海底地盤の液状化対策としての微生物固化技術の適用性評価

畠 俊郎¹・阿部 廣史²

¹ 正会員 富山県立大学准教授 工学部環境工学科
(〒939-0398 富山県射水市黒河 5180)
E-mail: t-hata@pu-toyama.ac.jp

² 正会員 USS 研究所 (前長野工業高等専門学校教授 環境都市工学科)
(〒380-0917 長野市稲葉南俣 26412)

波浪による海底パイプラインの浮上や、海底砂地盤の液状化による海底地すべり等の災害が報告されている。加えて、新しいエネルギー資源として注目されているメタンハイドレートの生産においても表層地盤の崩壊が危惧されるなど海底地盤を対象とした防災技術の重要性が高まっている。本論文では、海底砂地盤の液状化現象に着目し、底泥および海水中に既に生息している微生物の機能を活用して砂の間隙中に炭酸カルシウムを析出させることにより、低環境負荷で液状化強度改善効果を得る新しい原位置地盤改良技術に着目した。本文では、富山・新潟県境付近の海底で採取した底泥中に生息しているウレアーゼ活性陽性微生物の働きを高め、豊浦砂表面にカルサイトを析出させることで液状化強度を改善する微生物固化技術の有効性について検討した結果を報告する。

Key Words : *In-situ microorganism, liquefaction, urease activity, ground improvement*

1. はじめに

地震発生に伴い発生する地盤の液状化現象に対する社会的関心が高まっている。この液状化現象は臨海部のみならず海底地盤でも確認されており、発生要因として波浪の作用が指摘されている¹⁾。地震と波浪の発生頻度を比較した場合、波浪のほうが大きいことは明らかであり、周辺を海に囲まれた我が国においては地震のみならず波浪による地盤についても液状化対策を進めていく必要がある。陸域と異なり、海底地盤の液状化では、地盤のすべり破壊、海底パイプラインの浮上、捨石や消波ブロックの沈下など様々な災害が危惧される²⁾³⁾。加えて、新たなエネルギー資源として着目されているメタンハイドレート開発においても、ガスの湧出に伴う海底地盤の攪乱由来の地盤強度低下⁴⁾や、細粒分の流出による地盤変状・表層地盤崩壊が懸念される⁵⁾など、海域を対象とした地盤強度増進（地盤改良）技術の重要性は今後ますます高まるものと考えられる。

本研究では、このような背景のもと海洋の窒素サイクル等を利用することでセメント等の人工物の持ち込みを可能な限り減じるとともに、海域の生態系に与える影響を抑えた条件での地盤強度増進効果が期待できる微生物固化技術に着目した。微生物固化技術では陸域由来で高

いウレアーゼ活性を持つ菌株分譲機関登録微生物 (*Bacillus pasteurii*, ATCC11859) を中心に炭酸カルシウム析出速度や強度増進効果に関する検討⁶⁾や、富山湾周辺海域由来の海洋深層水中に生息している海洋微生物の中にもセメント物質である炭酸カルシウムの析出能力を有する微生物が既に生息していること⁷⁾等が明らかとなっている。しかしながら、海底地盤由来の海洋微生物による炭酸カルシウム析出能力や、砂地盤の液状化対策としての有効性については明らかとなっていない。このような状況を踏まえ、本研究では富山・新潟県境付近の表層型メタンハイドレート確認地点で採取した底泥由来の海洋微生物を用いた豊浦砂の固化実験を実施し、土の繰返し非排水三軸試験結果に基づき海底地盤を対象とした液状化対策としての適用性を評価することとした。

2. 海底地盤を対象とした微生物固化技術の適用性評価

(1) 微生物固化のメカニズム

微生物の代謝活動を利用してセメント物質を土の間隙内に析出させることで強度増進効果を得る技術として、バイオポリマー法⁸⁾、シリカ法⁹⁾、炭酸カルシウム法¹⁰⁾などについて検討が進められている。本研究では、海水中

に既に0.4g/L程度の濃度でカルシウムが含まれていることに加え、海域の窒素サイクルの中で天然プロセスによる供給が期待できる尿素を利用して砂の間隙中に結晶を析出させる炭酸カルシウム法に着目することとした。着目した炭酸カルシウム析出メカニズムを式(1),(2)に示す。

上記式(1)に示したウレアーゼとは、尿素を加水分解して二酸化炭素とアンモニアを生成する酵素である。本研究では、このウレアーゼ(酵素)を海底中に既に生息している微生物の機能により生成させることにより原位置で安価かつ継続的に炭酸カルシウムの結晶化を得る効果を期待している。

(2) 海底地盤(表層堆積物)中に生息する微生物を対象とした群集構造解析

本研究で提案する微生物固化技術は、波浪などによる海底地盤の液状化抑制に加えてメタンハイドレート開発に伴う海底地盤の変状抑制など幅広い分野への適用を想定している。このような背景のもと、海底地盤内において多様な微生物が生息していると考えられている富山・新潟県境付近の表層型メタンハイドレート確認海域から底泥を採取し、微生物固化技術への適用性を評価することとした。底泥の採取は2014年5月の長崎丸第391次航海にあわせて実施した大学院海洋実習において水深540mの海底からG.S.型表層採泥器(離合社製)を用いて採取した。採取時にはあわせて海洋深層水および岩石サンプルの採取を行った。採取後の底泥は海底の温度条件を保った状態で研究室に持ち帰り、微生物群集構造解析および微生物固化能力向上のためウレアーゼ活性陽性微生物の優先化を目的とした集積培養を実施した。

表層型メタンハイドレート確認海域において採取した底泥(表層堆積物)の状況を写真-1に示す。なお、採取時の底泥および海洋深層水の温度は4℃であった。別途採取した海洋深層水を対象としたpHの値は7.4であるとともに、カルシウムイオンおよびマグネシウムイオンの濃度はそれぞれ525mg/Lおよび1,420mg/Lであった。

底泥中にすでに生息している微生物の多様性評価を目的とし、PCR-DGGE法による微生物群集構造解析を行った。なお、PCR-DGGE法とは同じ長さの二本鎖DNA断片を塩基配列の違いに基づいて分離する電気泳動法であり、試料中に含まれるすべての微生物を対象とした群集構造解析が可能になるとともに、対象サンプルごとに異なる微生物群集構造を視覚的に比較することができる手法として広く用いられている¹¹⁾。

解析手順を以下に記す。採取した底泥サンプル長が15cmであることから、5cm毎に3層にわけてDNAの抽出を行った。抽出後のDNAはバクテリア16SrRNA遺伝子のV3領域を含む*E.coli*のヌクレオチドポジション341-534領域を対象とし、341側プライマーにGCクランプを付加してPCR反応を行った。PCR産物確認後にDGGE法による微生物群集構造解析を行った。なお、DGGE解析では海洋深層水、岩石サンプル付着物および陸域で別途採取した土壌もあわせて行い微生物群集構造の比較を行うこととした。DGGEの解析条件および結果を図-1に示す。

PCR-DGGE解析の結果から得られた各レーンにおけるバンド(横線)の数は存在する細菌の種類数に相当する。また、泳動停止位置は細菌種に固有のものであり、このバンドパターンを比較することで試料中の微生物群集構造の違いを把握することができる。図-1より、表層型メタンハイドレート確認海域で採取した底泥中に含まれる微生物種は堆積深度により大きく異なる傾向が明らかとなった。また、海洋深層水、岩石サンプル付着物お

写真-1 底泥採取状況

図-1 微生物群集構造(PCR-DGGE)解析結果

よび陸域で別途採取した土壌とバンドパターンが異なることから、微生物源として選定した表層型メタンハイドレート確認海域の深海底に生息している微生物種は他の環境と異なる特徴があると考えられる。

(3) 表層堆積物を対象とした微生物固化能力増進試験

表層型メタンハイドレート確認海域で採取した底泥中に生息する微生物は海洋深層水と異なるとともに、底泥の堆積深度により大きく異なることが図-1 に示したPCR-DGGEの結果より明らかとなった。そのため、各層についてウレアーゼ活性を持つ微生物の優先化を目的とした培養を行い、微生物固化に適した微生物群集構造を持つ深度を明らかにすることとした。集積培養の流れを図-2 に示す。

集積培養では、窒素源として0.15mol/L 濃度となる尿素を添加した人工海水(pH=7.0 に調整)を用いることとした。微生物源は底泥サンプル0.5g とし、30℃の恒温層内で培養を行った。培養期間中は定期的に水層を採取し、アンモニウムイオン濃度およびpH の測定を通じて式(1) に示した尿素の加水分解反応を評価することとした。

なお、培養期間は概ね3 か月間とし、尿素の加水分解に伴い生成されるアンモニウムイオン濃度が40mg/L を超えたサンプルについて微生物固化への適用性があると判断し、以降の豊浦砂を対象とした固化実験および土の繰返し非排水三軸試験に用いることとした。

培養期間中のアンモニウムイオン濃度および pH の推移を図-3.4 にそれぞれ示す。以下、項目ごとに考察する。図-3 に示したアンモニウムイオン濃度の推移から、底泥表層から深度10cm にかけて2 ヶ月程度の培養で目標とするアンモニウムイオン濃度が40mg/L を超える傾向が認められた。この結果は、尿素の加水分解能力を持つ微生物の増殖（優先化）を表しており、微生物固化に適した条件を整えることができたと考え

図-2 集積培養フロー

られる。

一方、深度10~15cm（最下層）のサンプルについては30 日以降アンモニウムイオン濃度の上昇が抑えられる傾向が認められた。

pH の推移を示した図-4 から、表層から深度10cm にかけては尿素の加水分解に伴い発生するアンモニウムイオン由来と考えられる pH の上昇傾向が認められたが、深度10~15cm については逆に pH=4.0 程度までの低下傾向を示すことが明らかとなった。深度10~15cm について pH が低下した原因としては、底泥内にすでに生息している硝化菌の働きによりアンモニアが硝化され硝酸イオンが生成されたことが考えられる。pH=5.5 以下までの低下は炭酸カルシウムの溶解が危惧されることから、pH 低下の原因物質については今後明らかにしていく計画である。

表層型メタンハイドレート確認海域で採取した底泥を対象とした集積培養の結果から、水深540m で採取した底泥の表層から深度10cm 程度にかけては微生物固化が期待できる結果となった。なお、表層から-5cm および深度5~10cm についてはアンモニウムイオンの生成量、pH とともに同様の傾向を示すことが室内試験の結果から明らかとなったため、底泥表層から深度10cm にかけての底泥由来の微生物群集を用いた豊浦砂の固化を行うとともに、土の繰返し非排水三軸試験を実施して液状化対

図-3 アンモニウムイオン濃度の推移

図-4 pH の推移

策としての有効性を検証することとした。

3. 土の繰返し非排水三軸試験による液状化特性の改善効果

海底地盤由来の底泥にすでに生息している微生物群集による炭酸カルシウムの結晶化が期待できる結果が示されたため、豊浦砂を対象とした固化供試体を作成し、土の繰返し非排水三軸試験を通じて液状化特性の改善効果を明らかにすることとした。

供試体作成および力学試験の流れを図-5に、固化に用いた溶液の組成を表-1にそれぞれ示す。なお、供試体の作製および力学試験の方法は既往の研究¹²⁾と同様とした。

供試体作成フローを図-5(a)に基づき説明する。供試体はφ50mm×H90mmのプラスチック製カラムの中に、豊浦砂を1層75gごと投入し、ガラス棒で15回つき固める。同様の操作を3回繰り返したのちに砂の巻き上がり抑制を目的として上部に不織布を設置し、φ11~13mmのガラスビーズを概ね50gとなるよう投入する方法で作成した。その後、間隙体積分(およそ90mL)の菌体培養液をカラム上部から1回のみ通水し、カラム下部から菌体培養液の流出が確認された後に表-1に示した濃度の固化溶液をカラム上部から計3回通水させることとした。

試験ケース一覧を表-2に示す。本研究において新たに得られた底泥由来の集積培養系(T)に加え、無対策の豊浦砂のみ(N)、微生物固化による液状化特性改善効果の比較を目的として微生物機能による炭酸カルシウムの結晶化が認められている沿岸域由来の *Sporosarcina aquimarina* (S) および陸域由来の *Bacillus pasteurii* (B) についても同様の試験を行うこととした。なお、固化溶液の通水頻度は尿素の加水分解速度が最も遅いケースTにおいて添加したカルシウム分が90%以上結晶化するまでの時間を考慮してすべてのケースについて週1回と統一することとした。そのため、本試験においては微生物種にかかわらず固化期間は3週間となった。固化終了後は、間隙体積分の3倍量の純水で洗浄し、十分脱水した後に土の繰返し非排水三軸試験実施まで-20℃のフリーザー内にて凍結保存することとした。

土の繰返し非排水三軸試験の流れを図-5(b)に基づき説明する。固化処理を行わないCASE Nは三軸セル内でモールドを組み立て、つき固め方により直接供試体を作成した。CASES,BおよびTについては、凍結状態でφ5cm×H7.5cmに成形したのちに三軸セル内にセットした。2時間程度かけて供試体を解凍させたのちに二重負

図-5 供試体作成および力学試験フロー

表-1 固化溶液の組成(1Lあたり)

薬品名	量	概要
Nutrient Broth	3.00g	栄養源
NH ₄ Cl	10.00g	窒素源
NaHCO ₃	2.12g	pH調整
CO(NH ₂) ₂	18.00g	固化成分
CaCl ₂	33.30g	固化成分

表-2 試験ケース一覧

CASE	微生物種	目標CaCO ₃ 析出率 (%)
N	—	0
S	<i>Sporosarcina aquimarina</i> (沿岸域由来)	3
B	<i>Bacillus pasteurii</i> (陸域由来)	3
T	底泥由来集積培養系	3

※CASES,BおよびTについては、濃度0.3mol/Lの尿素および塩化カルシウムを含む表1に示した固化溶液を計3回通水

図-6 各ケースにおける液状化強度の比較

圧法により脱気水を間隙体積分の3~5倍量通水させることで飽和させた。その後B値の測定を行い、0.95を満たすまで同様の飽和作業を繰り返した。飽和後の供試体について有効拘束圧 $\sigma_v' = 50\text{kPa}$ で等方圧密を行い、試験を実施した。載荷は応力制御方式で一定振幅の正弦波とし、載荷周波数=0.1Hzの条件で繰返し荷重を与え両振幅ひ

表-3 土の繰返し非排水三軸試験結果一覧

CASE	乾燥密度 (g/cm ³)	炭酸カルシウム析出率 (%)	R _{L20}
N	1.364～ 1.418	—	0.15
S	1.445～ 1.497	2.3	0.3
B	1.464～ 1.480	2.4	0.6
T	1.445～ 1.507	2.4	0.5

ずみ DA=5%となるまで測定を行った。

試験の結果から得られた液状化強度曲線を図-6 に、乾燥密度、炭酸カルシウム析出率および R_{L20} (繰返し載荷 20 回で両振幅ひずみ DA=5%に達するときの繰返し応力振幅比) 等の測定結果一覧を表-3 にそれぞれ示す。

なお、乾燥密度は試験終了後の供試体を 105℃で炉乾燥して求めた。また、炭酸カルシウム析出率は乾燥密度測定後の試料全量を対象として 0.5mol/L 濃度の塩酸を用いた酸分解を行い、酸分解前後の質量差から豊浦砂質量に対する炭酸カルシウムを求めることとした。そのため表-3 に示した CASE S,B および T の乾燥密度の値は、微生物機能により生成された炭酸カルシウムを含む値となっている。あわせて、土の繰返し非排水三軸試験から得られた有効応力経路および応力軸ひずみの履歴を図-7 に示す。なお、各ケースについては繰返し載荷回数が 30 回程度で DA=5%となる結果をそれぞれ選定している。

以下、項目ごとに考察する。図-6 より、微生物固化処理を行わないケース N の液状化強度曲線は繰返し載荷回数にかかわらず R_{L20} の値が 0.15 程度で推移する傾向が明らかとなった。一方、微生物固化処理を行ったケース S,B

および T については、繰返し載荷回数が少なくなるにつれ立ち上がるとともに、CASE N と比較して右上方に位置する結果となった。微生物固化処理を行った CASE S,B および T は CASE N と比較して有効応力および軸ひずみが緩やかに変化する密な砂に近い傾向を示すことが図-7 より明らかとなった。

微生物固化処理を行った 3 ケース(S,B および T)については、炭酸カルシウムの析出率がほぼ同程度であるにも関わらず、沿岸域由来の *S.aquimarina* を用いた CASE S の R_{L20} の値が小さくなった。一方、本研究において得られた富山湾周辺の表層型メタンハイドレート確認海域で採取された底泥由来の微生物群集を用いて固化した CASE T の値は、陸域由来で液状化対策としての効果が認められている *Bacillus pasteurii*(CASE B)と同程度の液状化強度改善効果が期待できる結果となった。

原位置底泥由来の微生物群集を用いることで液状化強度改善効果が期待できることから、提案技術の有効性を室内試験結果から明らかにすることができた。

4. まとめおよび今後の課題

本研究では、環境負荷の小さい新しい海底地盤の液状化対策として原位置由来の微生物機能により砂の間隙中に炭酸カルシウムを析出させることで強度増進効果を得る微生物固化技術の適用性について検討した。本論文で得られた知見を以下にまとめる。

- 1) 富山・新潟県境付近の表層型メタンハイドレート確認海域で採取した底泥を対象とした遺伝子解析の結果から、海水中と底泥中に生息する微生物種が異なるとともに、底泥中においても深度方向により微生物種が変化する。

a)豊浦砂のみ(CASE N) b) *S.aquimarina* 固化(CASE S) c) *B.pasteurii* 固化(CASE B) d)底泥由来集積培養系(T)

図-7 有効応力経路と応力-軸ひずみの履歴

- 2) 尿素を用いた集積培養の結果から、表層型メタンハイドレート確認海域で採取した底泥において表層から深度10cm程度にかけて微生物固化が期待できる。
- 3) 表層型メタンハイドレート確認海域由来の底泥微生物を用いることで、3週間程度の施工により砂地盤の液状化強度特性を改善する効果が得られる。
- 4) 底泥由来の集積培養液を用いた固化処理により、陸域で液状化対策としての有効性が明らかとされている *Bacillus pasteurii* と同様の液状化強度改善効果が期待できる。

過去に行った検討の結果から、浅海域の砂地盤周辺にもウレアーゼ活性を有する同様の微生物が確認されている¹³⁾。以上より、提案技術は水深に関係なく海域の地盤強度増進に広く応用可能であると考えられる。また、固化効果が期待される微生物が海底表層に多く生息していることから、海底表面から深度方向へ向かって地盤改良体を形成できる可能性が示された。今後は、固化能力に優れた原位置微生物の探索に加え、目的とする深度で効率的に地盤改良体を形成させる施工法などについて検討を進めていきたい。

謝辞：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:26289154, 研究代表者 畠俊郎)」および公益財団法人富山第一銀行奨学財団 平成27年度研究助成事業の支援を受けて実施したものである。ここに記して謝意を表す。

参考文献

- 1) 南兼一郎, 清宮理, 土田肇: 液状化が海底パイプラインの応力度に及ぼす影響, 港湾技研資料, No.441,1983.
- 2) 善功企: 海底地盤の波浪による液状化に関する研究, 港湾技研資料, No.755,1993.
- 3) 酒井哲郎, 後藤仁志, 原田英治, 井本康文, 田中秀範: 海底地盤の液状化による護岸前面捨石群の沈下過程, 海岸工学論文集, Vol.49,pp.866-870,2002.
- 4) 片岡沙都希, 松本良: MD179 調査より得られた日本海東縁域海底表層堆積土の物理・力学的性質, 石油技術協会誌, Vol.77, No.4, pp.284-279,2012.
- 5) 長久保定雄ら, メタンハイドレート開発と環境評価―「我が国におけるメタンハイドレート開発計画」フェーズⅡにおける環境研究の取り組み―, 石油技術協会誌, Vol.76, No.4, pp.311-319,2011.
- 6) Qabany, A. A., Soga, K, and Santamarina, J.C.: Factors Affecting Efficiency of Microbially Induced Calcite Precipitation, Journal of Geotechnical and Geoenvironmental Engineering, Vol.38, No.8, pp.992-1001,2012.
- 7) 畠俊郎, 手計千恵美: 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, 土木学会論文集 G(環境), Vol.70, pp.59-67,2014.
- 8) 高畑陽, 松井英岳, 石井裕泰, 堀越研一: バイオポリマー生成菌 *Enterobacter* sp.CJF-002 株を用いる砂地盤の液状化防止に関する基礎的研究, 第47回地盤工学研究発表会講演論文集, pp.577-578,2012
- 9) 寺島麗, 島田俊介, 小山忠雄, 川崎了: 微生物代謝により固化するシリカ系地盤中注入剤バイオグラウトの基礎研究, 土木学会論文集 C, Vol.65, No.1, pp.120-130,2009
- 10) Marien P.Harkes, Leon A. van Paassen, Jacco L.Booster, Vistoria S.Whiffin, and Mark C.M. van Loosdrecht: Fixation and distribution of bacterial activity in sand to induce carbonate precipitation for ground reinforcement, Ecological Engineering, Vol.36, pp.112-117,2010.
- 11) Muyzer, G., E. C. de Waal, and A. G. Uitterlinden: Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. Appl. Environ. Microbiol. 59: 695-700,1993.
- 12) 手計千恵美, 畠俊郎, 畠山正則, 阿部廣史: 酵素活性の異なる各種微生物を用いた固化処理砂の液状化特性改善効果に関する検討, 地盤工学ジャーナル, Vol.11, No.1, pp.1-9,2016
- 13) 荒井啓祐, 畠俊郎: 微生物機能によるビーチロックの生成促進に関する研究, 平成23年度土木学会中部支部研究発表会, CD-ROM, 論文番号Ⅲ-032,2012

(2016.2.4 受付)

APPLICABILITY OF THE MICROBIAL CARBONATE PRECIPITATION TECHNOLOGY AS LIQUEFACTION COUNTERMEASURE OF SEABED

Toshiro HATA and Hirofumi ABE

In this research, we discussed about the newly ground improvement and countermeasure of liquefaction technology for the seabed based on the microbial functions. This study examined the feasibility of in-situ bio mineralization technologies for the sediment from deep sea area which are located near the surface types of the methane hydrate (depth is the -540m) in Japan sea. Authors used the pre-cultivation which are enhancement of the urease activity from in-situ sediment and the cyclic triaxial test to evaluate the enhancement of the liquefaction strength with three types of microorganisms. The main findings of this research were as follows: (1) the urease activity microorganisms from the deep sea sediment can enhance calcite precipitation during the three weeks cultivation, (2) Surface of the seabed sediment can precipitate the calcite and improvement of liquefaction strength. (3) The enrichment culture from the deep sea area can enhance the liquefaction strength as a solidification of specific microorganisms named *Bacillus pasteurii*.