深海域を対象とした微生物触媒法による炭酸塩析出促進技術に関する実験的検討

畠 俊郎¹・手計 千恵美²

¹正会員 富山県立大学准教授 大学院環境工学専攻 (〒939-0398 富山県射水市黒河5180)

E-mail: t-hata@pu-toyama.ac.jp

²非会員 富山県立大学 工学部環境工学科 (〒939-398 富山県射水市黒河5180)

E-mail: chiemi1212@pu-toyama.ac.jp

日本近海の深海域に存在する新エネルギー・金属資源の将来的な利用に関連し、原位置に既に生息している微生物の機能を活用することで鉱物の析出を促進させ深海表層堆積物の固化効果を得る原位置地盤改良技術の可能性について検討した。富山湾内において海洋調査船を用いて海水面から水深750mまでの海水サンプルを採取し、室内で馴培を行った後に炭酸カルシウム析出促進試験を実施した。その結果、(1)1ヵ月程度の事前培養で海洋表層・深層水由来のウレアーゼ産出微生物活性を高めることができる、(2)海洋表層・深層水由来のウレアーゼ産出微生物を用いることで炭酸カルシウムの結晶析出効果が期待できる、ことが明らかとなった。

Key Words : mineral resources, deep-sea microorganisms, biocementation, construction technology

1. はじめに

日本の領海+EEZ (Exclusive Economic Zone : 排他的経済水域) の面積は世界第6位であるとともに、豊富な鉱物資源およびエネルギー資源を有していることが明らかとなっている¹⁾。近年、日本近海の新しいエネルギー資源としてメタンハイドレートへの関心が高まるとともに、資源としての利用に向けた技術開発が進められている²⁾。これまでに行われたBSR(Bottom Simulating Reflector : 海底疑似反射面)の調査結果に基づいた分布予想の結果から、南海トラフをはじめとし、日本近海の広範囲にメタンハイドレートが分布していることが明らかになるとともに、調査結果に基づいて以下に示す4種類に分類されている³⁾。

- ・詳細調査により海域の一部に濃集帯が存在
- ・濃集帯を示す特徴が海域の一部に認められる
- ・濃集帯を示唆する特徴が無いもの
- ・調査データが少ないもの

このうち、濃集帯の存在を確認もしくは特徴が認められた面積は約66,000km²とされる。メタンハイドレート固体の1m³分は、分解・気化した場合に約155m³のメタンガスに相当することから新しいエネルギー資源としての有効利用に関する検討が進められている⁴⁾。

ここでは、濃集帯を示す特徴が海域の一部に認められる富山湾近海に着目し、メタンハイドレートの掘削等に

伴い発生が危惧される環境工学的課題を微生物機能により解決する新しい原位置地盤改良技術の可能性について検討する。

2. 海底資源開発と環境工学的課題

メタンハイドレートとは、「海底や永久凍土地帯など特定の温度・圧力条件下で存在し、水分子のかご状格子の中に主にメタンの気体分子が取り込まれたシャーベット状のガス水和物。」と定義される⁵⁾。このメタンハイドレートの海底における安定領域は、水深として350m~1150m程度かつ、水温として0℃~15℃程度までとされている⁶⁾。メタンハイドレートの開発においては、海底資源掘削において多くの実績を有する在来型の海洋石油・天然ガス開発とは異なる環境工学的課題が指摘されている⁷⁾。このメタンハイドレート開発に特徴的な環境工学的課題としては、1)メタンハイドレートの分解・溶解に伴い発生するメタンガス漏洩対策、2)メタンハイドレートの分解・生産等に伴う地層内の圧力状態変化に起因する地層変形、があげられる。海底からのメタンガス放出が地球温暖化に影響を与えるとの報告もあることから、メタンハイドレート上部に存在する表層堆積物等を使ったトラップが必要と考えられる⁸⁾、地層変形に関しては、海底メタンハイドレートの分解・大量崩壊に起因

する堆積物の力学的強度の低下や間隙水圧の上昇が海底地すべりを誘発すると考えられている⁹⁾。メタン漏えいや地層変形の抑制に現地に既に存在している表層堆積物を活用することができれば、海底資源開発に伴う費用の削減や微生物生態系を含む周辺環境へ与える影響の少ない低環境負荷の環境保全技術が可能となる。

3. 深海表層堆積物を対象とした固化技術の概要

深海底における資源開発に伴う環境工学的課題の解決には、深海底に存在する表層堆積物の固化が重要と考えられる。このような表層堆積物を対象とした既存の固化技術としては、河口域およびため池などを対象として1) 普通ポルトランドセメントおよびマグネシウム系の固化剤を用いる方法¹⁰⁾、2) シリカコロイド溶液と微生物代謝を利用する方法¹¹⁾、等が提案されている。

一方、本研究で対象としている深海域は低温、高水圧、貧栄養であるとともにpHが8.0程度と特殊であることに加え、表層から深海に至るまでおおむね $1.0 \times 10^5 \sim 1.0 \times 10^6$ cells/mLの微生物が存在することが知られている¹²⁾。この海洋微生物の中にはペプトンを添加することで表層堆積物の強度増進に寄与すると考えられる炭酸カルシウムの析出能力を持つものが存在することが明らかとなっている¹³⁾¹⁴⁾。しかしながら、肉眼で結晶物が確認されるまで6週間以上必要となることから、工学的利用にはより短期間で炭酸カルシウムの結晶化が期待できる微生物機能を新たに選定する必要があると考えられる。

炭酸カルシウムにより短期間で固化効果を得る技術としては、主に砂地盤を対象としてMicrobaila Carbonate Precipitation(MCP)に関する研究が進められている¹⁵⁾。MCPにおける炭酸カルシウム析出メカニズムを式(1)、(2)に示す。

微生物由来の酵素(ウレアーゼ)を用い、尿素の加水分解に伴い発生する炭酸イオンを利用してカルサイトを砂地盤の間隙中に析出させることで強度増進効果を得ている。本研究では、このMCP技術の深海域への適用性について検討することとした。具体的には、海洋表層、深層水を採取して炭酸塩析出促進能をもつ微生物を対象

とした集積培養および炭酸カルシウム析出試験を実施して深海域を対象とした新しい原位置地盤改良技術としての可能性を明らかにすることとした。

4. 富山湾深海域を対象とした現地調査

深海域を対象としたMCPによる炭酸塩析出促進に基づく新しい原位置地盤改良技術としての可能性評価に関連し、富山湾内の水深1,000mの海域(メタンハイドレートが安定して存在可能とされる深度)を調査地点として選定した。

調査地点のGPS座標を表-1に示す。深海域とあわせて河口および海水・河川水の混合域の計3か所を選定した。なお、調査は2013年7月27日に富山高等専門学校練習船若潮丸を用いて実施し、海洋表層・深層水のサンプリングとあわせてCTD観測を行った。CTD観測項目としては、各水深における海水の特性把握を目的として海水温、溶存酸素濃度および電気伝導度を、植物プランクトンの活性や生物量の鉛直分布把握を目的としてクロロフィル濃度を選定し、水深方向に連続的に測定することとした。

(1) 調査地点No.1のCTD観測結果

調査地点No.1におけるCTD観測結果を図-1(海水温および溶存酸素濃度)および図-2(電気伝導度およびクロロフィル濃度)にそれぞれ示す。海水温については、夏季の調査にもかかわらず水深350mで約1.5℃とメタンハイドレートが安定して存在可能と考えられている温度条件を満たしていることが明らかとなった。溶存酸素濃度は5.9~7.4mg/L(平均値=6.6mg/L)となった。水深350m以深の電気伝導度は30mmho/cm程度で安定しているとともに、クロロフィル濃度は水深40m付近を最大値を示して以降低下し、水深150m以深では0.06 μg程度とほぼ一定の値を示した。

(2) 海水サンプルを対象とした室内分析結果

室内分析に用いる海洋表層水は船上からバケツにて直接採取、海洋深層水(水深350mおよび750m)はCTD採水器から採取することとした。海洋表層水、海洋深層水サンプルともに船上でガンマ線滅菌済の容器に採取し、4℃のポータブル冷蔵庫内で保管し実験室へ持ち帰った。室内分析の前処理として、持ち帰った海洋表層水、海洋深層水ともにクリーンベンチ内で水質分析用(0.20 μmのメンブレンフィルターでろ過後冷蔵)、遺伝子解析用(冷凍庫にて-80℃保管)、および微生物培養用(冷蔵庫にて4℃保管)に分け保存することとした。分析項目はpH、カルシウムイオン濃度および海洋微生物数とし、pHはガラス電極、カルシウムイオン濃度は原子吸光光度計、海洋細菌数はZobel 2216E培地を用いた培養により測定す

表-1 調査地点諸元

地点名	GPS座標	コメント
No.1	36°53.040N 137°10.127E (表層, 水深350mおよび水深750m)	深層水サンプリング
No.2	36°48.264N 137°14.991E (表層)	河口域 (神通川河口)
No.3	36°48.352N 137°11.292E (表層)	河川水・海水混合域

ることとした。室内分析の結果を表-2に示す。分析の結果から、富山湾周辺の日本海で採取した海水（表層水および深層水）はpH=8.0であり、川崎らにより炭酸カルシウムの析出に適した環境として報告されている条件を満たしていることが明らかとなった¹⁶⁾。また、カルシウムイオン濃度は500mg/L程度でおおむね一定であった。北海道で採取した酸性土を対象として炭酸カルシウムの析出試験を行った既往の研究結果から、400mg/L程度のカルシウムイオンが含まれている場合に微生物機能による炭酸塩の析出効果が期待できることが明らかとなっている¹⁷⁾。そのため、塩化カルシウムなどのカルシウム源を添加することなく海水由来のカルシウムイオンのみを用いて原位置でカルサイトを析出させる効果が期待できる。一方、海洋細菌数については海洋表層水が $1.0\text{E}+04 \sim 1.0\text{E}+05\text{cells/mL}$ であることにに対し、水深が深くなるにつれて菌数が減少する傾向が認められた。菌数は少なくなるものの、水深750mで $3.05\text{E}+02\text{cells/mL}$ の微生物が生息していることが確認されたため、ウレアーゼ活性を持つ微生物を対象とした馴養を行うこととした。

5. 目的微生物を対象とした集積培養

(1) 集積培養の概要

富山湾内にて採取した海洋表層水および深層水を対象

図-1 調査地点No.1におけるCTD観測結果
(海水温および溶存酸素濃度)

図-2 調査地点No.1におけるCTD観測結果
(電気伝導度およびクロロフィル濃度)

とし、炭酸カルシウム析出促進効果が期待されるウレアーゼ活性を有する微生物の集積を目的とした培養を行うこととした。集積培養の流れを図-3に示す。海洋微生物由来のウレアーゼ活性の変化は、アンモニウムイオン濃度をイオンクロマトグラフ(PIA-1000 島津製作所製)で定期的に測定することで間接的に評価することとした。

培養期間はおおむね1ヵ月とし、既往の研究を参考に尿素の加水分解由来と考えられるアンモニウムイオン濃度が40mg/Lを超えたものについて「微生物由来による尿素の加水分解効果が期待できる。」と判断することとした¹⁸⁾。効果が期待できると判断されたサンプルについて培養前後の微生物群集構造をPCR-DGGE法で比較するとともに、集積培養後のサンプルを対象としたウレアーゼ活性の測定を行った。なお、ウレアーゼ活性の測定はWhiffinの方法に準拠することとした¹⁹⁾。また、PCR-DGGE法の解析手順は環境水を対象とした同様の解析を実施している既往の文献を参考とし、ゲル濃度を30から60%に変更し、泳動槽としてバイオ・ラッド社製のD-codeを用いる条件で実施した²⁰⁾。

(2) 集積培養試験の結果および考察

海洋表層水を対象とした培養期間中におけるアンモニウムイオン濃度の推移を図-4に、海洋表層から深層にかけて採水した調査地点No.1におけるアンモニウムイオン濃度の推移を図-5にそれぞれ示す。なお、図中に示した

表-2 室内分析方法および結果一覧

地点名	pH (-)	カルシウムイオン濃度(mg/L)	海洋細菌数(cells/mL)
No.1	8.1	500	$8.42\text{E}+05$
No.1-1 (水深350m)	7.8	630	$4.69\text{E}+03$
No.1-2 (水深750m)	7.9	660	$3.05\text{E}+02$
No.2	8.5	490	$4.69\text{E}+04$
No.3	8.3	550	$3.65\text{E}+03$

※pHはガラス電極法

カルシウムイオン濃度は原子吸光度計

海洋細菌数の計測にはZobell 2216E培地を用いた

図-3 集積培養試験フロー

アンモニウムイオン濃度は微生物を添加していない試験区（コントロール）の測定値を差し引いた値とし、微生物機能由来のアンモニウムイオン濃度増分のみを表すこととした。海洋表層水については採水箇所3カ所すべてにおいて培養日数の増加に伴いアンモニウムイオン濃度の増加が確認された。最大値はNo.3の41.2mg/Lとなった。深度方向については、水深750mのNo.1-2について培養開始31日で目標とする40mg/Lを超えるアンモニウムイオンの生成が確認された。そのため、すべての試験区についてウレアーゼ活性を測定することとした。

集積培養後の各試験区を対象として測定したウレアーゼ活性値を表-3に示す。表中にはウレアーゼ活性を有するとともに炭酸カルシウムの析出促進効果が確認されている2種類の微生物について測定した値も合わせて示した。なお、表中に示した酵素活性値は微生物を添加していない試験区（コントロール）の値を除いて求めた値とし、微生物機能由来の酵素活性値のみを表すこととした。測定の結果から、集積培養31日後で最も高いアンモニウムイオン濃度を示したNo.1-2(水深750m)のウレアーゼ活性値が最も高くなった。しかしながら、陸域由来の *Bacillus pasteurii* の1/7程度、海域由来の *Sporosarcina aquimarina* の1/2程度に留まる結果となった。砂地盤の固化に関して検討が進められている既知の微生物より低い酵素活性ではあるものの、現地の海水中に既に生息している微生物のみで炭酸カルシウムの析出促進効果が期待できることから、環境負荷の小さい深海域を対象とした新しい環境保全技術としての可能性が明らかとなった。

集積培養前後の微生物群集構造比較を目的として実施したPCR-DGGE法による解析結果を図-6に示す。初期（海洋表層・深層水そのもの）と比較し、集積培養を行うことでバンドパターンの変化及び検出されるバンド数が増加する傾向が認められた。以上より、尿素溶液と海洋表層・深層水を混合・培養することで微生物群集構造を変化させ炭酸カルシウム析出能力を持つ集積培養系を得る効果を明らかにすることができた。

6. 混合培養系を用いた炭酸カルシウム析出試験

5.での検討結果から、海洋表層・深層水由来のウレアーゼ活性を有する混合培養系を得ることができた。この混合培養系を用いた炭酸カルシウム析出試験を実施し、海洋表層・深層水由来の微生物群集を用いた炭酸カルシウム析出試験を実施することとした。

(1) 炭酸カルシウム析出試験の概要

炭酸カルシウム析出試験では、海洋表層・深層水由来の微生物群集（集積培養系）による結晶析出量、形状および炭酸カルシウム種について検討することとした。試

図-4 海洋表層水に関する比較結果

図-5 深度方向に関する比較結果（調査地点No.1）

表-3 ウレアーゼ活性値一覧

名称	ウレアーゼ活性値	単位
<i>Bacillus pasteurii</i>	566	U/L
<i>Sporosarcina aquimarina</i>	146	
No.1	49	
No.1-1	51	
No.1-2	78	
No.2	53	
No.3	51	

験フローを図-7に示す。なお、今回の実験では水圧の影響は考慮せず大気圧で実施することとした。既往の研究から沿岸域における砂地盤の炭酸カルシウム析出に適した固化溶液組成（表-4参照）を選択し、液体培養で水溶液中に炭酸カルシウムの結晶を析出させることとした²¹⁾。培養期間は34日とし、定期的にアンモニウムイオン濃度およびカルシウムイオン濃度を測定することとした。なお、イオン濃度の測定にはイオンクロマトグラフ(PIA-1000 島津製作所製)を用いた。培養後は超音波洗浄機により滅菌済遠沈管表面の析出物を剥離・回収し表面観察（光学顕微鏡および電子顕微鏡(SEM)）、結晶同定(XRD)および析出物から抽出したDNAを対象とした次世代シーケンサーによる微生物群集構造解析を実施した。なお、X線回折(XRD)にはMiniflex（(株)理学製）、表面観察にはVE-7800（(株)キーエンス製）、微生物群集構造解析にはMiseq（イルミナ(株)製）をそれぞれ用いた。

図-6 PCR-DGGE解析結果

表-4 固化溶液組成一覧

薬品名	量
Nutrient Broth	1.50g
NH ₄ Cl	5.00g
NaHCO ₃	1.06g
CO(NH ₂) ₂	9.00g
CaCl ₂	16.65g
人工海水(pH=8.3)	500mL

図-7 炭酸カルシウム析出試験フロー

(2) 炭酸カルシウム析出試験の結果および考察

試験期間中におけるアンモニウムイオンおよびカルシウムイオン濃度の推移を図-8, 9に, 試験終了後の沈殿物重量を表-5にそれぞれ示す。以下, 項目ごとに考察する。

図-8 アンモニウムイオン濃度の推移 (析出試験)

図-9 カルシウムイオン濃度の推移 (析出試験)

尿素の加水分解由来と考えられるアンモニウムイオン濃度については, 集積培養後に最も高いウレアーゼ活性を示したNo.1-2が培養開始14日後からほぼ一定の値となった。そのほかの試験区は培養開始から21日程度までアンモニウムイオン濃度の上昇が継続しているため, 試験終了時におけるアンモニウムイオン濃度はNo.1-2が最も低い値となった。結晶析出促進に利用されるカルシウムイオン濃度については, すべての試験区で培養日数とともに低下する傾向が認められた。アンモニウムイオン濃度が培養開始から14日ではほぼ一定となったNo.1-2については, 供給される炭酸ガス濃度の低下由来と考えられるカルシウムイオン濃度の減少量低下が認められた。ろ過後の析出物を105℃×24時間の条件で乾燥後に測定して求めた表-5に示す析出物重量についても, アンモニウムイオン濃度およびカルシウムイオン濃度の推移を反映してNo.1-2が最も少ない値となった。

以上より, 海洋表層・深層水由来の微生物群集を用いることで, 水圧の影響を考慮しない条件において深海底表層堆積部中に炭酸カルシウムの結晶を析出させる効果が期待できる結果が示された。

試験終了後の析出物を対象とした光学顕微鏡および電子顕微鏡(SEM)による表面観察の結果を写真-1～3に示す。なお, 表面観察は水深が炭酸カルシウムの結晶に与える影響について検討することを目的とし, 調査地点No.1 (表層), No.1-1 (水深350m), No.1-2 (水深750m) の3

サンプルについてのみ実施することとした。光学顕微鏡による観察では、粒子径の把握を目的として1mmメッシュのプレパレート上にサンプルを設置する条件で撮影を行った。光学顕微鏡およびSEMによる表面観察の結果から、 μm サイズからmmサイズまでの結晶が析出していることが明らかとなった。光学顕微鏡による表面観察の結果から、炭酸カルシウム析出量がもっとも少なかったNo.1-2(水深750m)は小さな結晶が複数集まる形で1mm大の結晶が形成されていることが明らかとなった。一方、No.1(表層), No.1-2(水深350m)では100 μm を超えるサイズの結晶が多く認められた。

この海洋表層・深層水由来のウレアーゼ活性を持つ微生物により析出された炭酸カルシウム種の同定を目的とし、X線回折(XRD)を実施した。なお、分析条件はX線: Cu30KV/15mA, 走査範囲: $4^{\circ}\sim 60^{\circ}$, 走査モード: 連続, ステップ角度: 0.02° , スキャンスピード $4^{\circ}/\text{min}$ とした。結果を図-10に示す。検出されたピークの同定結果から、採水深度に関係なくすべてのサンプルでカルサイトが主成分であることが明らかとなった。水深が浅いほどピー

クが鋭くかつ強度も増すことから、水深が深くなるにつれて結晶サイズが小さくなるか、特定の結晶への配向を示す傾向があると考えられる。なお、今回の実験では同一組成の固化溶液を用いるとともに、水圧の影響を考慮しない条件で実施していることから、結晶サイズおよび配向が異なった主要因としては炭酸カルシウムの析出に關与する酵素特性もしくは酵素の加水分解速度が考えられる。XRDの回折パターンから主成分が同じカルサイトであるにも関わらずその結晶サイズおよび配向が水深により異なる傾向が認められた。この原因として微生物種に着目し、炭酸カルシウム析出促進に關与する微生物群集構造の詳細な比較を目的として次世代シーケンサーによる解析を実施した。解析の結果キメラと判定されなかったリード数の比較結果を表-6に示す。

集積培養前、炭酸カルシウム析出試験後ともに水深が深くなるにつれてリード数が減少する傾向が認められた。いずれの地点においても炭酸カルシウム析出試験後に検出されたリード数が10倍以上に増加していることから、

表-5 析出物重量一覧

試験区名	析出物量(g)
No.1	0.4899
No.1-1	0.4246
No.1-2	0.2119
No.2	0.3747
No.3	0.3260

写真-1 表面観察結果(No.1)

写真-2 表面観察結果(No.1-1)

写真-3 表面観察結果(No.1-2)

図-10 X線回折結果(強度評価)

表-6 シーケンシング結果一覧(リード数)

地点名	種類	リード数
No.1	海洋表層水	4,666
	析出試験後	6,4917
No.1-1	海水深層水(水深 350m)	1,126
	析出試験後	4,4928
No.1-2	海洋深層水(水深 750m)	1,066
	析出試験後	2,1559

0.15mol/L濃度の尿素溶液を用いた集積培養の有効性が明らかとなった。キメラと判定されなかったリードについて、門レベルで構成比率を比較した結果を図-11に示す。培養前のサンプルについては、全体的にProteobacteriaの比率が高いものの、表層水と深層水(水深350mおよび750m)で異なる結果となった。具体的には、表層水では特異的にCyanobacteriaが検出されるとともに、Bacteroidetes, およびActinobacteriaの比率が高くなる傾向が認められた。Cyanobacteriaが特定の検出された理由としては、表層水は太陽光が到達する範囲であるためと考えられる。炭酸カルシウム析出試験後についても、培養前と同様に表層水と深層水(水深350mおよび750m)で異なる結果となった。表層水については、Firmicutesの比率が特異的に増加したのに対し、深層水(水深350mおよび750m)ではキメラと判定されなかったリードのほとんどがProteobacteriaであった。以上より、0.15mol/L濃度の尿素溶液による集積培養を事前に行うことで水深にあわせて尿素の加水分解に伴い発生する二酸化炭素を利用した炭酸カルシウムの析出促進に寄与する集積培養系を得る効果が明らかとなった。

図-11 構成微生物群比率の比較結果 (門レベル)

微生物機能による炭酸カルシウム析出促進効果が報告されている*Bacillus pasteurii*, *Sporosarcina aquimarina*近縁の微生物が存在するかどうかの評価を目的とし、キメラと判定されなかったリード数に対して5%以上を占める頻度で検出された科を抽出することとした。結果を表-7に示す。なお、表中では検出頻度に応じて5~10%, 10~15%, 15~20%, 20~25%, 25%以上の5段階で表すこととした。表層水については炭酸カルシウム析出試験後の析出物に炭酸カルシウムの析出促進による強度増進効果が報告されているBacillaceaeと、Xanthomonadaceaeが増加する傾向を確認することができた。一方、深層水(水深350mおよび750m)については、CTD採水器から回収された海水そのものに含まれる微生物の多くがEnterobacteriaceaeであることが明らかとなった。析出物試験後については、初期の海水中で5~20%の頻度で検出されたMicrococcaceae等の微生物が減少し、25%以上の頻度で検出される微生物はEnterobacteriaceaeのみとなった。本研究では、海洋表層・深層水を対象として同じ条件で集積培養、同じ組成の固化溶液を用いた炭酸カルシウム析出試験を行っている。しかしながら、炭酸カルシウム析出試験の結果から得られた析出物重量は表-5に示したとおり海洋表層から深層に向かうにつれて減少する傾向が明らかとなっている。以上の原因として、海洋表層と深層では炭酸カルシウムの析出に寄与する微生物種が異なることが次世代シーケンサーを用いた解析の結果から明らかとなった。海洋深層水において優先化が認められたEnterobacter科由来の海洋微生物による炭酸カルシウム生成については、信濃によりその関与が指摘されている¹⁴⁾。しかしながら、尿素の加水分解にともない発生する二酸化炭素を利用した炭酸カルシウム析出に直接関与する微生物種の同定までは行われていない。そのため、集積培養系からの有用微生物の単離などを通じて詳細なメカニズムを明らかにしていく必要があると考えられる。

表-7 5%以上の頻度で検出された科レベル一覧

	表層水 (No.1)		水深350m (No.1-1)		水深750m (No.1-2)	
	海水	析出試験後	海水	析出試験後	海水	析出試験後
Micrococcaceae	◎	◎	△		●	
Bacillaceae		◎				
Phyllobacteriaceae	◎		△		○	
Enterobacteriaceae	△	▲	◎	◎	◎	◎
Pseudomonadaceae			▲			
Xanthomonadaceae		●	▲			

※▲5~10%, △10~15%, ●15~20%, ○20~25%, ◎25%以上

7. まとめおよび今後の課題

本研究では、日本近海の深海域に存在するエネルギー資源の有効活用に関連し、海水中にすでに生息している微生物の機能を活用することで深海表層堆積物を固化させる新しい環境保全技術としての原位置地盤改良技術について検討した。富山湾内にて海洋調査船を用いて海洋表層・深層水を採水するとともに、尿素の加水分解活性を利用した炭酸カルシウム析出能力について2種類の室内試験を実施した結果から新技術としての可能性を明らかにした。その結果、0.15mol/L濃度の尿素溶液を用いた集積培養を行うことで富山湾内にて採取した海洋表層・深層水由来の海洋微生物由来のウレアーゼ活性を高める効果を明らかにすることができた。しかしながら、集積培養後のウレアーゼ活性は同じく炭酸カルシウムの析出を促進させることで砂地盤の固化効果を得るMicrobial Carbonate Precipitation (MCP)に用いられている既知の単離微生物と比較して1/2~1/7程度となった。この集積培養系を用い、海水圧の影響を考慮しない条件での海洋中における炭酸カルシウムの析出促進試験を実施した。その結果、採水箇所および採水深度により値は異なるものの、固化溶液を添加しておおむね1ヶ月培養することで炭酸カルシウムを析出させる効果を確認することができた。この炭酸カルシウムの析出に寄与する微生物群を明らかにすることを目的とし、次世代シーケンサーを用いた微生物群集構造解析を実施した。その結果、海洋表層水については炭酸カルシウムの析出促進処理を行うことで全微生物群集中において既知のウレアーゼ活性陽性微生物を含む*Bacillus*科の比率が高まる傾向が認められた。一方、水深350mおよび750mで採水した海洋深層水については、既往の研究において炭酸カルシウムの析出促進への関与が示唆されている*Enterobacter*科の比率が高まる傾向が認められた。この2種類の室内試験結果から、海洋微生物の機能を活用することで炭酸カルシウムの析出を促進させる効果が明らかとなり、提案技術の基本的有効性を明らかにすることができた。今回の試験では、実験装置の制約から海水圧の影響を再現することができていない。また、サンプリング装置の制約から深海表層堆積物そのものの採取も行えていない。そのため、海水圧が結晶形状および配向に与える影響の検証や、海水とは異なり各種元素を含む深海底表層堆積物そのものの固化能力評価は今後の課題となった。今後は、深海底表層堆積（もしくは同様の物理・化学特性を持つ疑似堆積物）を対象とした固化実験を実施して強度増進効果を明らかにしていきたい。あわせて、水温・水圧の関係でハイドレート化することなく、深海底からメタンガスが湧出している海域を計量魚群探知機を用いた音響観測により特定する探査技術などと組み合わせ²⁰⁾、目的とする場所で効率的に

固化効果を得る新しい環境負荷低減型の環境保全技術（地層変形抑制や漏洩メタン回収等）としての実用化を目指していきたい。

謝辞：本研究の実施にあたり、海洋調査船の利用について富山高等専門学校千葉元教授にご協力いただいた。また、本研究の一部は日本学術振興会科学研究費補助金「基盤研究(B) (課題番号：23360207, 研究代表者：畠俊郎)の支援を受けて実施した。末筆ながらここに記して、謝意をあらわさせていただく。

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) (社)日本船舶海洋工学会海中技術研究委員会：海中技術シリーズ1 海洋底掘削の基礎と応用, pp. 2-6, 2010.
- 3) 田中彰一：我が国におけるメタンハイドレート資源化への努力－メタンハイドレート資源開発研究コンソーシアムによるフェーズ1の研究成果, 石油技術協会誌, Vol. 76, No. 2, pp. 114-127, 2011.
- 4) 佐藤幹夫, 前川竜男, 奥田義久：天然ガスハイドレートのメタン量と資源量の推定, 地質学雑誌, Vol. 102, pp. 959-971, 1996.
- 5) 地学団体研究会 新版地学辞典編集委員会：新版地学辞典, pp. 239, 1996.
- 6) 蒲生俊敬：地球科学講座 7 環境の地球科学, pp. 167-177, 2007.
- 7) 上田聡, 栗島裕治, 真鍋英男：メタンハイドレート生産時の環境影響評価のための総合モニタリングシステムの開発－フェーズ1の成果概要－, IHI 技報, Vol. 49, No. 4, pp. 219-224, 2009.
- 8) Westbrook, G. K., et al. : Escape of methane gas from the seabed along the West Spitsbergen continental margin, *Geophysical Research Letters*, Vol. 36, No. 15, L15608, 2009.
- 9) McIver, R. D. : Role of naturally occurring gas hydrates in sediment transport, *AAPG Bull.*, Vol. 66, pp. 789-792, 1982.
- 10) 森口朗彦, 高木儀昌, 山野井英夫：養殖場底泥固化体のアマモ着生基質としての再利用工法に関する実海域実証試験, 海洋開発論文集, Vol. 23, pp. 417-422, 2007.
- 11) 清田佳奈, 村上章, 川崎了：農業用ため池底泥のバイオ固化処理に関する基礎的研究, 応用地質, Vol. 50, No. 2, pp. 70-78, 2009.
- 12) 大和田紘一：海洋微生物の測定, 多様性と其の利用, 日本海水学会誌, Vol. 51, No. 5, pp. 309-313, 1997.
- 13) 信濃晴雄, 坂井稔：炭酸カルシウムの沈積に関与する海洋細菌に関する研究－I, 天然海水および人工海水培地に沈積する炭酸カルシウム, 日本水産学会誌, Vol. 35, No. 10, pp. 1001-1005, 1969.
- 14) 信濃晴雄：炭酸カルシウムの沈積に関与する海洋微生物に関する研究－II, 海水由来分離菌株からの検出および結晶生成に関与する最近の主要形態学的性状による群別, 日本水産学会誌, Vol. 389, No. 7, pp. 717-725, 1972.
- 15) Qabany, A. A., Soga, K. and Santamarina, J. C. : Factors

- Affecting Efficiency of Microbially Induced Calcite Precipitation, *Journal of Geotechnical and Geoenvironmental Engineering*, Vol. 138, No. 8, pp. 992-1001, 2012.
- 16) 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, Vol. 47, No. 1, pp. 2-12, 2006.
 - 17) 畠俊郎, 中條邦英, 畠山正則, 阿部廣史: 微生物による酸性土壌中和促進技術(その1)～室内実験による能力評価～, 第48回地盤工学研究発表会, CD-ROM, 論文番号1105, 2013.
 - 18) 中澤聡美, 畠俊郎: 微生物機能の活用による新しい表土保護・土地の緑化技術に関する研究, 平成23年度土木学会中部支部研究発表会, CD-ROM, 論文番号VI-003, 2012.
 - 19) Whiffin, V. S.: Microbial CaCO_3 precipitation for the production of biocement, Ph. D. dissertation, Murdoch University, Perth, Australia, pp. 145-149, 2004.
 - 20) 畠俊郎, 桑野玲子, 阿部廣史: 微生物機能を用いた原位置透水性制御手法に関する基礎的検討, 土木学会論文集G, Vol. 64, No. 2, pp. 168-176, 2008.
 - 21) 畠俊郎, 横山珠美, 阿部廣史: 尿素加水分解速度に基づく微生物固化技術の沿岸域への適用性評価, 地盤工学ジャーナル, Vol. 8, No. 4, pp. 505-515, 2013.
 - 22) 青山千春, 松本良: 計量魚群探知機によるメタンプルームの観測とメタン運搬量の見積もり, 地学雑誌, Vol. 118, No. 1, pp. 156-174, 2009.

(2014. 4. 16 受付)

EXPERIMENTAL STUDY ABOUT THE IN-SITU CARBONATE PRECIPITATION TECHNOLOGY BY THE MICROBIAL CATALYST METHOD FOR DEEP SEA AREA

Toshiro HATA and Chiemi TEBAKARI

The Japanese deep sea waters contain several recently discovered energy and mineral resources, such as methane hydrate and hydrothermal vents. This study examined the feasibility of in-situ ground improvement technologies for promoting precipitation of minerals based on in-situ microbial functions. The study also examined the solidification effect of deep-sea surface sediments. We sampled seawater from sea surface level to a depth of 750 m in the Toyama Bay using an oceanographic ship and carried out two types of calcium carbonate precipitation tests. The main findings of this research are as follows: (1) the population of urease-producing bacteria from sea surface to deep sea waters can enhance the 1-month cultivation and (2) these bacteria can accelerate the calcite precipitation.