1 に採取したビーチロックを用いて行った、各菌株のウレアーゼ活性試験結果を示す。表より三ツ子島以外はウレアーゼ活性が見られ、沖縄のビーチロックはウレアーゼ活性菌によって形成された可能性があることがわかる。また、三ツ子島のビーチロックに反応がみられなかったのは吉富³⁾らの研究でも示されているように、ビーチロックが CaCO₃ でなく、SiO₂ が主体であることと一致するから、このビーチロックはウレアーゼ活性菌によって作成されたビーチロックではないことが分かる。

表-1 ウレアーゼ活性試験結果

	A	B	C	D	E	F
48hr	x	x	x	x	x	
72hr	x	x				
1week	x				x	x

(色が変化有、xは無食)

ウレアーゼ活性反応が見られたビーチロックから菌株を培養、純菌化作業を行い顕微鏡観察を行った。顕微鏡観察結果を図-2 に示す。図よりすべて桿菌であることが分かる。

これらの菌株を遺伝子解析した結果、B は Paenibacillus fonticola (99%)、D は Lysinibacillus sphaericus (99%)、E は Sporosarcina sp (99%) という結果を得ることが出来た。()内の数値は RNA の一致度を表している。C、F は RNA の増殖が出来なかったため同定できなかった。このことから、E はこれでの多くの研究で利用されている菌株と同類である可能性が高く、カルシウム生成に期待できる。

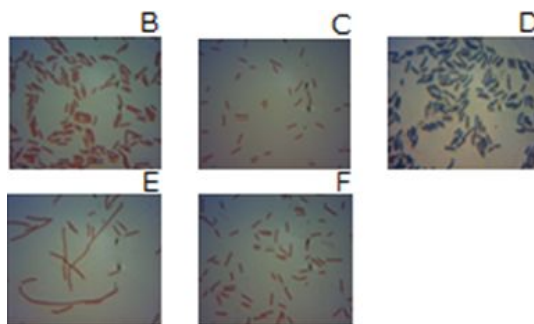


図-2 顕微鏡観察結果

そこで、これらの菌株のカルシウム生成能力について検討した。表-2 にその結果を示す。ここで、炭酸カルシウムは水に溶けにくいという性質から濾過されたものすべてを炭酸カルシウムとみなし、投入したカルシウムイオンに対して炭酸カルシウムとして生成されたカルシウムイオンの比を還元率としている。なお、原因はわからないが F については菌が育たなかったため今回実験できなかった。

表より、実験が行えた全ての菌株で炭酸カルシウムが生成されていることがわかる。その中でも、E 菌株が投入したカルシウムイオンの 87% を炭酸カルシウムに還元することが出来ている。また C 菌株も 49.2% と約半分の量が析出されている。

表-2 カルシウム生成能力の検討

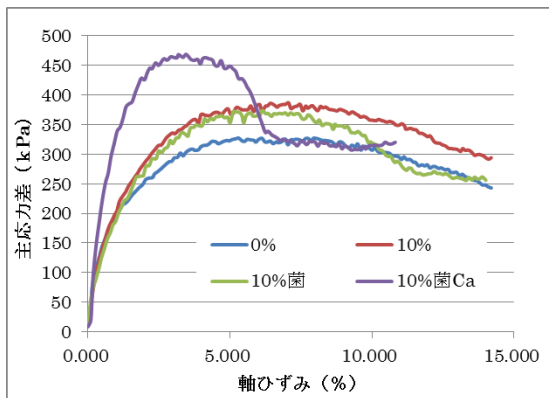
	CaCO ₃ (g)	還元率 (%)
B	0.231	22.9
C	0.496	49.2
D	0.442	43.9
E	0.878	87.2

以上より、沖縄で採取されたビーチロックはウレアーゼ活性菌によって生成された可能性があり、特に C 菌株、E 菌株は地盤改良工法に利用できる可能性が高いことがわかる。

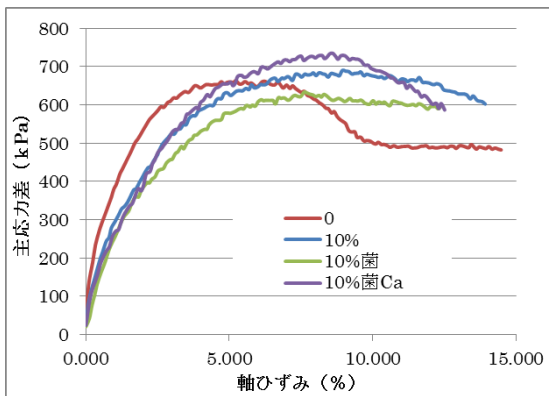
(2) 牡蠣殻を用いた改良工法の検討

図-3 は牡蠣殻を粉碎して、試料に混ぜ、ウレアーゼ活性菌(ここでは多くの研究で使用されている SP 菌株を使用している)とカルシウムを用いたインジェクション液を投入して作成した改良供試体の CD 試験の応力ひずみ関係を示す。

図からわかるよう、圧密圧力 100kPa の場合は改良後の強度増加が著しく現れているが、圧密圧力 200kPa の場合では改良前と改良後の強度にほとんど差がない。このことから、圧密圧力が高くなると供試体の骨格構造が破壊されてしまったことが推察できる。これは供試体作製時に負荷を加えていないためだと考えられる。また微生物の生物反応により土の強度が上がることは既往の研究より明らかになっているが、牡蠣殻の粉末は炭酸カルシウムになって安定しているためカルシウムイオンの代わりとしての効果を発揮していないと考えられる。このことより、牡蠣殻を単に粉砕して試料に混合しても効果はなく、カルシウムイオンへの変換が必要であり、また負荷のかかった状態での供試体作製への適応性を検討する必要があることがわかる。



(圧密圧力 100kPa の場合)



(圧密圧力 200kPa の場合)

図-3 応力-ひずみ関係

そこで、牡蠣殻を希塩酸に溶かし、できた溶液を用いて炭酸カルシウム生成能力の検討を行った。ここでは Sporosarcina Pasteurii 菌株に加え、C 菌株、E 菌株を用いて検討した。

表-3 に試験結果を示す。表より、C 菌株と E2 菌株は SP 菌株と比べ炭酸カルシウム生成量が多くなっているが、E1 菌は少ないことがわかる。同じ菌株であると思われる E1 と E2 菌株の還元率の差が大きく、また SP 菌株の

還元率が低いことから塩酸を使用することで菌株の育成状況が変化することがあることが分かる。しかし、この点については今回の研究では明らかにできなかった。

表-3 牡蠣殻を溶かして使用した場合のカルシウム生成能力

	CaCO ₃ (g)	還元率 (%)
C	0.702	69.6
E1	0.121	12.0
E2	0.816	80.9
S.P	0.272	27.0

そこで、C 菌株、E 菌株、SP 菌株を用いて供試体を改良し、一軸圧縮強度試験を行った。表-4 は試料の試験条件である。

表-4 試験条件

	菌種	カルシウム源	注入回数(回)	Ca ²⁺ の量 (mol/l)
Test1	E 株	塩カル	5	0.3
Test2	S.P	塩カル	5	0.3
Test3	S.P	塩カル	5	0.3
Test4	C 株	塩カル	5	0.3
Test5	C 株	牡蠣殻	5	0.3
Test6	E 株	塩カル	5	0.4
Test7	S.P	塩カル	5	0.4
Test8	E 株	塩カル	11	0.3
Test9	E 株	牡蠣殻	10	0.3
Test10	S.P	塩カル	10	0.3

(塩カル：塩化カルシウム)

図-4 は破壊後の供試体の様子である。SP 菌株で改良した Test3 では割裂破壊が生じ、Test 5 はせん断破壊が生じていた。



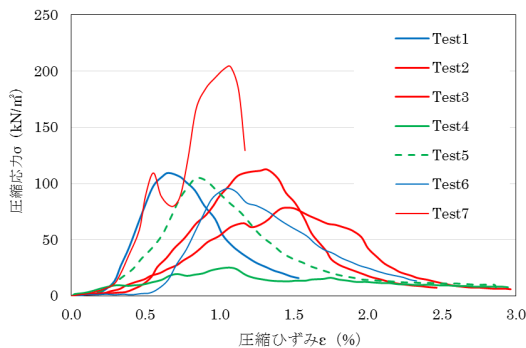
Test3

Test5

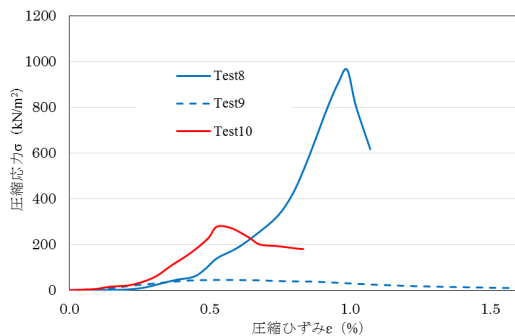
図-4 破壊後の供試体の様子

図-5 にインジェクション投入回数ごとの

一軸圧縮試験結果を示す。Test8はインジェクション液を11回注入したが、今回は10回の試料と同じ扱いとして図に掲示した。これよりTest4は同様の注入回数、カルシウム分の量であるにもかかわらず他の試料と比べ、強度が弱いことがわかる。しかし、その原因に関しては今回の実験で明らかにすることができなかった。Test2、Test3では同じ菌株を用いたにも関わらず、実験結果に差が出た。今回は、室温、菌株、インジェクション液の流入速度は一定で、供試体全体に均等に行き届いていると想定して供試体を作製した。しかし、実際には供試体内部の水道の存在や、菌株やインジェクション液が供試体全体に行き届いているかは不明であり、その影響かもしれない。Test9では使用するカルシウム分の量が等しい場合においても、牡蠣殻をカルシウム分として用いることによって、より強度が低くなっている。一方で、Test5ではカルシウム分の量の等しい他の試料と同等な強度を發揮している。このことより、使用する菌株によって改良効果にばらつきが出たが、牡蠣殻のカルシウムをイオン化してカルシウム分として利用する際には使用する菌株との組み合わせ同じような改良効果を得ることができる可能性があることが分かった。



インジェクション注入回数 5回



インジェクション注入回数 10回

図-5 一軸圧縮試験結果

(3) 寒天を用いた微生物の投入方法

ここでは E 菌株と SP 菌株を用いて、模型地盤を作成し、地表面よりカルシウムイオンを含むインジェクション液を散布して、自然

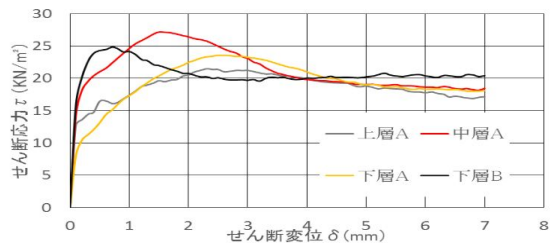
流下によって供試体の改良を行った。

模型の寸法は縦 240 mm×幅 100 mm×高さ 180 mmとして、インジェクション液を1日1回、5日間散布した。改良後、模型の左右2箇所の上段、中段、下段の3深度から計6か所から試料を切り出し、一面せん断試験を行った。なお、左側試料をA、C、E、G、右側試料をB、D、F、Hと示す。

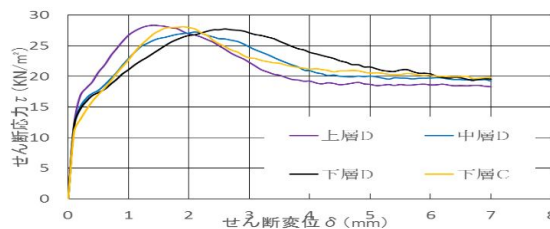
ここでインジェクション液Aは酵母エキス、尿素、塩化アンモニウム、炭酸水素ナトリウム、塩化カルシウム、インジェクション液Bは酵母エキス、尿素、塩化カルシウム、酢酸ナトリウム、塩化アンモニウムからなる。

図-6にインジェクション液A、図-7にインジェクション液Bを用いた時のせん断変位とせん断応力の関係を示す。図-8には非改良の試料の結果を示す。

図から非改良試料と今回の試験で改良した供試体を比較してみると、わずかであるがせん断強度が上がっていることが分かる。これは微生物の働きによって炭酸カルシウムが生成され、土粒子間を結合させることで粘着力が増加し、試料のせん断強度が増加したことが要因であると考えられる。どのグラフにも降伏点が見られることから土が局所的ではあるが凝固しているといえる。さらに、両図を比較すると、E菌株はグラフのばらつきが大きいことが分かる。これらは試料に注入するインジェクション液が均一に改良されなかったためと考えられ、特に下層になると強度が低下している。これは微生物の栄養源であるインジェクション液に含まれるカルシウム分の多くが上層や中層に存在している菌株と反応してしまったため、下層に存在する微生物に十分に行き渡らず、炭酸カルシウムの生成に支障を来したと推察できる。SP菌株にはこの結果が見られなかったため、微生物の違いによって同時間に反応する栄養源の量に差がある可能性があり、実用に当たっては適切に時間を設定する必要があることが分かる。

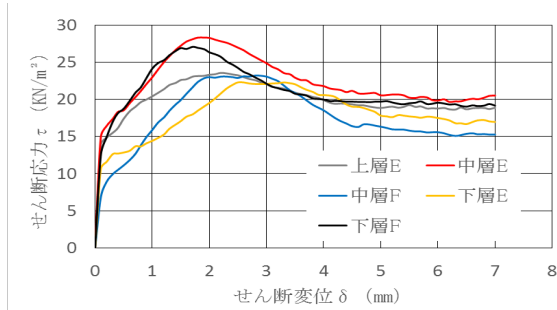


E 菌株

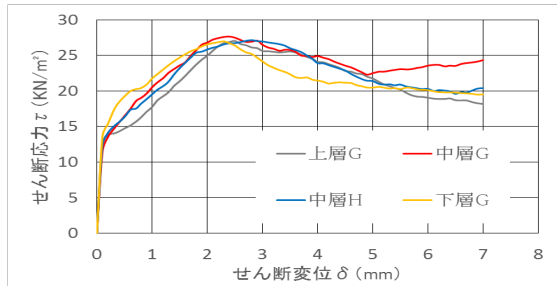


SP 菌株

図-6 せん断変位とせん断応力の関係(A液)



E 菌株



SP 菌株

図-7 せん断変位とせん断応力の関係(B液)

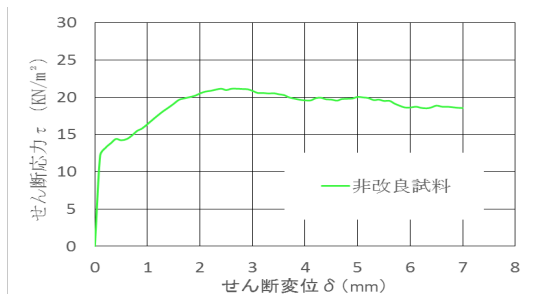


図-8 せん断変位とせん断応力の関係

<引用文献>

- 1) 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）
- 2)3)原 弘、加納 誠二、土田孝、金田一智親：微生物を用いた地盤改良に及ぼす菌種と土試料の影響、第 46 地盤工学研究発表会講演概要集(CD-ROM)（2011）
- 3) 吉富、次重、小笠原：能登半島、輪島市曾々木海岸のビーチロック、日本地質学会第 111 年学術大会演旨、302、2004 .

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 1 件)

Seiji Kano, Takeo, Moriwaki and Kyohei, Ochi, A study on the Bio-treatment Technique of Ground Improvement with Urease Micro-organisms which live in Japa,

Geotechnical Hazards from Large Earthquakes and Heavy Rainfalls, 査読有、2015 (in Print)

〔学会発表〕(計 3 件)

Seiji Kano, Takeo, Moriwaki and Kyohei, Ochi, A study on the Bio-treatment Technique of Ground Improvement with Urease Micro-organisms which lives in Japan, The sixth Japan – Taiwan joint workshop on Geotechnical Hazards from Large Earthquakes and Heavy Rainfalls, 2014 年 7 月 6 日, 北九州国際会議場（福岡県・北九州市）

加納誠二、越智恭平、ビーチロックから採取したウレアーゼ活性菌、平成 25 年度土木学会年次学術講演会、2013 年 9 月 4 日～6 日、日本大学（千葉県・習志野市）

越智恭平、加納誠二、人工ビーチロック形成に関する実験的研究、平成 25 年度土木学会中国支部年次学術講演会、2013 年 5 月 25 日、鳥取大学（鳥取県・鳥取市）

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