尿素分解型バイオグラウトへの微生物反応シミュレーションの適用

秋山 克¹, 川崎 了²

1 (株) 地層科学研究所・地下環境事業グループ

2 北海道大学・大学院工学研究院・環境循環システム部門

概 要

尿素分解型バイオグラウトを用いたシリンジ固化試験に対し、固化反応に関する現況再現解析ならびに再現精度向上のためのパラメータ調整を実施した。ウレアーゼ活性試験に基づく再現解析で得られた、尿素分解菌 *Pararhodobacter* sp. strain SO1 の尿素分解反応の反応速度定数は 1×10^{-8} mol/mg/sec, 半飽和定数は 0.635 mol/L となった。鉍物析出解析の結果より、実測と解析の析出鉍物を整合させるために、カルサイトのみが析出する設定とした。シリンジ固化試験再現の逐次解析において、反応に寄与する微生物量を考慮した「調整指数」の導入により、排出される Ca^{2+} 濃度の変化を再現できた。以上の結果は、尿素分解型バイオグラウトのカルサイト析出に関わる微生物反応シミュレーションを実施することによって、施工時の強度発現の予測や施工管理が可能であることを示している。

キーワード：バイオグラウト、シミュレーション、尿素、ウレアーゼ、尿素分解菌

1. はじめに

微生物反応を利用した地盤改良技術（以下バイオグラウト）の開発・応用が進められている（たとえば Danjo・Kawasaki¹⁾）。従来の化学反応を利用した技術と比較してバイオグラウトは、グラウト溶液が地盤中に拡散したのちに固化する遅延効果が期待できること、コンクリートや水ガラス系の固化材と異なり、肥料成分など比較的安価で環境負荷の小さい材料を利用することができる、などのメリットがある²⁾。この技術の基本的な反応として、尿素的分解反応により生成する HCO_3^- と溶液中の Ca^{2+} の結合によるカルサイトの析出³⁾が挙げられる。尿素分解菌はほぼ普遍的に土壤中に存在していると考えられるため、適用対象地盤から分離し、増殖させてから利用することで、地盤の微生物生態系への影響を抑制することができる¹⁾。さらに、カルサイトが粒子同士を架橋して強度が発現するため、地盤の透水性を維持しつつ複数回注入によって強度を上げる施工が可能である⁴⁾。

バイオグラウトに限らず、微生物反応は、実験室レベルの管理された環境条件では再現可能ではあっても、多種多様な物質が気相・液相・固相の三態で存在している自然地盤に、試験結果をそのまま適用することは難しい。さらに地下環境に関連した技術に伴って行う微生物影響評価は、地盤中の反応の進行状況を把握するためのボーリング調査の実施、サンプリング井戸を用いた水質測定など、経時的・長期的な調査が求められ、地下へのアクセスの難しさ

ゆえに生じる費用や労力などの負担が大きくなることが予想される⁵⁾⁶⁾⁷⁾⁸⁾。それらの負担を軽減するために、調査対象領域環境を類推しうる情報に基づいて実施するコンピュータシミュレーションは有効である。これまでに、地下環境における微生物影響評価に用いるための生物地球化学反応シミュレーションプログラムの開発および解析が実施されてきた⁹⁾¹⁰⁾¹¹⁾。そうした解析をバイオグラウト施工時に利用することで、事前に微生物反応によってもたらされる地盤強度の変化を把握し、それに応じた施工計画を準備することが可能となり、結果として効率的なバイオグラウトの運用が期待できる。

以上のことから本研究では、バイオグラウト施工時における微生物反応シミュレーションの適用を目指し、実験的に得られたバイオグラウト固化試験の結果に対する現況再現解析、ならびにシミュレーションの精度向上に必要なパラメータフィッティングを行った。

2. 微生物反応シミュレーションについて

地下における微生物反応をモデル化する試みは、地下空間の利活用の有用性と必要性が高まりを見せた 1980 年代より、特に放射性廃棄物の地層処分研究の一環として国内外で進められてきている（たとえば Humphreys ら¹²⁾）。多くは化学反応シミュレーションを基本としたモデルに、微生物の速度論的反応を付加したものとなっている。微生物反応解析が可能な地球化学シミュレータとして、これまで

に研究開発例や実施例が認められるのは、PHREEQC¹³⁾, MINT⁹⁾, PHREEQC 改変モデル¹⁰⁾, The Geochemist's Workbench (以下 GWB)¹⁴⁾などが挙げられる。これらのうち、シミュレーションの適用が今後二次元モデルにまで拡張される可能性があること、尿素を含めた有機物種の熱力学データベースが標準搭載されていること、などから、本研究では GWB を採用した。

GWB は有償であり、化学反応や微生物反応パラメータの入力を支援するユーザーインターフェースを装備している。熱力学データベースでは、主要化学種がまずリストアップされており、それらから派生する二次化学種、酸化還元反応を記述する酸化還元種、鉱物種およびガス種について、0 °C から 500 °C までの平衡定数が記載されている。他にも、PHREEQC¹³⁾や MINTEQA2¹⁵⁾などで利用されている熱力学データベースファイルが、GWB 用に変換されて格納されている。解析対象として、岩石・水・微生物間の平衡反応解析および速度論的解析に対応している。

GWB における微生物反応に関する基本的な反応速度式は式(1)¹⁶⁾の通りである。

$$r = n_w k_+ X [m_D / (m_D + K'_D)] [m_A / (m_A + K'_A)] F_T \quad (1)$$

ここで、 r は反応速度 (mol/s), n_w は水量 (kg), k_+ は反応速度定数 (mol/mg/s), X は微生物量 (mg/kg), m_D は電子供与体の濃度 (mol/kg), m_A は電子受容体の濃度 (mol/kg), K'_D は電子供与体の半飽和定数 (mol/kg), K'_A は電子受容体の半飽和定数 (mol/kg) をそれぞれ示す。 F_T は熱力学的ポテンシャル因子 (Thermodynamic potential factor) で、下記の式 2, 3 および 4 で定義される¹⁶⁾。

$$F_T = 1 - \exp[(\Delta G_r + m \Delta G_p) / (\chi R T_k)] \quad (2)$$

$$\Delta G_r = R T_k \ln(Q/K) \quad (3)$$

ここで R は気体定数, Q は活量積, T_k は絶対温度, ADP はアデノシン二リン酸, ATP はアデノシン三リン酸を表す。なお, ΔG_r は対象となる反応の自由エネルギー変化 (J/mol) (式 3), ΔG_p は ATP 合成における自由エネルギー変化 (J/mol) (式(4)) を示す。 m は反応式が 1 回進行することで生成される ATP の数, χ は average stoichiometric number of the overall reaction¹⁶⁾ として、輸送される電子が通過する律速段階の数を表している。

GWB に限らず、微生物反応を記述するいずれのモデルにおいても、微生物の反応速度を表す式は monod 項¹⁷⁾をその反応式に含むことで特徴づけられる。monod 項は、水中のプランクトンの増殖¹⁸⁾, 土壌におけるバイオレメディエーション¹⁹⁾など、微生物の代謝活動を記述するために広く用いられている。反応式中で monod 項は、微生物増殖に関連する電子供与体および電子受容体などの濃度に基づいて、その代謝反応の最大速度を 1 とした場合の比として、反応全体の速度を制約する。最大速度の半分の速度を

もたらす基質濃度を半飽和定数（あるいは半飽和濃度）として、対象とする反応系における基質濃度とともに monod 項を構成する。

さらに、地盤中や深地層などの地下環境における微生物反応を表現する場合、反応場の酸化還元環境の状態によって微生物の代謝・増殖が制約を受けて、主たる微生物群集が変化することが知られている²⁰⁾。その微生物群集の切り替わりを反応速度式で表現するために、反応を抑制する化学種についての monod 項の付加⁹⁾¹³⁾, また抑制化学種の濃度に応じて反応が切り替わるスイッチ機能¹⁰⁾などの工夫が取り込まれている。一方 GWB では、微生物増殖に関与する自由エネルギーの変化に着目し、 F_T の項を加えている (式 1)¹⁶⁾。微生物による ATP 合成に必要な自由エネルギー変化と、対象となる酸化還元ペアの自由エネルギー変化との差分によって導かれる項であり、微生物反応に対して反応場の熱力学的な制約を加えて反応速度を調節している。ただし、GWB は対象問題（線形式、ロジスティック式等）に応じて、ユーザーが反応則を任意に選ぶことも可能である。さらに、GWB は酸化還元反応の設定において、酵素反応のみに着目した解析を実施することができる。

以上のことを踏まえ、本研究においては、酵素反応としての尿素分解に微生物量の変化も考慮する必要があるため、GWB に標準装備されている微生物の速度論的設定を一部改変して解析を実施した。

3. ウレアーゼ活性の評価

3.1 材料および方法

本研究では、反応速度定数を求めるための基礎資料として、ウレアーゼによる尿素分解で生成される NH_4^+ 濃度の変化に基づいて尿素分解速度を求め、ウレアーゼ活性を評価した。まず、Danjo・Kawasaki¹⁾によって沖縄のビーチロック周辺より分離された尿素分解菌 *Pararhodobacter* sp. strain SO1 (以下 SO1 株) を ZoBell2216E 固体培地 (表 1 および表 2) に植菌し、30°C で 72 時間以上培養した。培地上に生えた菌株 1.0 g を ZoBell2216E 液体培地 100 mL に添加して、30°C, 48 時間で振とう培養 (160 rpm) し、600nm の波長での濁度 (OD_{600}) によって同液中の菌量を測定した。一方で、トリス塩酸緩衝液 (pH8.0) を溶媒として 0.3 mol/L (以下 mol/L を M とする) の尿素溶液 (表 3) を作成した。尿素溶液 100 mL に菌体培養液 1 mL を加え、室温 (25°C) で攪拌し、尿素分解反応を開始した。反応開始直後、5, 10 および 15 分後に、メンブレンフィルター (ザルトリウス・ステディム・ジャパン製, ミニザルト, 16555K, 0.2 μm) によって濾過除菌を行った尿素溶液 10 mL を得た。溶液中の尿素分解反応を止めるために、強アルカリ性である 10 M NaOH 溶液を 0.1 mL 加えてそのタンパク質変性作用によってウレアーゼを失活させ、ハンディアンモニアメータ (東興化学研究所製, TiN-9001) を用いて NH_4^+ 濃度を測定し²¹⁾, 単位時間あたりに単位基質量の反応を促進する酵素活性 (単位は $\text{U} = \mu\text{mol/min}$) を算出した。

表 1 ZoBell2216E 培地の組成 (溶媒: 人工海水)

項目・成分	単位	数値・添加量
pH	—	7.6-7.8
ポリペプトン	g/L	5.0
酵母エキス	g/L	1.0
FePO ₄	g/L	0.1
寒天	g/L	15.0

表 2 人工海水の組成

成分	添加量 (g/20L)
MgCl ₂ ·6H ₂ O	222.23
CaCl ₂ ·2H ₂ O	30.7
SrCl ₂ ·6H ₂ O	0.85
KCl	13.89
NaHCO ₃	4.02
KBr	2.01
H ₃ BO ₃	0.54
NaF	0.06
NaCl	490.68
Na ₂ SO ₄	81.88

表 3 尿素溶液の組成

項目・成分	単位	添加量
尿素	g/L	25
0.04%クレゾールレッド溶液	mL/L	20

3.2 ウレアーゼ活性試験の結果

溶液中の微生物量を推定するために、600 nm の波長での濁度 (OD₆₀₀) を測定すると SO1 株を添加した尿素反応液の OD₆₀₀ は 1.192 であった。島崎²²⁾によれば、SO1 株で求められた濁度測定値および生菌数測定値の関係式は式 (5) となる。

$$Y = 0.1306 \ln X - 2.061 \quad (5)$$

ここで式中の Y は濁度, X は生菌数を示している。上記の式(5)より、ウレアーゼ活性試験に用いた培養液中の微生物量は 6.62×10^{10} cells/mL と推定された。

続いて、ウレアーゼ活性試験の結果を図 1 に示す。本研究での条件では、NH₄⁺濃度のグラフは線形を示し、実測値として 15 分後に 20.21 ppm の値を示した。4 点の座標に基づく近似曲線を濃度推定に使用した場合、初期値 3.699 ppm に対し、15 分後の濃度は 20.949 ppm となる。基質である尿素 1 mol に対し、NH₄⁺は 2 mol 生成されることを考慮して、反応 15 分間の NH₄⁺の増分より、分解された尿素濃度を求めると 8.625 ppm となる。これをモル濃度へと単位変換した上で単位時間 (分) あたりの濃度変化を計算し、酵素活性 3.19 U が得られた。

4. シリンジ固化試験

4.1 材料および方法

SO1 株、尿素および Ca²⁺を含む固化促進溶液を用いて、シリンジスケールの砂粒子固化試験を、檀上²³⁾の方法に従って下記の手順で実施した。固化用の容器として、30 mL 容量のプラスチックシリンジ (テルモ社製, SS-30ESZ)

図 1 ウレアーゼ活性試験の結果

を用いた。シリンジからピストン部を取り外し、長さ約 45 cm のシリコンチューブを筒先に取り付け、先端をピンチコックで挟んだ。砂粒子が先端から流出しないようにシリンジの内径に合わせて不織布を 1 枚入れた。そこに、滅菌済みのサンゴ砂 40 g を 3 層に分けてシリンジ内に投入し、砂粒子を壊さない程度の強さで各層 20 回突き固め、密詰めにした。ZoBell2216E 液体培地 (表 1 および表 2) を培養液とし、3 段階の SO1 株添加量 (0.01, 0.1 および 1.0 g/100 mL 培養液) (表 4) を設定して、80 rpm で 48 時間の振盪培養を行った。その SO1 株培養液 16 mL を、2 回に分けて供試体上面から注入し、SO1 株を砂粒子表面に定着させた。その 30 分後、表 5 に示す 3 段階の固化促進溶液を濾過除菌 (0.45 μm) しながらから上面から注入し、一方で先端部からは培養液を排出してシリンジ内を固化促進溶液に置換した。その状態で 1 日間、30 °C に設定した恒温槽内で静置した。すなわち、合計 9 ケースについて、1 日 1 回注入及び排出を同時に行い、15 日間実施した。試験開始 3, 6, 9 および 12 日後に、排出する固化促進溶液の一部を採取し、pH をラコムテスター pH 計 (アズワン製, pH Spear) および Ca²⁺濃度をコンパクトカルシウムイオン計 (堀場製作所製, LAQUAtwin, B-751) を用いて測定した。15 日後に、固化した供試体について軟岩ペネトロ計 (丸東製作所製, SH-70) を用いて針貫入試験を行い、下記式(6)によって推定一軸圧縮強さを求めた。なお、x は針貫入勾配、y は推定一軸圧縮強さを表している。

$$\log_{10} y = 0.978 \log_{10} x + 2.621 \quad (6)$$

4.2 結果と考察

シリンジ固化試験における排水中の Ca²⁺濃度の 3 日に 1 度のサンプリングによる測定結果を図 2 に示す。尿素濃度 0.5 M ケースでは、SO1 株添加量が 0.01 g の場合は 6 日後から、0.1 g の場合には 9 日後から Ca²⁺濃度が上昇した。0.4 M ケースも、0.5 M より低い値で推移したものの経時的な増加傾向を示し、0.3 M ケースも 12 日後に微増した。注入する固化促進溶液の Ca²⁺濃度が高いほど、早い段階でのカルサイト析出によって、析出速度の低下すなわち SO1 株の尿素分解反応速度の低下がもたらされたと考えられ

表 4 SO1株の培養液への添加量と推定生菌数

項目	培養液への微生物添加量 (g/100 mL)		
	0.01	0.1	1.0
使用時の推定生菌数 (cells/mL)	6.0×10^8	2.0×10^9	6.0×10^9

表 5 固化促進溶液の基本組成

成分	単位	反応液組成		
		0.3M ケース	0.4M ケース	0.5M ケース
pH	—	8.1	8.1	8.1
尿素	M	0.3	0.4	0.5
NH ₄ ⁺	M	0.187	0.187	0.187
Na ⁺	M	0.505	0.505	0.505
HCO ₃ ⁻	M	0.028	0.028	0.028
Cl ⁻	M	1.347	1.547	1.747
Ca ²⁺	M	0.31	0.41	0.51
Mg ²⁺	M	0.055	0.055	0.055
SO ₄ ²⁻	M	0.029	0.029	0.029
K ⁺	M	0.01	0.01	0.01
nutrient broth	g/L	3.0	3.0	3.0

る。試験開始 15 日後の推定一軸圧縮強さを図 3 に示す。いずれの SO1 株添加量においても、尿素および Ca²⁺濃度の上昇に伴って一軸圧縮強さが大きくなり、SO1 株添加量 1.0 g、尿素-Ca²⁺濃度 0.5 M ケースで最大値 4.7 MPa を示した。0.3 M および 0.4 M ケースのそれぞれの場合、SO1 株添加量の違いによる影響はほとんど見られなかった。

以上の結果は、注入時の固化促進溶液の尿素-Ca²⁺濃度は、排液中の Ca²⁺濃度すなわち固化に利用されずに残存した Ca²⁺濃度と関連性を示すが、発現する一軸圧縮強さとの関連性については詳細な検討の余地を残している。そこで本研究では、微生物による鉱物析出反応を数値シミュレーションで再現することに重点を置き、排液中の Ca²⁺濃度の変化について実測値と解析値との整合をとることを目標とするのが適当であると考えられた。

5. ウレアーゼ活性試験の再現解析

5.1 解析の準備

ウレアーゼ活性試験での溶液組成に基づき、GWB における初期水質を設定した (表 6)。このとき、解析中に溶液の電荷バランスが極端に変化すると収束計算が発散してしまうことがある。そこで、今回設定される反応系に直接関与しない Na⁺ならびに Cl⁻を初期水質に加えることで、GWB が自律的に電荷バランスを調整する設定とした。また、微生物反応式で制約されている化学種である CO₂(g)ならびに NH₃(aq)は、反応開始後に微生物から放出されて初めて系内に出現することから、それらに対応する基本化学種 (それぞれ HCO₃⁻および NH₄⁺) を予め初期水質に設定した。NH₄⁺については、ウレアーゼ活性試験における反応開始時点で、微生物培養液由来と考えられる 3.699 ppm の濃度を計測していることから、解析と実測の整合をとるために初期水質に同濃度の設定を行った。なお、Na⁺、Cl⁻、

図 2 シリンジ固化試験において排出された Ca²⁺濃度

図 3 推定一軸圧縮強さ

および HCO₃⁻については溶液中では 0 M となるが、計算の収束性向上のために極微量の値を設定する必要があるため、 1×10^{-10} M を 0 M に相当するものとして入力した³¹⁾。尿素分解反応を利用したバイオグラウトにおける反応速度定数は $9.60 \times 10^{-12} \sim 3.05 \times 10^{-7}$ mol/mg/sec (表 7) の範囲で報告されている。そこで本解析では、まず $1 \times 10^{-13} \sim 1 \times 10^{-7}$ mol/mg/sec の 7 段階を設定し、反応速度定数の感度解析を実施した。また、尿素的半飽和定数についても、 $3.21 \times 10^{-3} \sim 0.305$ M の範囲で報告例がみられることから、 $1 \times 10^{-4} \sim 1$ M までの 5 段階の半飽和定数を設定して感度解析を行った。以上、計 35 ケースの感度解析 (表 8) を行い、さらに実測値に整合させるために設定の微調整を行った。

ウレアーゼ活性試験において推定された初期微生物量 (6.62×10^{10} cells/mL) を解析の初期微生物量として採用するために、GWB の単位系 (mg/kg) に変換する必要がある。微生物 1 cell の重量を 1×10^{-13} mg³²⁾、溶媒 1 L を 1 kg とすることで、初期微生物量は 623.0 mg/kg に変換された。微生物の増殖に関わるパラメータ (収率・減衰定数) はいずれも 1×10^{-10} とし、増殖に関与する成分であるポリペプトンおよび酵母エキ스는初期水質からは除外した (表 9)。

バイオグラウトの主要プロセスである尿素分解反応では、1 mol の尿素が分解されると、2 mol の NH₃ と 1 mol の CO₂ が生成される (式(7))。

表 6 解析パラメータ取得解析用の初期水質設定

項目・成分	単位	活性試験での 溶液組成	解析設定値
pH	—	8.0	8.0
尿素	M	0.3	0.3
NH ₄ ⁺	mg/L (M)	0 (0)	3.699 (2.05×10 ⁻⁴)
Na ⁺	M	0	1×10 ⁻¹⁰
HCO ₃ ⁻	M	0	1×10 ⁻¹⁰
Cl ⁻	M	0	1×10 ⁻¹⁰

表 7 ウレアーゼ活性に関わる反応速度定数および半飽和定数

文献	反応速度定数 (mol/mg/sec)	半飽和定数 (mM)
Fidaleo and Lavecchia (2003) ²⁴⁾	3.05×10 ⁻⁷	3.21×10 ⁻³
Whiffin (2004) ²⁵⁾	2.00×10 ⁻⁷	0.2
van Paassen (2009) ³⁾	-	0.055
Tobler et al. (2011) ²⁶⁾	1.15×10 ⁻¹¹ 6.32×10 ⁻¹⁰	- -
MacIachlan et al. (2013) ²⁷⁾	8.33×10 ⁻¹⁰ 2.22×10 ⁻⁹	- -
Tobler et al. (2014) ²⁸⁾	1.92×10 ⁻⁸	-
Mahanty et al. (2014) ²⁹⁾	9.60×10 ⁻¹² 1.73×10 ⁻¹⁰	- -
Lauchnor et al. (2015) ³⁰⁾	8.92×10 ⁻⁸	0.305

表 8 微生物パラメータに基づくケース設定

ケース No.	反応速度 定数 (mol/mg/sec)	半飽和 定数 (M)	ケース No.	反応速度 定数 (mol/mg/sec)	半飽和 定数 (M)
case1-1-1	1×10 ⁻¹³	0.0001	case1-4-4	1×10 ⁻¹⁰	0.1
case1-1-2	1×10 ⁻¹³	0.001	case1-4-5	1×10 ⁻¹⁰	1
case1-1-3	1×10 ⁻¹³	0.01	case1-5-1	1×10 ⁻⁹	0.0001
case1-1-4	1×10 ⁻¹³	0.1	case1-5-2	1×10 ⁻⁹	0.001
case1-1-5	1×10 ⁻¹³	1	case1-5-3	1×10 ⁻⁹	0.01
case1-2-1	1×10 ⁻¹²	0.0001	case1-5-4	1×10 ⁻⁹	0.1
case1-2-2	1×10 ⁻¹²	0.001	case1-5-5	1×10 ⁻⁹	1
case1-2-3	1×10 ⁻¹²	0.01	case1-6-1	1×10 ⁻⁸	0.0001
case1-2-4	1×10 ⁻¹²	0.1	case1-6-2	1×10 ⁻⁸	0.001
case1-2-5	1×10 ⁻¹²	1	case1-6-3	1×10 ⁻⁸	0.01
case1-3-1	1×10 ⁻¹¹	0.0001	case1-6-4	1×10 ⁻⁸	0.1
case1-3-2	1×10 ⁻¹¹	0.001	case1-6-5	1×10 ⁻⁸	1
case1-3-3	1×10 ⁻¹¹	0.01	case1-7-1	1×10 ⁻⁷	0.0001
case1-3-4	1×10 ⁻¹¹	0.1	case1-7-2	1×10 ⁻⁷	0.001
case1-3-5	1×10 ⁻¹¹	1	case1-7-3	1×10 ⁻⁷	0.01
case1-4-1	1×10 ⁻¹⁰	0.0001	case1-7-4	1×10 ⁻⁷	0.1
case1-4-2	1×10 ⁻¹⁰	0.001	case1-7-5	1×10 ⁻⁷	1
case1-4-3	1×10 ⁻¹⁰	0.01			

表 9 微生物パラメータの設定

成分	単位	設定値・備考
反応速度定数 (7 段階)	mol/mg/sec	1×10 ⁻¹³ , 1×10 ⁻¹² , 1×10 ⁻¹¹ , 1×10 ⁻¹⁰ , 1×10 ⁻⁹ , 1×10 ⁻⁸ , 1×10 ⁻⁷
初期微生物量	mg/kg	OD ₆₀₀ の測定値から算出
半飽和定数 (5 段階)	M	0.0001, 0.001, 0.01, 0.1, 1
収率	mg/mol	1×10 ⁻¹⁰
減衰定数	/sec	1×10 ⁻¹⁰
F _T 項	—	設定なし

尿素はGWBの熱力学データベースにおいては二次化学種として設定されている。そのため、搭載されている状態でデータベースを採用すると、平衡反応に基づいて尿素は解析開始から瞬時にNH₃とCO₂に分解されてしまう。そこで尿素の加水分解を、平衡反応から微生物による速度論的反応に切り替えるため、GWBの熱力学データベース編集

画面を用いて、尿素を酸化還元種として取り扱うように修正した。これにより、尿素とNH₄⁺が酸化還元ペアとなり、解析時に「decouple」によるペア解除を行うことで、速度論的反応の計算が可能となる。また、GWBにおける微生物の速度論的解析においては、熱力学的平衡を考慮したF_T項の設定が可能である。しかし本研究では、尿素の加水分解を微生物による分解反応にのみ依存させるため、F_T項の設定は解除し、尿素濃度に対するmonod式のみを反応則の基本骨格として尿素の加水分解反応を記述した。

5.2 感度解析の結果

反応開始前に測定されたNH₄⁺濃度は、添加したSO1株培養液に由来するものと考えられるため、解析においても初期水質のNH₄⁺濃度を3.699 ppmとし、実測値との整合をとった。以上より、反応開始15分後の目標値を20.95 ppmとして、感度解析を進めた。

上記初期微生物量を設定して実施した35ケースの解析結果を図4に、反応速度定数ごとに分類して示した。同じ反応速度定数では、半飽和定数の増加に伴って15分後のNH₄⁺濃度が低下する傾向が認められた。ここで、15分後の濃度の目標値に最も近いケースは、反応速度定数が1×10⁻⁸ mol/mg/secである場合のcase1-6-4およびcase1-6-5で、15分後のNH₄⁺濃度はそれぞれ44.1 ppmおよび16.1 ppmであった。そこで、半飽和定数の値を0.1～1 Mの範囲で設定して、15分後の目標値に近似させる微調整を行った。その結果、半飽和定数が0.635 Mの場合に15分後のNH₄⁺濃度が20.94 ppmとなるcase1-6-6を得た(図4(h))。以上の結果から、反応速度定数1×10⁻⁸ mol/mg/secおよび半飽和定数0.635 Mを、本解析の微生物パラメータとして採用した。

6. バイオグラウト反応溶液を用いた鉱物析出解析

6.1 材料および方法

第5章で見出された微生物パラメータを利用した場合に、バイオグラウトとなる尿素反応溶液によって生成される鉱物種を明らかにし、実現象との整合ならびに解析の効率化を進めるために、シリンジ固化試験の再現解析に先立って鉱物析出解析を実施した。

シリンジ固化試験では、SO1株を含む培養液をシリンジに注入して砂粒子の表面にSO1株を定着させ、その後にカルシウムや尿素を含む固化促進溶液を注入して、カルサイトの析出に伴う固化を誘導する。GWBにおいても、シリンジ固化試験の反応系を再現するために、初期水質として人工海水を溶媒とした固化促進溶液を設定し、第5章で求めた各種パラメータに基づいて微生物反応が進行する設計とした(表5および表10)。ただし、バイオグラウトの尿素分解反応とそれに伴う鉱物の析出については、汎用性・発展性を高めるために可能な限り単純化した反応系でのモデルの構築が望ましい。そこで、本研究では、反応溶

(a) case1-1 (1×10^{-13} mol/mg/sec) (b) case1-2 (1×10^{-12} mol/mg/sec) (c) case1-3 (1×10^{-11} mol/mg/sec) (d) case1-4 (1×10^{-10} mol/mg/sec) (e) case1-5 (1×10^{-9} mol/mg/sec) (f) case1-6 (1×10^{-8} mol/mg/sec) (g) case1-7 (1×10^{-7} mol/mg/sec) (h) case1-6-6 (反応速度定数 1×10^{-8} mol/mg/sec, 半飽和定数 0.635 M)

図 4 ウレアーゼ活性試験の再現解析

液と砂粒子との間の相互作用はないものとして、砂粒子間の間隙水中で反応が進行すると仮定した。また、解析における反応場においては、微生物の分布ならびに溶液中のイオン濃度の分布は均一なものとして取り扱われる。その上で、GWBの熱力学データベースの鉱物設定を Suppress 機能によって調整し、4 ケースの鉱物析出解析を実施した。すなわち、GWB に標準搭載されている熱力学データベース (thermo.com/V8.R6+.tdat) をそのまま採用して鉱物 1122 種を対象としたケース (case2-1)、既報の尿素分解型バイオグラウトで粒子を架橋する主な鉱物はカルサイトであることを考慮して、含 Mg 鉱物の生成が抑制される設定 (case2-2)、含 S 鉱物の生成が抑制される設定 (case2-3)、ならびに含 Mg 鉱物および含 S 鉱物の両者が抑制される設

定 (case2-4) を実施した (表 11)。

なお、実際の尿素反応溶液には、微生物培養液に含まれる nutrient broth が残存していると考えられるが、尿素分解反応は酵素反応であり、nutrient broth を含まない培地でも反応が進行することが示されていることから²³⁾、本章では nutrient broth は考慮しないこととした。

6.2 鉱物析出解析の結果および考察

GWB に付属の熱力学データベースの全鉱物を考慮すると、固化促進溶液で生成される鉱物はカルサイトのみならず、ドロマイトおよびジブサムも過飽和状態となって析出することが示された (図 5)。しかし、固化促進溶液中の微生物反応によって生成した鉱物について、走査型電子顕

表 10 微生物パラメータの設定

成分	単位	設定値および備考
反応速度定数	mol/mg/sec	1×10^{-8}
初期微生物量	mg/kg	570
尿素の半飽和定数	M	0.635
収率	mg/mol	1×10^{-10}
減衰定数	/sec	1×10^{-10}
F_1 項	—	設定なし

表 11 鉱物析出解析のケース設定

成分	熱力学データベースの鉱物設定
case2-1	全鉱物を考慮 (1122 種)
case2-2	含 Mg 鉱物 (89 種) を除く
case2-3	含 S 鉱物 (146 種) を除く
case2-4	含 Mg 鉱物および含 S 鉱物 (222 種) を除く

微鏡に付属のエネルギー分散型 X 線分析装置による元素分析を行ったところ, C, Ca および O のみが検出され, ドロマイトの構成元素である Mg やジプサムに含まれる S はほとんど検出されなかった¹⁾。

本研究でも固化促進溶液の溶媒には人工海水を用いたが, 平均的な組成を持った海水においてドロマイトは過飽和であるものの, Mg^{2+} は SO_4^{2-} と錯イオンを形成するため, ドロマイトが自然海水中で生成されることはないとされている³³⁾。つまり, 熱力学的にはカルサイトよりドロマイトが析出しやすいものの, 本研究の溶液組成においてはカルサイトの析出に対して優先的に HCO_3^- が利用されたと考えられる。

一方, SO_4^{2-} および Ca^{2+} 存在下での pH と HCO_3^- 濃度による鉱物生成の分配図を GWB で作成すると図 6 となる。これによると, HCO_3^- の濃度にかかわらず, ジプサムとカルサイトはその生成が pH 変化に依存しており, 中性域まではジプサムの析出が卓越する。これはカルサイトの生成に必要な HCO_3^- が酸性域では生成されず, Ca^{2+} は SO_4^{2-} と優先的に結合するためと考えられる。本研究の尿素反応溶液の初期 pH を解析によって求めると, その値は 5~6 の間で推移しており, ジプサムが析出する pH 環境だったことが示されている。しかし実測値では初期溶液で pH が 6 を超えており, カルサイト析出が卓越する pH 環境であったと言える。加えて尿素分解菌は, NH_3 を放出して周囲の pH を上昇させることから, 特に細胞近傍はアルカリ性寄りになると考えられる。

また一般に, 微生物の細胞膜表面はマイナスに荷電しており, 細胞膜近傍にプラス電荷を持つ Ca^{2+} や Mg^{2+} 濃度の高い領域が形成されることが知られている³⁴⁾。ここで, 細胞膜のポンプは Ca^{2+} を外に, Mg^{2+} を細胞内に運ぶため, 相対的に $\text{Mg}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$ モル比が小さくなり, カルサイト形成に有利な状況が形成されたと考えられる³⁵⁾。こうした細胞生理学的な現象は, 溶液中に Ca^{2+} や HCO_3^- の不均一な分布を生み出すとともに, 微生物細胞表面にカルサイトが特異的に生成する環境を形成していると推察される。デフォルト設定を採用したシミュレーションでは, そうした鉱物生成や溶存イオンの不均一な分布を規定することができない

(a) case2-1

(b) case2-2

(c) case2-3

(d) case2-4

図 5 鉱物析出解析の結果

図 6 尿素反応液の $\text{Ca}^{2+} \cdot \text{SO}_4^{2-}$ の各種イオン存在下における pH- HCO_3^- 濃度に基づく分配図

が、GWB の Suppress 機能によってカルサイトのみの鉱物生成設定 (case2-4) とすることで、実際の観察結果を表現することが可能となる。

以上のことから、成分が均一に分布する反応溶液を前提条件とする数値解析では、系全体での同時並行的な反応を記述することとなり、原位置で生じる反応との不整合が生じる場合のあることが示された。本研究においては、固化試験においてカルサイト以外の鉱物が析出していないという事実により、Suppress 機能によってカルサイトのみが析出する設定として解析を実施することとした。

7. シリンジ固化試験のシミュレーション

7.1 解析準備

Danjo・Kawasaki¹⁾および檀上²³⁾の方法に準拠してシリンジスケール固化試験の再現解析を実施した。島崎²¹⁾は、カルシウム析出率から一軸圧縮強さを導出する回帰式を求めている。しかしながら、GWB では一軸圧縮強さを直接算出することはできないため、上述の回帰式のカルシウム析出率の算出に用いる排出液中の Ca^{2+} 濃度に着目した。排出液中の Ca^{2+} 濃度は、注入された固化促進溶液中の Ca^{2+} のうち、固化に使用されなかった濃度を示すものである。つまり、排出液中の Ca^{2+} 濃度を測定することによって、供試体内で析出したカルサイト量を間接的に求めることが可能であり、最終的に回帰式を用いて一軸圧縮強さを推定できる。以上のことから、本研究の GWB の解析においては、カルサイト析出に未使用となった排出液中の Ca^{2+} 濃度を指標とし、実測値と解析値との整合を取ることを目標とした。

第 5 章で得られた反応速度定数および半飽和定数を用い、第 6 章の鉱物析出解析に基づいてカルサイトのみに着目する設定とし、全 15 日間の再現解析を行った。培養液に対する菌株の添加量 (括弧内は使用時の推定生菌数) は 0.01g (6.0×10^8 cfu/mL), 0.1g (2.0×10^9 cfu/mL) および 1.0g (6.0×10^9 cfu/mL) (表 4), 固化促進溶液の尿素と塩化カルシウムの添加濃度を 0.3, 0.4 および 0.5 M として解析を実施した。シリンジ固化試験の試験設計を解析で再現するため、第 6 章での解析と同様の固化促進溶液組成を解析の初期水質とし、そこに微生物の速度論的反応を 1 日間設定する。そして本章では、1 日目に析出したカルサイト量を翌 2 日目の初期条件として引き継いだ上で、2 日目の初期水質は 1 日目と同様の組成を設定する逐次解析を実施する。これにより、1 日 1 回の固化促進溶液注入とカルサイトの蓄積ならびに排液の Ca^{2+} 濃度の変化を表現できる。ただしこの方式では、線形的にカルサイト量が単純増加、すなわち排液中の Ca^{2+} 濃度は常に同じ値になることが想定される。そこで、経時的に Ca^{2+} 濃度が増加する実測での傾向と解析との整合をとることを目的として、反応速度を調整するための係数の導出を行った。

7.2 調整に用いる係数の導出

反応速度の計算に関わるパラメータのうち、反応速度定数ならびに半飽和定数は、解析対象となる SO1 株の特性を表す固有の数値となるものであり、本研究では統一して用いることが望ましい。実測において排出される Ca^{2+} 濃度が経時的に増加する要因として、注入後にシリンジ内に定着した SO1 株の細胞が析出したカルサイトに覆われ、固化に寄与する SO1 株量が定着時と比較して減少したことが考えられる。そこで、そうした想定を反映して、逐次解析における微生物量に着目し、実現象と整合を取るための調整を実施した。

ここで、実測値のうち排出液の Ca^{2+} 濃度から、注入を行った 1 日当たりのカルサイトの析出量およびその注入時までに析出したカルサイトの積算量が求められる。実験で用いたシリンジ及び砂粒子の体積は解析期間中は不変であるから、注入・排出を繰り返した結果として、同じ微生物量で試験した場合のカルサイトの最大析出量は、固化促進溶液の濃度と無関係に一定の値に近似すると推測できる。カルサイトの析出によって微生物が反応溶液と接する機会は徐々に失われていくという仮説に則り、注入当日の反応においてカルサイト析出に寄与する微生物量は、前日までに析出したカルサイトの量に依存すると考えられるため、注入当日の微生物量の推定を下記式(8)によって試みる。

$$y = y_0 [1 - (x/x_{\max})^n] \quad (8)$$

式中の x は前日までに析出したカルサイト積算量 (g), $x_{\max}$ は任意の微生物量添加時のカルサイトの最大析出量 (g), y_0 は初期微生物量 (g), y は当日の反応においてカルサイトの析出に寄与する微生物量 (g) であり、 n は便宜上「調整指数」と呼ぶ。ここで、補間値を含む全測定値と、任意の n および $x_{\max}$ を代入した場合の解析値を比較し、全比較点における誤差の二乗和を算出する。この手順によって、誤差の二乗和が最も小さくなる n および $x_{\max}$ の組み合わせを決定した。ただし、実務上の利便性を考慮して、微生物量に関わらず n が同一となるようにし、その時の各微生物量における $x_{\max}$ を求めるようにした。こうして得られた n ならびに $x_{\max}$ を、逐次計算における当日の微生物量の決定に用いて解析を実施した。

7.3 結果と考察

逐次解析で用いる微生物量調整に関する感度解析により、調整指数 n を 3.2 とすることで、実測値と理論値の誤差の二乗和が最小となった場合のカルサイトの最大析出量は微生物添加量 1.0g では 6.26M , 0.1g では 5.58M , 0.01g では 4.85M となった (表 12)。その調整指数と最大析出量の理論値に基づいて、前日までに析出したカルサイトの積算量と当日のカルサイトの析出可能量との関係を示したグラフに、実測値のグラフを併記したものを図 7 に示す。

表 12 調整指数 (n) ならびに最大析出量の理論値

微生物添加量	n	最大析出量 (M)
1.0 g	3.2	6.26
0.1 g	3.2	5.58
0.01 g	3.2	4.85

(a) 微生物添加量 1.0g

(b) 微生物添加量 0.1g

(c) 微生物添加量 0.01g

図 7 カルサイトの積算量と析出可能量の実測(補間)値および解析値の整合

なお実測値は、3 日毎に測定した Ca^{2+} 濃度について 1 日毎になるように補間を行っている。

ここで、得られた調整指数 $n=3.2$ ならびにそれぞれの微生物量で実施した再現解析の結果を図 8 (a), (b), (c)に示す。微生物添加量が最大の 1.0 g の場合の Ca^{2+} 濃度をみると、解析値は概ね実測値と同様の経時変化を示した。しかし、0.1 g および 0.01 g の添加量の場合、 Ca^{2+} は試験期間中にほ

(a) 微生物添加量 1.0g

(b) 微生物添加量 0.1g

(c) 微生物添加量 0.01g

図 8 シリンジ固化試験の再現解析の結果

ぼ一定の濃度で残存していた。これは、解析に設定された微生物量において最大限のウレアーゼ活性が発揮されてカルサイト析出が起こったとしても、翌日に微生物反応を抑制するほどの析出量には至らなかったことを示しており、設定した微生物量が過小であったことを示唆している。そこで、0.1 g および 0.01 g 添加ケースでの反応速度の上昇を目的として、微生物量を増加させる調整を実施した。

各ケースで微生物量を 10 mg/kg 単位で徐々に増加させ、排出される Ca^{2+} 濃度の実測値と解析値の誤差の二乗和が

(a) 微生物添加量 1.0 g (設定値は変更せず)

(b) 微生物添加量 0.1 g (解析時に初期微生物量を 2.3 倍)

(c) 微生物添加量 0.01 g (解析時に初期微生物量を 6.0 倍)

図 9 シリンジ固化試験の再現解析の結果 (初期微生物量調整)

最小となる初期微生物量を求めた。それらの調整により、0.01 g の場合は 570 mg/kg から 3420 mg/kg に、0.1 g の場合は 1900 mg/kg から 4370 mg/kg に増加させることで、誤差の二乗和が最小となった。微生物量を調整した場合の逐次解析結果を図 9 (a), (b), (c) に示す。微生物量の調整により、解析初期に Ca^{2+} の消費が促され、経時的に排出される Ca^{2+} 濃度が上昇する実測と同じ傾向を示すようになった。実測値と解析値の相関をみると、微生物量を調整した場合に高い相関を示し、調整によって両者の整合性が大幅に改善さ

(a) 初期微生物量調整前

(b) 初期微生物量調整後

図 10 排出液中の Ca^{2+} 濃度の実測値および解析値の比較

れたことが示された (図 10)。

初期微生物量の調整が必要となった理由として、実際は注入後に SO1 株が増殖した可能性、あるいは析出したカルサイトがさらなる析出を促進した可能性などが考えられる。微生物量調整につながる作用機序の解明には、排液中のみならず、供試体中の微生物の分布や定着量の経時変化、それらと溶液濃度との関連など、微生物量の測定に特化した試験を別途行う必要がある。また、ウレアーゼ活性試験とシリンジ固化試験において、nutrient broth 添加の有無が SO1 株の増殖および反応速度そのものに影響を与えた可能性がある。SO1 株のウレアーゼ活性について、より精度を高めた検証の必要があるとともに、SO1 株を含め、バイオグラウトで利用可能な尿素分解菌の利用特性に関する標準規格を整備することも重要であると考えられる。しかしながら本研究の結果は、実施工に向けて、採取した地盤材料の供試体を対象に、数段階の微生物添加量を設定した予備的な固化試験ならびに解析を行うことで、微生物量に基づいて地盤中における固化反応の予測が可能であることを示唆するものである。

本研究では、カルサイト析出で残存した Ca^{2+} 濃度に着目して解析を実施したが、GWB においては反応液の pH を出力することも可能である。実測値と解析値の pH の経時

図 11 排出液の pH 変化

変化を図 11 に示した。pH の実測値は 3 日後と比較して一時的に上昇するケースがあるものの 12 日後にはいずれのケースにおいても低下した。解析値はほぼすべてのケースで 6 日後から 9 日後にかけて上昇傾向を示した。

そもそもカルサイトの生成では H^+ が放出されるために、pH の上昇は抑制されると考えられる。実際に、実測および解析とも、 Ca^{2+} を含まない溶液でのウレアーゼ活性試験では pH は 9 まで達したのに対し、カルサイトが生成するシリンジ固化試験では 7 程度で推移している。ここで実測においては、カルサイト析出に伴う反応速度の低下に伴って反応に寄与する微生物量の低下、つまりウレアーゼ反応の減少により NH_4^+ の生成量が低下したため、pH 上昇が抑えられたことが推察される。しかしながら解析ではカルサイト析出による pH 低下の効果が抑えられたことで、むしろ pH は上昇した。この傾向の違いの要因の一つとして、解析では nutrient broth を考慮していないが、シリンジ固化試験では、nutrient broth を微生物が消費し、 CO_2 や有機酸を生成したことで pH が低下した可能性が考えられる。また解析反応場では、化学種や微生物の均一な分布を想定している。しかしながら、尿素分解とカルサイト析出は微生物細胞の近傍という極めて局所的な領域で生じており²⁵⁾、さらにシリンジ試験では、排出時に排液が混合されるために、反応場の pH 環境は今回の試験では適切に表現できていない。バイオグラウト実施工においては、対象地盤の pH の影響も考慮しなければならない場合も想定されるため、供試体の局所的な pH の分布特性の取得とともに、反応場の pH および各種成分の不均一性を想定した設定によって、マイクロレベルでの整合性を評価する解析手法の検討も必要であると考えられる。

8. まとめ

本研究では、尿素分解型バイオグラウトの開発に関する実験結果に基づき、微生物反応シミュレーションに用いる適切なパラメータの取得を目指すとともに、排出される Ca^{2+} 濃度を合わせることに重点を置き、再現解析を実施した。本研究で得られた知見を以下に示す。

- 1) ウレアーゼ活性試験の再現解析ならびに感度解析により、本試験で用いた *Pararhodobacter* sp. strain SO1 の尿素分解における反応速度定数 1×10^{-8} mol/mg/sec、半飽和定数 0.635 M が求められた。
- 2) シリンジ固化試験再現のための逐次解析において、反応に寄与する微生物量の変化を考慮した「調整指数」を導入することで、微生物添加量 1.0 g の場合に、排出される Ca^{2+} 濃度の変化を再現できた。

以上の知見から、実施工前に地盤材料を用いた固化試験ならびに微生物反応シミュレーションを行うことで、施工時の強度発現の予測や、施工管理に寄与できるものと考えられる。一方で、排出液の pH 変化については解析的な再現には至っておらず、さらに微生物添加 1.0 g 以外のケースでは初期微生物量の調整が必要となった。さらに、微生物の消費を記述することが困難な nutrient broth の取り扱い、溶液組成や pH 分布の不均一性の取り扱いなど、いくつかの課題も抽出された。今後、より多様な地盤やバイオグラウト施工条件に対応するためにも、そうした課題克服のための検証解析を進める必要がある。

参考文献

- 1) Danjo T., Kawasaki S.: Microbially induced sand cementation method using *Pararhodobacter* sp. strain SO1, inspired by beachrock formation mechanism, *Mater Trans*, Vol. 57, pp. 428–437, 2016.
- 2) 川崎 了, 村尾彰了, 広吉直樹, 恒川昌美, 金子勝比古: 微生物の代謝活動により固化する新しいグラウトに関する基礎的研究, *応用地質*, 第47巻, 第1号, pp. 2–12, 2006.
- 3) van Paassen, L.A., Harkes, M.P., van Zwielen G.A., van der Zon, van der Star, van Loosdrecht, M.C.M.: Scale up of BioGrout: a biological ground reinforcement method, *Proc. 17th Int. Conf. Soil Mech. Geotech. Eng.*, pp. 2328–2333, 2009.
- 4) Harkes, M.P., van Paassen, L.A., Booster, J.L., Whiffin, V.S., and van Loosdrecht, M.C.M.: Fixation and distribution of bacterial activity in sand to induce carbonate precipitation for ground reinforcement, *Ecol. Eng.*, Vol. 36, pp. 112–117, 2010.
- 5) 副島敏道, 今村 聡, 伊藤雅子, 寺尾 裕: 反応性地下水浄化壁による硝酸性窒素汚染地下水の原位置脱窒, *環境科学会誌*, 第15巻, 第4号, pp. 305–309, 2002.
- 6) 江種伸之, 平田健正, 川原恵一郎, 小沢哲史, 中杉修身: 原位置バイオレメディエーションによるテトラクロロエチレン汚染地下水の浄化実験, *水工学論文集* 第49巻, pp. 145–150, 2005.
- 7) 丸山裕嗣, 江種伸之, 平田健正, 川原恵一郎: 地下水循環併用型原位置バイオレメディエーションによる塩素化エチレン類の分解促進効果, *土木学会論文集 B1 (水工学)* 第70巻, 第4号,

- I_1117-I_1122, 2014.
- 8) 谷佳津治, 那須正夫: 環境中の微生物モニタリングバイオレメディエーションを例として, 環境技術, 第30巻, 第6号, pp. 435-440, 2001.
 - 9) 福永 栄: 深地層における微生物活性モデル化への展望, 日本微生物生態学会誌, 第23巻, pp. 4-17, 2008.
 - 10) 日本原子力研究開発機構: 地層処分技術調査等事業 高レベル放射性廃棄物処分関連処分システム化学影響評価高度化開発 報告書, 2012.
 - 11) 産業技術総合研究所: 平成24年度核燃料サイクル施設安全対策技術調査(放射性廃棄物処分安全技術調査等のうち地層処分に係る地質評価手法等の整備), 2013.
 - 12) Humphreys, P.N., West, J.M. and Metcalfe, R.: Microbial effects on repository performance, Quintessa QRS-1378Q-1, version 3.0., 2010.
 - 13) Parkhurst, D. L.: PHREEQC-A computer program for speciation, reaction-path, advective-transport, and inverse geochemical calculations, U.S. Geol. Surv. Water Resour. Invest. Rep., 95-4227, 143 pp, 1995.
 - 14) Bethke, C.M.: Geochemical and biogeochemical reaction modeling, Cambridge University Press, 2008, 543p.
 - 15) Allison, J. D., Brown, D. S., Novo-Gradac, K. J.: MINTEQA2/PRODEFA2, a geochemical assessment model for environmental systems, version 3.0 user's manual, US Environmental Protection Agency Report EPA/600/3-91/021, 1991.
 - 16) Jin, Q., and Bethke, C. M.: Predicting the rate of microbial respiration in geochemical environments, Geochim. Cosmochim. Acta, Vol. 69, No.5, pp. 1133-1143, 2005.
 - 17) Monod, J.: The growth of bacterial cultures, Ann. Rev. Microbiol., Vol.3, pp. 371-394, 1949.
 - 18) 鈴木 恵, 岸本直之, 一瀬 諭, 古田世子: 琵琶湖北湖における大型緑藻(車軸藻綱) *Staurastrum dorsidentiferum* var. *ornatum* の消長と増殖生理特性, 水環境学会誌, 第35巻, 第11号, pp. 181-186, 2012.
 - 19) Xu, X., Gao, B., Jin, B., Zhen, H., Wang, X., Dai, M.: Study of microbial perchlorate reduction: Considering of multiple pH, electron acceptors and donors, J Hazard Mater, Vol.285, pp. 228-235, 2015.
 - 20) Bethke, C.M., Sanford, R.A., Kirk, M.F., Jin, Q., and Flynn, T.M.: The thermodynamic ladder in geomicrobiology, Amer. Jour. Sci., Vol.311, pp. 183-210, 2011.
 - 21) 藤田賢大: バクテリア由来ウレアーゼの酵素活性評価, 2015年度卒業論文, 北海道大学, 2016.
 - 22) 島崎 傑: *Pararhodobacter* sp.を用いたサンゴ砂の固化試験に関する実験的研究, 2014年度修士論文, 北海道大学, 2015.
 - 23) 檀上 暁: ビーチロック形成機構に学ぶ人工岩の開発に関する基礎的研究, 2015年度博士論文, 北海道大学, 2016.
 - 24) Fidaeo, M. and Lavecchia, R.: Kinetic study of enzymatic urea hydrolysis in the pH range 4-9, Chem. Biochem. Eng. Q, Vol.17, No.4, pp. 311-318, 2003.
 - 25) Whiffin, V. S., van Paassen L. A., Harkes, M. P.: Microbial carbonate precipitation as a soil improvement technique, Geomicrobiol. J., Vol.24, pp. 417-423, 2007.
 - 26) Tobler, D.J., Cuthbert, M.O., Greswell, R.B., Riley, M.S., Renshaw, J.C., Handley-Sidhu, S. and Phoenix, V.R.: Comparison of rates of ureolysis between *Sporosarcina pasteurii* and an indigenous groundwater community under conditions required to precipitate large volumes of calcite, Geochim. Cosmochim. Acta Vol.75 No.11, pp. 3290-3301, 2011.
 - 27) MacLachlan, E., El Mountassir, G. and Lunn, R.J.: Use of bacterial ureolysis for improved gelation of silica sol in rock grouting, Géotech Lett, Vol.3, pp. 180-184, 2013.
 - 28) Tobler, D.J., Cuthbert, M.O. and Phoenix, V.R.: Transport of *Sporosarcina pasteurii* in sandstone and its significance for subsurface engineering technologies, Appl. Geochem., Vol.42, pp. 38-44, 2014.
 - 29) Mahanty, B., Kim, S., and Kim, C.G.: *Bacillus pasteurii* mediated ureolysis – a numerical approach for kinetic analysis, Int. J. Environ. Eng., Vol.1, Issue 2, pp. 41-47, 2014.
 - 30) Lauchnor, E.G., Topp, D.M., Parker, A.E. and Gerlach, R.: Whole cell kinetics of ureolysis by *Sporosarcina pasteurii*, J. Appl. Microbiol., Vol.118, pp. 1321-1332, 2015.
 - 31) Xu, T., Sonnenthal, E., Spycher, N., Pruess, K.: TOUGHREACT User's Guide: A simulation program for non-isothermal multiphase reactive geochemical transport in variably saturated geologic media, Earth Science Division, Lawrence Berkeley National Laboratory, University of California, LBNL-55460, p192, 2004.
 - 32) Medigan M.T., Parker J., Martinko, J.M., 室伏きみ子・関啓子訳, Brock 微生物学, オーム社, 2003, 1050p.
 - 33) 松田博貴: ドロマイト化作用と貯留岩性状, 地学雑誌, 第118巻, 第2号, 297-308, 2009.
 - 34) Rivasdenezra M. A., Párraga J., Delgado R., Ramos-Cormenzana A., Delgado G.: Biomineralization of carbonates by *Halobacillus trueperi* in solid and liquid media with different salinities, FEMS Microbiol. Ecol., Vol.48, pp. 39-46, 2004.
 - 35) 幸村基世, 長沼 毅: 炭酸塩岩と微生物, 環境バイオテクノロジー学会誌, 第8巻, 第1号, pp. 3-7, 2008.

(2017.3.31 受付)

Application of numerical simulation of microbial reaction to biogrout with ureolytic bacteria

Masaru AKIYAMA¹ and Satoru KAWASAKI²

1 Subsurface Environment Project Group, Geoscience Research Laboratory Co., Ltd.

2 Division of Sustainable Resources Engineering, Faculty of Engineering, Hokkaido University

Abstract

Reproduction of solidification process by biogrout with ureolytic bacteria was conducted using numerical simulation of microbial reaction for contributing to the environmental impact assessment and the proper construction design according to ground conditions in the practical utilization of the biogrout. Based on results of the urease activity measurement, the reaction rate constant and the half saturation concentration in the reproduction analysis was determined to 1×10^{-8} mol/mg/sec and 0.635 mol/L, respectively. Mineral precipitation in the simulation matched actual mineral precipitation in the syringe-scale solidification test under the constraint condition of calcite precipitation only. Multiple injection procedure of solidification solution contained urea were expressed by setting sequential analysis, in which the initial condition of the current analysis succeeds the amount of calcite in the previous step. In addition to that, the changes of Ca^{2+} concentration in outlet solution were reproduced by introducing the “adjustment exponent” in consideration of the decrease in the amount of active microorganisms. In that case, the correlation coefficient between the measured and analyzed values was 0.9232. The above results indicate that numerical simulation of microbial reaction related to calcite precipitation can reproduce the reaction process of biogrout with ureolytic bacteria, and can predict the strength development and construction management at the time of biogrout construction.

Key words: biogrout, numerical simulation, urea, urease, ureolytic bacteria