

土壌固化微生物に与える酸素の影響

呉工業高等専門学校 学生会員 ○井原 奏太
 呉工業高等専門学校 非会員 桐原 弘志郎
 呉工業高等専門学校 正会員 木村 善一郎

1. 研究背景

土砂災害をはじめとした自然災害の防止（防災）は日本の土木技術者にとって避け難い重要課題である。近年では多数の死者数を出した 2016 年度熊本地震や 2018 年 6 月 28 日から 7 月 8 日にかけて生じた西日本豪雨災害などが挙げられる。日本国土は山地部の割合が 75%と非常に多く、山地部は軟弱地盤であることから地震発生時や豪雨時に液状化が生じやすいため、土石流・地滑りなどの土砂災害が発生しやすい。(1)

現状実施されている液状化対策には、サンドコンパクション工法、深層混合処理、ディープウェル工法、グラベルドレーン工法、薬液注入固化工法など、様々な改良原理で様々な工法が適用されている。これらのうち特に薬液注入固化工法は、薬液注入時の割裂注入による固化体強度の不均一性や耐久性などの問題から、かつては主として仮設工事の補助工法として用いられていた。しかし近年では、薬液注入工法が元来持っている設備の簡便さや作業性の良さに加え、従来よりも粘性が低く耐久性に優れた特殊シリカを用いた溶液型薬液や新しい浸透注入工法が開発されたことにより、既設構造物直下の液状化対策など、恒久的な軟弱地盤対策工法としても用いられるようになってきた。しかし、薬液として利用される化学的固化剤(セメントミルク等)は一般に固化後も強いアルカリ性を示すため、田畑や住宅地など環境保全の要請が高い場所では使用制限される事が課題である。

バイオグラウトは本課題を解消できる環境調和型技術として注目されている。最も研究例の多い尿素法においては微生物(*Sporosarcina Pasteurii* など)の尿素代謝により発生する炭酸イオンと土壌中に存在するカルシウムイオンとの結合により生成される炭酸カルシウムをグラウト成分としている (2)。

バイオグラウトにおける炭酸カルシウムの析出は微

生物の代謝活動に大きく依存する。尿素法における研究事例はほぼ全て好気条件で進められている (3) が、バイオグラウトによる地盤固化を実施する場合は一般に地盤中であり、地盤は 50cm 程度の深度を境に嫌気（無酸素）環境である。好気条件と嫌気条件では増殖可能な微生物種が全く異なるため、土壌固化微生物の代謝活動に差が生じ、炭酸カルシウム生成活性が異なる事が予想される。

本研究では酸素の有無が土壌微生物に与える影響について着目し、実験を行った。具体的には酸素の有無による、土壌微生物の全菌数及び菌叢解析の比較を行った。

2. 実験内容

2.1 リアクター構築と運転条件

嫌気環境における尿素分解細菌の集積は、嫌気ガス置換装置を用いて溶存酸素を除去した培地を作成しリアクターに低流速で流すことで行った。ガラス製カラム型リアクターを使用し、カラム内に呉高専内土壌を圧密し嫌気尿素分解系集積の植種源とした。本研究では酸素の有無による影響を観測する為、有酸素状態のものと無酸素状態のリアクター2種類を用意し、培養した。リアクターへの供給培地には、尿素分解細菌の集積に好適な無機栄養培地に尿素と少量のイーストを炭素源として加え、また炭酸カルシウムを形成させるために必要な塩化カルシウムを大量に加えたものを培地とした。無酸素条件とするリアクターにはアネロパックを用いて無酸素状態を保つようにした。培地は低速でガラスカラムに供給しながらカラム内の土壌微生物を3週間集積培養した。培地を供給し続けることにより、ガラス製カラム型リアクターを通過しつづける培養液を2日から3日ごとに回収し、これを解析対象サンプルとした。培地の組成を表 2-1 に示す。

キーワード バイオグラウト、土壌固化微生物、炭酸カルシウム、酸素

連絡先 〒737-8506 呉市阿賀南 2-2-11 呉工業高等専門学校

TEL 0823-73-8486

表 2-1 培地の組成

培地成分	組成
尿素	105.11g
酢酸ナトリウム	28.92g
塩化アンモニウム	3.35g
Yeast extract	0.5g
塩化カルシウム	183.77g
水	5L

2.2 リアルタイム PCR

リアルタイム PCR とは PCR による増幅をリアルタイムで測定することで鋳型となる DNA の定量を行う手法である。本手法を用いた DNA の定量による土壌微生物の定量を行った。

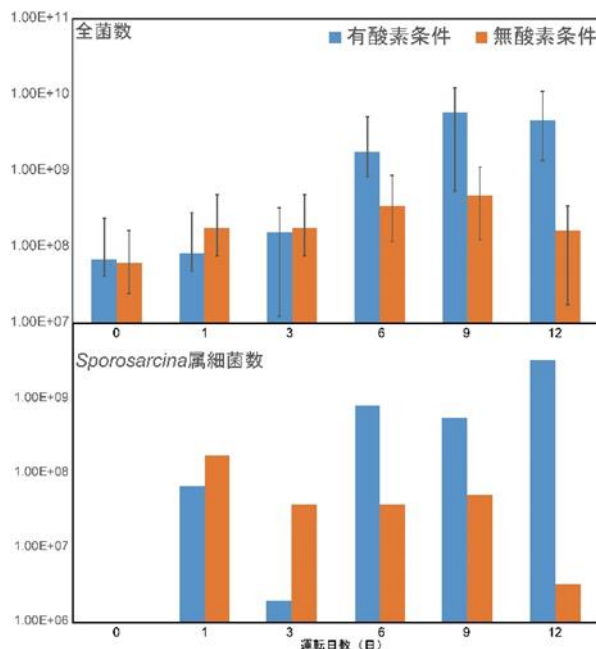
2 日から 3 日毎にサンプルを採取し、サンプルごとにグラム陽性菌ゲノム DNA を抽出した。抽出 DNA の精製物を、リアルタイム PCR 装置を用いて 16SrRNA 遺伝子に基づく全細菌の定量 PCR を実施した。抽出した DNA を対象に 40 サイクル増幅を行い、増幅による蛍光が検出されるようになった時点のサイクル数 (CT 値) を計測した。

2.3 菌叢解析

ガラスカラム内の集積培養物の菌叢構造を解析するために、2.2 と同様の方法で複合系からの DNA 抽出を行い、イルミナ社の次世代シーケンサー MiSeq による網羅的塩基配列解析を実施した。対象遺伝子として菌種の同定を行うために 16SrRNA 遺伝子を選定した。本遺伝子は全細菌が有する遺伝子であるため、塩基配列を比較することで微生物種の同定を行うことができる。更に菌叢解析結果とリアルタイム PCR の定量結果とを合わせ、主たる尿素分解者であると考えられる *Sporosarcina* 属細菌の存在量を経時的に定量した。

3. 結果： *Sporosarcina* 属細菌の菌数

Sporosarcina 属細菌の菌数定量結果を図 3-1 に示す。有酸素状態と無酸素状態の両方において全菌数のうち *Sporosarcina* 属細菌が多くを占めていることからこの微生物が炭酸カルシウム生成に関与していると考えられた。また、無酸素条件に比べ有酸素条件では 9 日程度をピークに菌数が無酸素状態の 10 倍以上に増加したことから、酸素の有無が *Sporosarcina* 属細菌の活性に影響していることが観察された。

図 3-1 全菌数及び *Sporosarcina* 属細菌の菌数変化

4. 結論

実験結果より好気状態下において土壌細菌内の *Sporosarcina* 属細菌の増殖が嫌気条件に比べて促進された。従って、好気状態では *Sporosarcina* 属細菌が尿素代謝を積極的に行い、カルシウムとの結合で炭酸カルシウムが生成され、グラウトとすることで地盤固화를促進させられることが示唆された。

5. 今後の展開

今回の研究では、土壌内微生物(*Sporosarcina* 属細菌)の活性について酸素が影響していることが分かった。今後はこの菌叢の違いから実際に炭酸カルシウム生成量にどのような違いがみられるか、またそれによる強度発現にどのような違いが見られるのかを調査していく必要がある。

6. 参考文献

- (1) 令和元年度版内閣府防災白書
- (2) 安原英明, 木下尚樹, 林和幸, & 海野寿康. (2014). 生体触媒を活用した炭酸カルシウム結晶析出による地盤固化効果の検討. 土木学会論文集 C (地圏工学), 70(2), 290-300.
- (3) DeJong, J. et al. (2014). Biogeochemical processes and geotechnical applications: progress, opportunities and challenges. In Bio-and Chemo-Mechanical Processes in Geotechnical Engineering: Géotechnique Symposium in Print 2013 (pp. 143-157). Ice Publishing