

平成 30 年 6 月 26 日現在

機関番号：54701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06218

研究課題名(和文)炭酸カルシウム法地盤改良の低コスト化-空気後注入技術の開発-

研究課題名(英文)Implementation of desaturation in ground improvement with calcium carbonate precipitation

研究代表者

林 和幸 (Hayashi, Kazuyuki)

和歌山工業高等専門学校・環境都市工学科・准教授

研究者番号：30587853

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、炭酸カルシウム法地盤改良の低コスト化、改良強度の向上および生態系への影響最小化を目的に、実験的研究を実施した。その結果、炭酸カルシウム沈殿において、原位置微生物を利用できることが分かった。また、排水処理技術として開発されたDHSリアクターが、尿素分解微生物の集積培養に利用できることが分かった。さらに、炭酸カルシウム沈殿過程における不飽和化の導入が、土の強度改良効果を高めることが分かった。

研究成果の概要(英文)：This study investigates experimental study on cost lowering, increase in improved soil strength, and minimization of an environmental effect in ground improvement with calcium carbonate precipitation. Bio stimulation method is useful to precipitate calcium carbonate on soil grain surface. A low-tech down-flow hanging sponge (DHS) bioreactor system is available to enrich and produce of ureolytic microbes. Moreover, introduction of desaturation in the precipitation process of calcium carbonate enhances the soil strength.

研究分野：地盤工学

キーワード：地盤改良 炭酸カルシウム 不飽和化

1. 研究開始当初の背景

土粒子表面に析出させた炭酸カルシウムを土粒子相互の固結に利用し、土の強度増加を図る地盤改良技術を「炭酸カルシウム法」と言う。炭酸カルシウム法では、薬液に含まれるカルシウム塩と微生物それぞれに由来する Ca^{2+} (カルシウムイオン) と CO_3^{2-} (炭酸イオン) が土の間隙で少しずつ沈殿反応を起こし、沈殿した炭酸カルシウムが土粒子相互の固結に利用される。この技術で固化した土は、既存技術と同程度以上の液状化抵抗特性を有するなど効果が高い一方^{1), 2)}、薬液に含まれる成分が高価であることや、高強度改良を行うには薬液の複数回注入を必要とする高コストが主要因となり現場適用が進んでいない。さらに、薬液に混合する微生物には、外来種、あるいは原位置以外から分離されたもの³⁾が使用されることが多く、施工対象地盤における生態系への影響が懸念される。

2. 研究の目的

炭酸カルシウム法の低コスト化、改良強度の向上および生態系への影響最小化のいずれも達成を可能にするための知見を得るために、本研究では以下に着目し、実験的検討を行った。

(研究 1)

地下 10m 程度までの範囲における目的微生物(尿素分解酵素を有する菌)の存在の有無を明らかにする。さらに、その目的微生物の尿素活性を利用した土の固化の可能性を把握する。

(研究 2)

尿素分解微生物の大量培養技術は十分に確立されていない。そこで、廃水処理技術として元々開発された down-flow hanging sponge (DHS) リアクターの尿素分解微生物の集積培養における有用性の評価を目的とした実験を行う。

(研究 3)

低環境負荷化と低コスト化を目的とした原位置目的微生物の活性化と炭酸カルシウム沈殿時の不飽和化の導入の有用性を検討する。

3. 研究の方法

(研究 1)

深さ 15m のボーリング調査で地盤試料を採取し、目的微生物(ウレアーゼ活性を有するウレアーゼ産生菌)の深さ方向の存在を調べた。次に、分離したウレアーゼ産生菌を利用し砂供試体内に炭酸カルシウムを析出させ、これによる砂の力学特性の改良効果を一軸圧縮試験により確認した。最後に、炭酸カルシウムが析出した砂を走査型電子顕微鏡 (SEM: Scanning Electron Microscope) で観察し、微視構造の観点から考察を加えた。

(研究 2)

尿素分解微生物の集積培養に使用した DHS リアクターを図 1 に示す。尿素分解微生物

の保持担体円形には、プラスチックフレームに装填し吊り下げた 10 個のポリウレタンスポンジを利用する。培養の植種源には、和歌山高専の敷地内より採取した土試料を用いた。尿素分解微生物を集積培養するため、10 g/L の尿素などを含む酵母エキス培地をスポンジ担体容積に基づいた理論水理学的滞留時間が 5.5 時間となるように連続的に供給した。培養温度は 25 ± 2 とし、リアクター運転開始 24 日目以降は、エアープンプを用いてリアクター内の通気を行った。

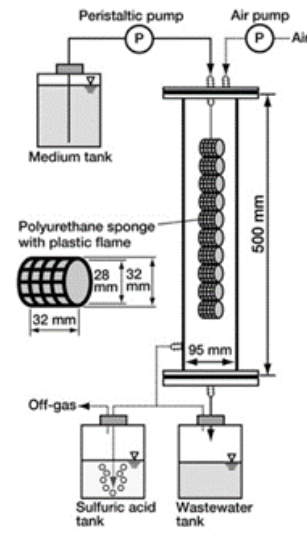


図 1 DHS リアクターの概要

(研究 3)

地表で採取した地盤試料をテフロン製のシリンダーに詰め、これに対し微生物の培養液(表 1)を複数回通水し、土粒子表面に付着した目的微生物を培養した。次に、塩化カルシウムと尿素を含むセメンテーション溶液(表 1)を通水し、土粒子表面に培養した微生物による尿素分解で生じる炭酸イオンと、塩化カルシウムの電離で生じるカルシウムイオンが沈殿反応を生じさせ、炭酸カルシウムを土粒子表面に沈殿させた。この時、水頭差を利用してシリンダー内の試料を不飽和化させ、炭酸カルシウム沈殿を土粒子接点周辺に集め、地盤固化に利用される炭酸カルシウムの増加を図った。

表 1 通水溶液の成分⁴⁾

溶液成分	培養液	セメンテーション溶液
酵母エキス	0.2 g/L	0.1 g/L
塩化アンモニウム	100 mM	12.5 mM
酢酸ナトリウム	42.5 mM	42.5 mM
尿素	350 mM	350 mM
塩化カルシウム	-	250 mM

4. 研究成果

(研究 1)

尿素寒天基礎培地を用いて、地盤試料よりウレアーゼ産生微生物の分離培養を試みた結果、地表付近の地盤試料から2株、地下1mから1株および地下9mの地盤試料から1株を獲得した。本研究の中では、地表付近の2株にはu-0-2-3株、u-0-2-4株、地下1mの下部にはu-1-2-1株、および地下9mの株にはu-9-3-1株という呼称を与えた。なお、地表より分離したu-0-2-3株およびu-0-2-4株、地下1mより分離したu-1-2-1株は、いずれも含水量の低い盛土層に生息していたウレアーゼ産生菌となる。一方、地下9mから分離されたu-9-3-1株は、含水量が非常に多く、中砂や粗砂が多く混入する層から分離された。これら分離株の微生物種を同定するため、16S rRNA 遺伝子系統解析を行った。図2に分離株由来の16S rRNA 遺伝子を含む系統樹を示した。本解析の結果からは、u-0-2-3株およびu-0-2-4株は *Ensifer* 属、u-1-2-1株は *Bacillus* 属、u-9-3-1株は *Micrococcus* 属に分類される細菌であることが同定された。なお、これら3つの系統群には、ウレアーゼ産生能を有する微生物が含まれることが報告されている。

分離株が有する潜在ウレアーゼ活性（平均値±標準偏差）を調べたところ、高い順に、u-1-2-1株で 5.0 ± 1.0 U/mL、u-0-2-4株で 3.0 ± 0.7 U/mL、u-0-2-3株で 2.0 ± 1.2 U/mL、u-9-3-1株で 1.3 ± 0.6 U/mL であった。以後の実験には、ウレアーゼ活性が比較的高かったu-1-2-1株およびu-0-2-4株を供した。次に、ウレアーゼ活性が比較的高かったこれら2種類の菌に対し、それぞれ砂供試体中での炭酸カルシウム沈殿および砂の固化を行い、固化した砂供試体の一軸圧縮試験を実施した。その結果、ウレアーゼ活性とともに炭酸カルシウム含有率が最も高いu-1-2-1株の供試体が最も優れた一軸圧縮強さが得られた（図3上）。固化した砂も、u-1-2-1株を使ったもので、他と比べ固化した部分が多い。一軸圧縮強さの絶対値は全体に小さいが、炭酸カルシウム含有率が高いものほど優れた力学特性を示しているため、試験結果の相対的な関係は概ね妥当であると考えられる。最もウレアーゼ活性が高く、炭酸カルシウム沈殿量および一軸圧縮強さも最も高かったu-1-2-1株を使った砂供試体の試料に対し、SEM観察を行った結果、図4に示すように、u-1-2-1株は、長さ約3μm、幅約0.6μmの桿菌であることが分かった。また、u-1-2-1株を利用した砂固化物においては、土粒子表面に結晶の沈殿物が確認された。その拡大画像では、結晶に付着しているu-1-2-1株様の細胞が確認された。このような結晶や細胞は、u-1-2-1株を導入しなかった砂供試体では明確に確認されなかったため、結晶はu-1-2-1株のウレアーゼ活性により生じたものであると判断した。

上記一連の検討の結果、地下水位より上の浅い地盤だけでなく地下水位以下の深い地

盤（本研究ではG.L.-9m）でも、ウレアーゼ産生菌が存在することが分かった。ただし、その存在の有無や種類、およびウレアーゼ活性の強さは深さ方向に一様ではないことも明らかとなった。また、原位置地盤から分離したウレアーゼ産生菌を用いることで、砂供試体における炭酸カルシウム析出と力学特性の改善が可能であった。

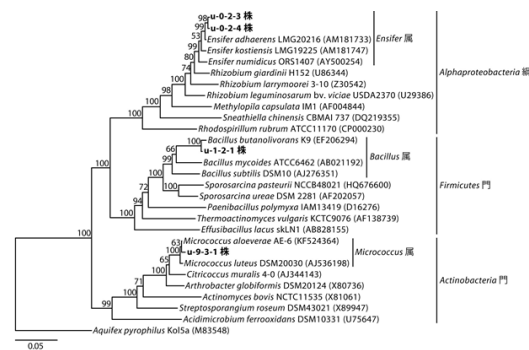


図2 16S rRNA 遺伝子配列に基づいた系統樹

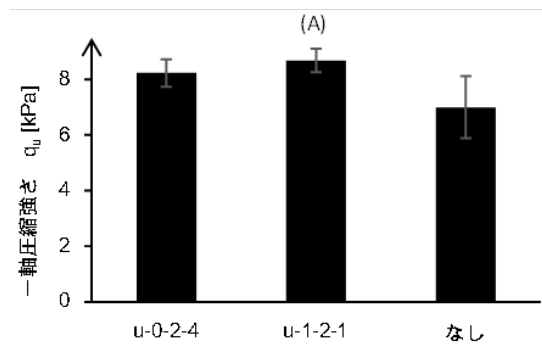


図3 用いた菌株による砂の一軸圧縮強さの違い(上)と、固化後の試料の様子(下)

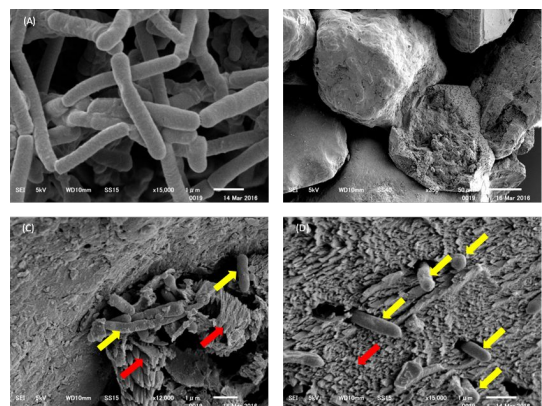


図4 u-1-2-1株と周囲の固化物質に対するSEM画像

(研究 2)

リアクターを連続運転した 78 日間は、培地に含まれる酵母エキスの濃度と、エアポンプによる通水の有無に基づき 3 つの phase に分けることができる。各 phase で検出された潜在ウレアーゼ活性は、phase 1 (Day 0~23; 酵母エキス 1 g/L, 通気無し) において $1.9 \sim 4.1 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$ -biofilm, phase 2 (Day 24~57; 酵母エキス 1 g/L, 通気有り) において $3.7 \sim 7.8 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$ -biofilm, phase 3 (Day 58~78; 酵母エキス 5 g/L, 通気有り) において $24.2 \sim 26.4 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$ -biofilm であった。なお、尿素分解反応を利用した炭酸カルシウム法の適用に必要な潜在ウレアーゼ活性は、約 $10 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$ であるという試算がある。DHS リアクターにおいては、この試算を上回る潜在ウレアーゼ活性が phase III において得られた。したがって、酵母エキス濃度や空気供給の条件を適切に整えることにより、尿素分解微生物の集積培養技術の 1 つとして本 DHS リアクターが利用可能であることが示された。

(研究 3)

図 5 に定期的に排水を採取し計測した pH の変化を示す。通水は 24 時間ごとに実施したため、図の 24, 48, 72, 96, および 120 時間後の pH は通水完了直後を示している。図より、pH の値は通水回数が増すごとに緩やかに増加したことが分かる。これは、土粒子表面の微生物が通水回数とともに増加することで、30 分かけて実施する通水時における尿素分解および水酸化イオン OH^- の間隙への供給が加速したためであると推察される。通水完了から 2 時間後の pH も同様に通水回数が増すごとに緩やかに増加しているが、これも同様な理由と推察される。一方、その値は 96 時間後から 120 時間付近で概ね収束したため以降の培養液通水は実施せず、セメンテーション溶液の通水に移行した。図 6 にカルシウムイオン濃度の経時変化を示す。カルシウムイオン濃度は、通水回数の増加とともに減少した。これは、セメンテーション溶液に含まれる栄養成分が微生物の培養を引き起こし、炭酸カルシウム沈殿を加速させたためであると推察される。テフロンモールドから脱型した固化供試体に対し、一軸圧縮試験を実施した。供試体の理論炭酸カルシウム含有率は 3.8% であり、その場合既往研究^{4), 5), 6)}では最大で概ね 1MPa 程度となるが、本研究では 2.2MPa と大きな値を示した。以上の検討より、炭酸カルシウム沈殿時の不飽和化は、一軸圧縮強さを著しく改善させるとともに、原位置微生物の培養を伴う炭酸カルシウム法地盤改良にも適用可能であることが明らかとなった。

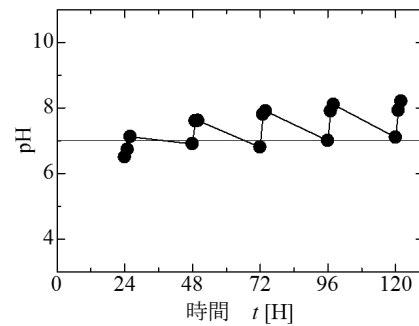


図 5 培養液通水に伴う間隙の pH 変化

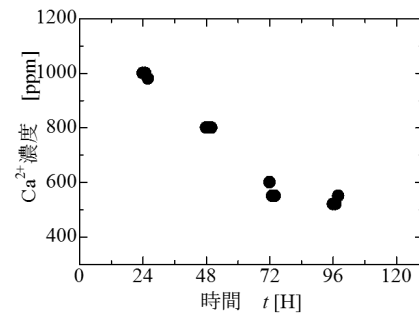


図 6 セメンテーション溶液通水に伴うカルシウムイオン濃度変化

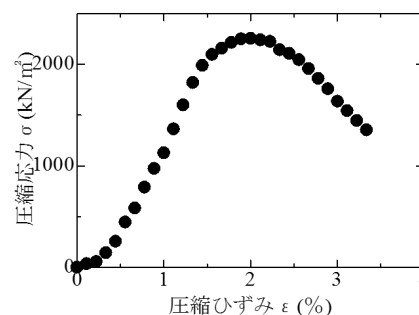


図 7 一軸圧縮試験で得られた軸方向応力-軸ひずみ関係

参考文献

- 1) Dejong, J. T., Fritzges, M. B. and Nusslein and K.: Microbially induced cementation to control sand response to undrained shear, *Journal of Geotechnical and Geoenvironmental Engineering*, ASCE, Vol. 132, No.11, pp.1381-1392, 2006.
- 2) 林和幸, 岡村未対, 安原英明: 炭酸カルシウム結晶析出による砂の液化特性の改善効果, *地盤工学ジャーナル*, Vol.5, No.2, pp.391-400, 2010.7.
- 3) 皇俊郎, 立野菜緒, 阿部廣史: ウレアーゼ活性を有する微生物による沿岸域を対象とした微生物固化の適用性評価, *地盤工学ジャーナル*, Vol.6, No.2, pp.305-315, 2011.7.
- 4) H. Yasuhara, D. Neupane, K. Hayashi and M. Okamura: Experiments and Predictions of Physical Properties of Sand Cemented by enzymatically-Induced Carbonate Precipitation, *Soils and Foundations*, Vol.

52, No. 3, pp. 539-549, 2012. 5) V. S. Whiffin: Microbial CaCO₃ precipitation for the production of biocement, Ph.D. dissertation, Murdoch University, Perth, Australia, 154pp., 2004. 6) L. Cheng, R. Cord-Ruwisch and M. A. Shahin: Cementation of sand soil by microbially induced calcite precipitation at various degrees of saturation, Canadian Geotechnical Journal, Vol. 50, pp. 81-90, 2013.

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)

Masataka Aoki, Takuya Noma, Hiroshi Yonemitsu, Nobuo Araki, Takashi Yamaguchi, Kazuyuki Hayashi, A low-tech bioreactor system for the enrichment and production of ureolytic microbes, Polish Journal of Microbiology, 67(1), 2018, 59-65.
DOI: 10.5604/01.3001.0011.6144

[学会発表](計4件)

Takuya Noma, Masataka Aoki, Hiroshi Yonemitsu, Nobuo Araki, Takashi Yamaguchi, Kazuyuki Hayashi, Cultivation of ureolytic microorganisms using a down-flow hanging sponge bioreactor system, STI GIGAKU, 2017.

青木仁孝, 野間拓也, 林和幸, 山口隆司, 好気性脱窒菌の炭酸塩鉱物形成能力を利用した重金属汚染土のバイオレメディエーション, 第52回日本水環境学会年会, 2017.

楠本蒼人, 林和幸, 青木仁孝, 楠部真崇, バイオスティミュレーションを利用した炭酸カルシウム法地盤改良における不飽和化の導入, 高専シンポジウム in Kobe, 2018.

野間拓也, 青木仁孝, 林和幸, 荒木信夫, 山口隆司, 土壌中から分離した好気性脱窒菌による炭酸塩鉱物形成, 高専シンポジウム in Kobe, 2018.

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

[その他]

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

林和幸(HAYASHI Kazuyuki)
和歌山工業高等専門学校・環境都市工学科・准教授
研究者番号: 30587853

(2)研究分担者

米光裕(YONEMITSU Hiroshi)
和歌山工業高等専門学校・生物応用化学科・教授
研究者番号: 20290778

青木仁孝(AOKI Masataka)

和歌山工業高等専門学校・環境都市工学科・助教
研究者番号: 80775809

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし