

土壌微生物による炭酸カルシウム析出に及ぼす温度の影響

川崎 了*・小瀧 暁**・広吉直樹***・恒川昌美***・金子勝比古***・寺島 麗****

要 旨

筆者らは、土や岩の代表的なセメント物質である炭酸カルシウムまたはシリカを主成分とし、微生物の代謝活動により土や岩の間隙や岩の割れ目を自然に閉塞させる新たな概念に基づくグラウト、すなわち、バイオグラウトを開発するための基礎的な研究を実施中である。本論文では、炭酸カルシウムを用いたバイオグラウト、すなわち、炭酸カルシウム法に関して検討を実施した結果について報告する。具体的には、日本各地より採取した自然の土壌中に生息する微生物を用いて試験管による炭酸カルシウムの析出試験を行い、試験時における温度の違いが炭酸カルシウム析出に与える影響について調査した。その結果、温度5～35℃の低～中温域において、土壌微生物により炭酸カルシウムが試験管内に析出することが示唆された。一方、試験に用いた土壌微生物の菌数測定および遺伝子解析を実施し、試験前後の土壌に含まれる微生物相の変化に関して、生菌数、最も出現頻度の高い菌の菌数およびその帰属分類群を用いることにより比較を行った。その結果、それらは主に*Penicillium*属および*Aspergillus*属の菌類であり、有機栄養源を活発に代謝することにより菌数が増加したものと推定された。

Key words : 微生物 microorganism, 炭酸カルシウム calcium carbonate, バイオグラウト biogrout, 温度 temperature

1. はじめに

炭酸カルシウムおよびシリカは、地盤を構成する土や岩の代表的なセメント物質としてよく知られている。これらを主成分とするバイオグラウト¹⁾は、地盤に注入された後に地盤中の微生物の代謝活動によって土や岩の間隙や岩の割れ目を閉塞させる注入材料であり、その固化原理はこれまでになかった新しい概念に基づいている。既報告¹⁾では、セメント物質として炭酸カルシウムを対象とした方法(以下、「炭酸カルシウム法」と呼ぶ)に関する試験内容に限定し、バイオグラウトによる地盤改良工法の概要について述べた。また、バイオグラウトの基本的特性について検討し、イースト菌および自然の粘土質地盤に含まれる微生物を用いた試験管による炭酸カルシウムの析出試験について報告した。さらに、バイオグラウトによって処理された地盤の改良効果を確認するために、供試体レベルの砂質地盤お

よび粘土質地盤を対象としたバイオグラウト処理による地盤の透水特性の改良試験に関して報告した。そして最後に、得られた主な知見を整理して結論を述べた後に、今後の課題および研究の方向性について示した。

バイオグラウトにおける炭酸カルシウムの析出状況は、微生物の代謝活動に大きく依存する。微生物の代謝活動に影響を与える主な環境要因としては、有機栄養源(炭素源)、窒素源、無機塩類、水分、温度、pH、圧力、酸素、二酸化炭素、などが考えられるが、既報告¹⁾における試験時の温度条件は25～40℃の中温域に限定されていた。よって、バイオグラウトの実用化を図るためには、例えば北海道のような寒冷地あるいは本州の冬期におけるバイオグラウトの現場施工などを想定し、低温域における炭酸カルシウムの析出試験を実施しておく必要がある。一方、土壌中に生息する微生物の種類および数に関しては、地域性が存在することが知られている²⁾。よって、バイオグラウトが実用化に至るためには、国内外の場所を問わずバイオグラウトの施工対象となる土壌中に生息する微生物を利用して炭酸カルシウムが析出することを確認しておく必要がある。

以上のことから、本論文では寒冷地あるいは冬期におけるバイオグラウトの現場施工を想定し、低～中温域である5～35℃の温度条件下において炭酸カルシウムの析出に及

* 北海道大学 Hokkaido University(会員)

E-mail : kawasaki@geo-er.eng.hokudai.ac.jp

** 北海道大学大学院工学研究科 Graduate School of Engineering, Hokkaido University

*** 北海道大学 Hokkaido University

**** 強化土エンジニアリング(株) Kyokado Engineering Co., Ltd.

ぼす温度の影響について実験的検討を実施した。また、対象とする土壌および土壌微生物を国内に限定し、北海道を始めとする国内5か所から自然の土壌およびその中に生息する微生物と一緒に採取し、炭酸カルシウムの析出に及ぼす土壌および土壌微生物の影響について調査した。さらに、炭酸カルシウムの析出試験に用いた土壌微生物の菌数測定および遺伝子解析を実施し、試験前後の土壌中に含まれる微生物相の変化に関して、生菌数、最も出現頻度の高い菌の菌数およびその帰属分類群を用いることにより比較を試みた。

2. 土 壤

2.1 採取地点

本論文で使用した土壌の採取地点をまとめて表-1に示す。北海道は、道南地域を除く3地点、すなわち、道北地域の天塩郡幌延町(以下、「幌延」と記す)、道央地域の札幌市北区(以下、「札幌」と記す)、道東地域の帯広市八千代町(以下、「帯広」と記す)から、それぞれ土壌を採取した。北海道以外に関しては、炭酸カルシウム法によるバイオグラウトが国内のすべての地点で適用可能であることを検証するために、本州は岡山県岡山市津島中(以下、「岡山」と記す)から、また、日本最南端の都道府県として沖縄県中頭郡西原町(以下、「沖縄」と記す)から、それぞれ土壌を採取した。採取地点の土地利用形態は、幌延のみが牧草地であり、その他の地点はすべて農場(畑)である。なお、採取地点として主に農場(畑)を選択したのは、土壌の採取が作業的に容易で経済的に安価であること、また、できるだけ同じ土地利用形態にある土壌の試験結果同士を比較したいと考えたこと、さらに、バイオグラウトの適用対象¹⁾は必ずしも地下深部の軟弱地盤に限定されないこと、などが主な理由である。

2.2 採取方法

土壌の採取は、エタノールによる滅菌処理を施したハンドスコープを使用し、各地点における地表から約20~30cmの深さにある土壌を容量1,000cm³の滅菌済容器(エムアイケミカル(株)製、ポリナンコー1000)の中に合計8個ずつ(札幌のみ合計16個)採取し、直ちに容器を密閉した。5地点の土壌を採取した時期は2006年7月上旬~9月上旬の2か月間であり、採取日の天候はすべての地点において晴れであった。

土壌を採取した後は、できるだけ速やかに容器を実験室

表-1 土壌採取地点

都道府県	市区町村
北海道	天塩郡幌延町下沼
北海道	札幌市北区(北海道大学農場)
北海道	帯広市八千代町(テクノ・ファーム農場)
岡山県	岡山市津島中(岡山大学農場)
沖縄県	中頭郡西原町(琉球大学農場)

表-2 土壌採取地点の土壌含水比

土壌採取地点	含水比(%)
幌延	11.0
札幌	30.4
帯広	41.8
岡山	20.0
沖縄	30.3

表-3 土壌採取地点の土壌pH

土壌採取地点	45分後	60分後	90分後	120分後
札幌	6.9	6.5	6.1	6.2
岡山	6.9	6.8	6.8	6.8
沖縄	8.3	8.2	8.4	8.3

内にある温度4℃の保冷庫の中に入れ、同年9月中旬より開始した試験に供するまで保存した。なお、保冷庫の設定温度が後述する試験結果に与える影響について調べるため、札幌の土壌に関しては温度4℃以外にも温度25℃の恒温実験室内で保存した。よって、次章以降では札幌に限り、それぞれ「札幌(4℃)」、「札幌(25℃)」と記して土壌を区別することにする。

2.3 基本的物性

採取した5地点の土壌の基本的物性を調べる目的で、土壌の含水比とpHについて測定した。なお、pHに関しては、札幌、岡山、沖縄の3地点で採取した土壌のみを対象とし、土壌を蒸留水に懸濁させてから45、60、90、120分の各時間経過時に測定を行った。また、含水比とpHの測定は、それぞれ以下の試験方法に関する規格および基準に準拠して実施した。

- 含水比：日本工業規格「土の含水比試験方法」(JIS A 1203:1999)
- pH：地盤工学会基準「土懸濁液のpH試験方法」(JGS 0211-2000)

得られた含水比およびpHの測定結果を表-2, 3にそれぞれ示す。含水比については、土壌の粒度構成による違いを反映して地点ごとに数値が異なっているが、表-2より採取時における各地点の土壌の含水比は約11~42%の範囲にあることが知られる。一方、pHに関しては、表-3より札幌と岡山の土壌のpHが6.1~6.9程度の弱酸性~中性を示しているのに対し、沖縄の土壌はジャーガル³⁾と呼ばれる泥灰岩の風化土壌であることからpHが8.2~8.4の弱アルカリ性を呈していることがわかる。すなわち、札幌と岡山の土壌のpH値に関しては、蛇紋岩地帯や石灰岩地帯のように母岩がアルカリ性の地域を除き、日本国内の多くの土壌pHが中性~弱酸性であるという事実⁴⁾と一致している。

3. 方 法

3.1 炭酸カルシウムの析出試験

3.1.1 カルシウム源を加えた場合

試験は、以下に述べる手順で実施した。なお、バイオグ

ラウトを構成する主原料であるカルシウム源、有機栄養源、pH緩衝溶液の配合比は、既報告¹⁾と同じ割合とした。すなわち、硝酸カルシウム2.36gおよびグルコース3gをpH8.0のトリス-塩酸緩衝溶液((株)ニッポンジーン製, 1 M Tris-HCl)に溶解させて100cm³とし、バイオグラウト溶液(硝酸カルシウム-グルコース混合溶液)とした。なお、本溶液中のカルシウムイオン濃度は0.1kmol/m³(=0.1mol/L)、グルコース濃度は0.167kmol/m³(=0.167mol/L)である。このグラウト溶液を硬質ガラス製のねじ口試験管(マルエム(株)製, N-16)の中に8cm³入れ、温度が5, 15, 25, 35℃に設定された各インキュベーター(三菱電機エンジニアリング(株)製, クールインキュベーター CN-25B)の中に入れて24時間静置させた。24時間経過後、各インキュベーターの中から試験管を取り出し、計6種類の土壌を3gずつ各試験管の中に入れ、再び各インキュベーターの中に静置させた。なお、1本の試験管に対して1種類の土壌を入れた。また、試験結果の再現性を確認するために、試験管は各土壌で2本ずつ使用した。土壌を入れてから1, 2, 4, 8週間が経過した後、各インキュベーターの中から試験管を取り出し、試験管を上下によく振ることにより内容物を攪拌し、孔径0.2μmのメンブランフィルター(ザルトリウス(株)製, ミニザルトプラスSM17823K)で濾過し、pH計(Oakton Instruments製, pH Spear Tester)を用いて濾液のpHを測定した。その濾液を蒸留水で100倍に希釈した後、ポータブルイオン・pH計(東亜電波工業(株)製, IM-22P)を用いてカルシウムイオン濃度を0.1μg/Lの分解能で測定した。

3.1.2 カルシウム源を加えない場合

バイオグラウトのカルシウム源として土壌に含まれるカルシウム成分の利用が可能かどうかを調べるため、次のような手順でカルシウム源を加えない炭酸カルシウムの析出試験を実施した。なお、土壌は札幌(4℃)と沖縄の計2種類、温度は25℃のみとした。グルコース3gをpH8.0のトリス-塩酸緩衝溶液に溶解させて100cm³とした溶液を調製する。その溶液を硬質ガラス製のねじ口試験管の中に8cm³入れ、温度が25℃に設定されたインキュベーターの中で24時間静置させた。24時間経過後、インキュベーターの中から試験管を取り出し、両土壌を3gずつ各試験管に入れ(固液比3:8)、再びインキュベーターの中に静置させた。なお、各試験管には1種類の土壌のみを入れた。また、試験結果の再現性を確認するために、試験管は両土壌で2本ずつ使用した。土壌を入れてから1, 2, 4, 8週間が経過した後、インキュベーターの中から試験管を取り出し、試験管を上下によく振ることにより内容物を攪拌し、孔径0.2μmのメンブランフィルターで濾過し、pH計を用いて濾液のpHを測定した。その濾液を蒸留水で100倍に希釈した後、ポータブルイオン・pH計を用いてカルシウムイオ

ン濃度を測定した。

3.2 土壌の溶出試験

土壌からグラウト溶液に溶解する主要な各種成分(陽イオンおよび陰イオン)を定量するとともに、溶液のpH値の変化について明らかにするため、札幌(25℃)を除く5種類の土壌を用いた溶出試験を実施した。土壌の粒径は事前に2mm以下に調整し、土壌18.75gに対して蒸留水50cm³(固液比3:8)を加えてよく攪拌した後、25℃に設定されたインキュベーターの中に静置した。1週間が経過した後、孔径0.2μmのメンブランフィルターを用いて濾過を行い、その濾液に対して0.01mol/Lの硫酸による滴定法によりpH4.8アルカリ度を測定し、HCO₃⁻の濃度を算出するとともに、カルシウム塩を構成するCa²⁺およびCl⁻, NO₃⁻, SO₄²⁻の各濃度をイオンクロマトグラフィー(DIONEX製, ICS-90)を用いて定量分析した。

3.3 土壌微生物の分離および菌数測定

日本全国の大まかな地域性および後述する4.1節の試験結果を考慮し、前述した3.1.1項における炭酸カルシウムの析出試験において温度25℃における札幌(4℃)、岡山、沖縄の3土壌を対象とし、試験の開始前および8週間後において土壌に含まれる微生物を分離して菌数を測定した。なお、微生物相としては、細菌、放線菌、菌類(カビ・酵母)の3区分とした。また、コロニー観察時には、実体顕微鏡(オリンパス(株)製, SZH10)を使用した。

培養条件は、対象とした土壌の間隙が水分で十分に満たされていない不飽和状態にあり、かつ、表層近くから採取した土壌であることから、土壌に含まれる各微生物相に対応する代表的な培地を使用した好気とし、分離方法には希釈液として生理食塩水を用いた希釈平板法(0.1mL表面塗抹CFU法)を採用した。なお、塗抹枚数は、同一希釈を各2枚とした。また、各培地のpHは、前述した2.3節における各土壌の懸濁液のpH値を考慮し、札幌(4℃)と岡山はpH7.0、沖縄はpH8.0とした。

上記以外の各微生物相の培養および希釈に関する詳細⁶⁾は、以下のとおりである。

【細菌】

- 培地：標準寒天培地(日水製薬(株)製)
(シクロヘキシミド50mg/L添加)
- 培養温度：30℃
- 培養時間：3日
- 希釈倍率：10³~10⁸

【放線菌】

- 培地：グルコース・でん粉・アスパラギン培地
(シクロヘキシミド50mg/L添加)
- 培養温度：30℃
- 培養時間：8日
- 希釈倍率：10²~10⁴

【菌類(カビ・酵母)】

- 培地：ポテトデキストロース寒天培地「ダイゴ」
(日本製薬(株)製)
(クロラムフェニコール50mg/L, ローズベンガル50mg/L添加)
- 培養温度：25℃
- 培養時間：7～14日
- 希釈倍率：10⁰～10⁸

一方、分離した後の菌数測定については、各微生物相の生菌数を測定した。また、最も出現頻度が高い菌の特定およびその菌数を測定し、その菌の単離(純粋化)を行った。

3.4 土壌微生物の遺伝子解析

上記3.3節において単離された菌の遺伝子配列を解析し、帰属分類群の推定を実施した。なお、4.3節で後述するように、炭酸カルシウムの析出試験では試験後のすべての土壌において放線菌の生育が観察されなかったことから、ここでは細菌と菌類(カビ・酵母)の2区分のみを対象とする。両菌の遺伝子領域に関しては、通常は細菌などの原核生物では16S rDNA (16S rRNA遺伝子)が、また、真核生物の菌類(カビ・酵母)では28S rDNA-D1/D2が用いられている。よって、細菌では16S rDNA (16S rRNA遺伝子)の部分塩基配列(約500bp)、菌類(カビ・酵母)では28S rDNA-D1/D2の部分塩基配列(約600bp)とした。なお、塩基配列の約500bpおよび約600bpは、それぞれ特徴的な違いが出るとされている部分に相当している。

好気で再培養したときの条件は、以下のとおりである。

【細菌】

- 培地：Nutrient agar (Oxoid製)
- 培養温度：30℃
- 培養時間：24時間

【菌類(カビ・酵母)】

- 培地：ポテトデキストロース寒天培地「ダイゴ」
(日本製薬(株)製)
- 培養温度：25℃
- 培養期間：7日

また、DNA抽出からサイクルシーケンスまでの操作は、以下のとおりである。

【細菌】

- DNA抽出：InstaGene Matrix (BIO RAD製)
- P C R：MicroSeq 500 16S rDNA Bacterial Identification PCR Kit
(Applied Biosystems製)
- サイクルシーケンス：MicroSeq 500 16S rDNA Bacterial Identification Sequencing Kit
(Applied Biosystems製)

【菌類(カビ・酵母)】

- DNA抽出：DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN製)

- P C R：puReTaq Ready-To-Go PCR beads
(Amersham Biosciences製)
- サイクルシーケンス：BigDye Terminator v3.1 Kit
(Applied Biosystems製)

さらに、既知のDNA配列のデータベースであるINSDB (International Nucleotide Sequence Databases：国際塩基配列データベース)に対する相同性の検索は、日本DNAデータバンク (DDBJ) のホームページにあるBLAST[®]を使用して2009年2月20日に実施した。また、系統解析に用いる系統樹の作成には、近隣接合法⁷⁾ (Neighbor-Joining Method：NJ法)を使用した。

4. 結果および考察

4.1 炭酸カルシウムの析出試験

4.1.1 カルシウム源を加えた場合

各地点におけるカルシウムイオン濃度の経時変化を図1～6に示す。なお、試験開始時におけるバイオグラウト溶液のカルシウムイオン濃度は4g/L(=0.1kmol/m³)である。これらの図より考察すると、以下のことが言える。

①全体的な傾向としては、各地点の土壌および温度によって多少の違いは見られるが、時間の経過に伴うカルシウムイオン濃度の低下が見られる。すなわち、土壌の吸着は数時間内に終了するため、8週間の長期にわたるカルシウムイオンの土壌への吸着の可能性は排除できること、また、試験条件が大気と遮断された閉鎖系であるため、炭酸イオンの供給の大部分が微生物の代謝由来による二酸化炭素であると考えられること、さらに、カルシウムイオンと炭酸イオンのモル濃度の積が炭酸カルシウムの飽和溶液の平衡定数以上となったことにより、溶液中のカルシウムイオンは炭酸カルシウムとなって析出したものと考えられる。なお、炭酸カルシウム以外のカルシウム塩の析出に関しては、後の4.2節のところで考察する。

②保存温度が異なる札幌(4℃)と札幌(25℃)の土壌の間に、カルシウムイオン濃度の経時変化に関する違いは見られない。ここで、札幌の年間の気温変化を考えると、4～25℃の表層土壌の温度変化は毎年経験する範囲内であり、札幌の土壌微生物が4～25℃の温度変化に対して影響を受けていない今回の試験結果と調和的である。

③土壌微生物には地域性が存在することが知られている²⁾が、地域性の要因の一つに気温がある。札幌(4℃)と札幌(25℃)のカルシウムイオン濃度の経時変化を見ると、両地点において温度35℃よりも温度25℃の方がカルシウムイオン濃度の低下が大きく、その傾向が沖縄と異なっている。この理由を微生物学の立場のみから考察すれば、札幌は寒冷地にあり、そこには札幌の気温条件を最適とする微生物が多く生息していると考え、温度35℃よりも温度25℃の方がカルシウムイオン濃度の低下が大きいことが説明で

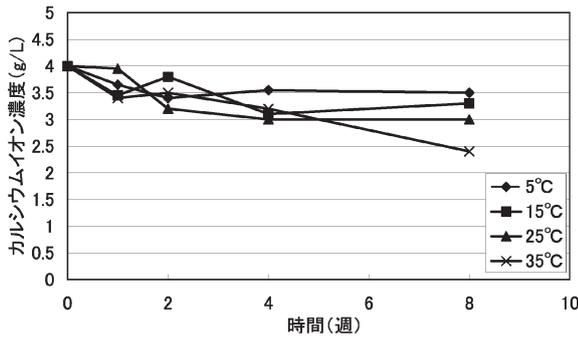


図-1 カルシウムイオン濃度の経時変化(幌延)

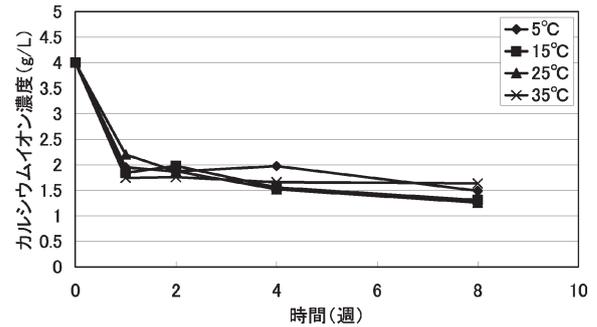


図-4 カルシウムイオン濃度の経時変化(帯広)

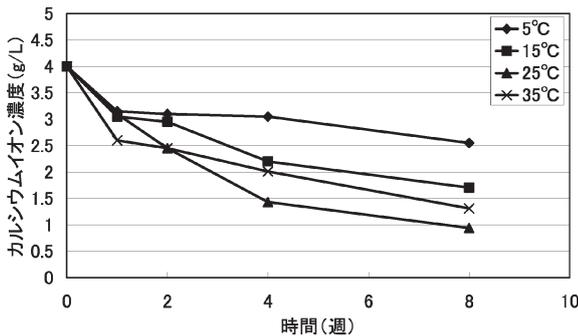


図-2 カルシウムイオン濃度の経時変化(札幌(4°C))

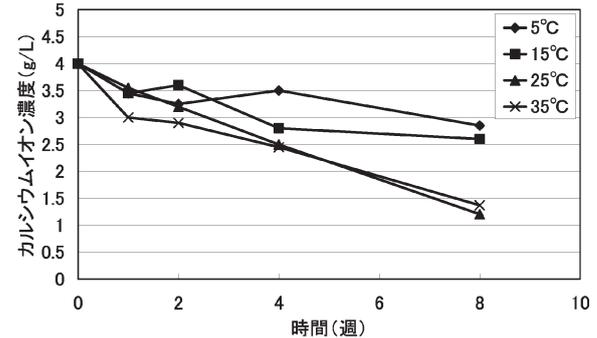


図-5 カルシウムイオン濃度の経時変化(岡山)

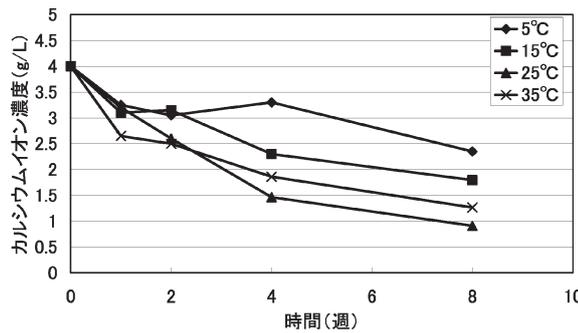


図-3 カルシウムイオン濃度の経時変化(札幌(25°C))

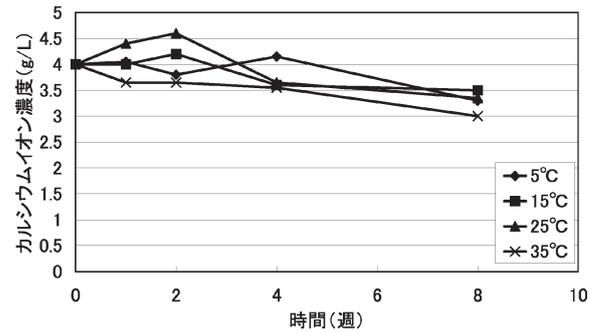


図-6 カルシウムイオン濃度の経時変化(沖縄)

きる可能性がある。

④ 8週間後における各地点のカルシウムイオン濃度の変化について見ると、幌延と沖縄に関しては、他の3地点と比較してカルシウムイオン濃度の低下が小さい。とくに沖縄では、試験を開始してから1～2週間後にカルシウムイオン濃度が初期値よりも大きくなっている。すなわち、沖縄の土壤には、最初から含まれているカルシウム成分が比較的多いことから、他地点に比べて土壌からのカルシウムイオンの溶出傾向が強く見られる。この点に関しては、次の4.1.2項および4.2節で述べることにする。

⑤ 帯広と沖縄以外の3地点については、温度5～25°Cあるいは温度5～35°Cにおいて温度が高くなるにつれて8週間後のカルシウムイオン濃度の低下が大きくなっている。なお、これらの図よりカルシウムイオン濃度の経時変化について議論するためには、化学的な影響と生物学的な影響の両方が含まれている点に注意が必要である。すなわち、炭酸カルシウムなどのカルシウム塩は、一般的に温度が高いほど化学的には反応速度およびカルシウム塩の析出が促進

されるが、生物学的には微生物の代謝活動における適温に関して個体差や地域性などが存在することから、一般的なことは言えない。よって、その詳細に関する議論はこれに続く別の論文で行うことにし、今後の検討課題としたい。

⑥ 帯広は、カルシウムイオン濃度の経時変化が温度の影響をほとんど受けていない。とくに、試験を開始してから1週間以内にカルシウムイオン濃度が低下する速度が著しいことから、生物学的な微生物の代謝活動以外に最初から土壌に含まれている各種成分によって化学的に溶液中のカルシウムイオン濃度が大きく低下した可能性がある。この理由については、後の4.2節のところで考察する。

一方、各地点におけるpHの経時変化に関する図は割愛するが、地点による大きな差異は見られず、時間の経過に伴いpHが単調かつ緩やかに低下する傾向が全体的に見られた。具体的には、例えば8週間後のpH値として温度5～15°CではpH7.5～7.8、温度25～35°CではpH7.0～7.6となり、pH値の低下の程度は0～1.0と小さく、また、低温域の方が8週間後のpH値の低下が若干小さくなった。

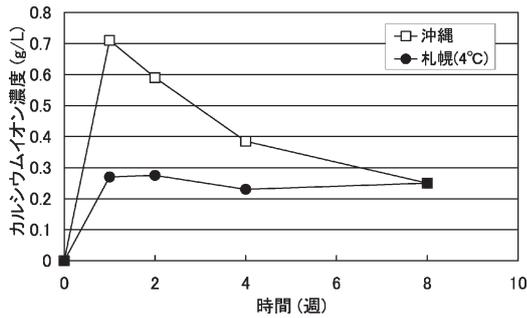


図-7 カルシウムイオン濃度の経時変化(25°C)

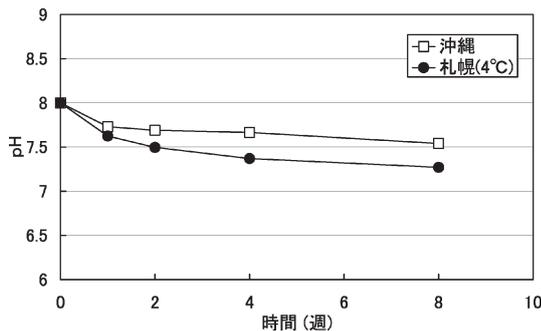


図-8 pHの経時変化(25°C)

4.1.2 カルシウム源を加えない場合

札幌(4°C)と沖縄の両地点における土壌由来のカルシウムイオン濃度の経時変化を図-7に示す。沖縄の場合は、1週間後に溶液中のカルシウムイオン濃度が最大となり、その値は札幌(4°C)よりも2倍以上大きい。また、カルシウムイオン濃度が最大となった後は一転して小さくなり、8週間後には約0.25g/Lとなって平衡状態となる。札幌(4°C)の場合は、1～2週間後にカルシウムイオン濃度が最大となり、その後は緩やかにカルシウムイオン濃度が低下して8週間後には0.25g/L付近で沖縄と同じカルシウムイオン濃度になり平衡状態となっている。

以上のことから、両土壌より溶液中にカルシウムイオンが溶出していること、および、沖縄の土壌の方が札幌(4°C)の土壌よりも溶出しやすいカルシウム成分を多く含んでいることがわかった。

次に、両地点におけるpHの経時変化を図-8に示す。同図より、両地点のpHは時間の経過に伴って初期のpH8.0から低下しているが、低下する程度はしだいに小さくなり、8週間後にはpH7.5(沖縄)およびpH7.3(札幌(4°C))の弱アルカリ性でほぼ一定値になっていることがわかる。なお、沖縄の土壌の方が札幌(4°C)の土壌よりもpHの低下が小さい理由としては、札幌(4°C)の土壌のpHが6.1～6.9の弱酸性であるのに対して沖縄の土壌のpHが8.2～8.4の弱アルカリ性であることから、溶液のpHの低下を抑制したことによると考えられる。

4.2 土壌の溶出試験

5地点の土壌から溶出した各種イオン濃度をまとめて表-4に示す。Ca²⁺については、沖縄の濃度が最も大きく、逆

表-4 5地点の土壌から溶出した各種イオン濃度

	Ca ²⁺	Cl ⁻	NO ₃ ⁻	SO ₄ ²⁻	HCO ₃ ⁻
幌延	0.1	0.2	0.4	0.3	1.0
札幌	4.5	1.5	13.1	1.0	1.0
帯広	6.3	0.4	12.0	3.1	0.6
岡山	4.0	0.2	9.9	0.6	6.6
沖縄	12.7	1.5	5.5	2.0	18.0

単位: × 10⁻⁴ mol/L

に幌延の濃度は沖縄の濃度の約1/100であり最も小さい。また、札幌、帯広、岡山のCa²⁺濃度は比較的近い値の範囲にあり、4.5×10⁻⁴～6.3×10⁻⁴mol/Lである。さらに、ここで述べた結果は、前述した4.1節の結果と調和的である。

以下では表-4を用いて、4.1.1項の炭酸カルシウムの析出試験において溶液中のCa²⁺濃度の経時変化に温度依存性が見られなかった帯広の試験結果について考察する。難溶塩の生成という観点から、今回の溶出試験において帯広の土壌が他地点と異なり有する最大の特徴としては、溶出したSO₄²⁻の濃度が5地点の中で最も大きいことである。換言すれば、帯広の土壌中にはSO₄²⁻が5地点の中で一番多く含まれていることを意味している。なお、このSO₄²⁻の土壌供給源については、代表的な窒素肥料の一つである硫酸アンモニウム(NH₄)₂SO₄と推定される。このSO₄²⁻がCa²⁺と結合して生成する硫酸カルシウムCaSO₄は代表的な難溶塩であり、平衡定数K_{sp}の値が比較的小さく、溶液中において過飽和となり析出しやすいことが知られている。溶液中にある硫酸カルシウムは微量であるが電離して飽和溶液となり、溶解平衡および平衡定数K_{sp}は、それぞれ次式のように表される。



$$[\text{Ca}^{2+}][\text{SO}_4^{2-}] = K_{\text{sp}} \quad (2)$$

ここで、文献⁸⁾よりlogK_{sp} = -4.58とすると、式(2)は次のようになる。

$$\begin{aligned} [\text{Ca}^{2+}][\text{SO}_4^{2-}] &= 10^{-4.58}(\text{mol/L})^2 \\ &\approx 2.6 \times 10^{-5}(\text{mol/L})^2 \end{aligned} \quad (3)$$

また、バイオグラウト溶液中において、硫酸カルシウムが析出する条件は次式で与えられる。

$$[\text{Ca}^{2+}][\text{SO}_4^{2-}] > K_{\text{sp}} \quad (4)$$

次に、式(4)の左辺の値について計算を行う。炭酸カルシウムの析出試験において設定した初期のCa²⁺濃度および表-4中に示された帯広の土壌から溶出したSO₄²⁻濃度をそれぞれ代入すると、次のようになる。なお、この計算の過程において、帯広の土壌から溶出したCa²⁺はバイオグラウト溶液中のCa²⁺濃度と比較して十分に小さいことから、ここでは無視するものとする。

$$\begin{aligned} [\text{Ca}^{2+}][\text{SO}_4^{2-}] &= 0.1(\text{mol/L}) \times 3.1 \times 10^{-4}(\text{mol/L}) \\ &= 3.1 \times 10^{-5}(\text{mol/L})^2 \end{aligned}$$

この値は、式(3)の右辺の値よりも大きい、すなわち、式(4)の関係を満足していることから、バイオグラウト溶液

中に硫酸カルシウムが析出する結果になることがわかる。
 なお、帯広に次ぐSO₄²⁻濃度の札幌と沖縄については、それぞれ1.0×10⁻⁴(mol/L)、2.0×10⁻⁴(mol/L)となっているが、これらの値を用いて式(4)の左辺の値を計算すると、それぞれ1.0×10⁻⁵(mol/L)²、2.0×10⁻⁵(mol/L)²となり、式(3)の右辺の値よりも小さいことから硫酸カルシウムが析出しないことがわかる。

以上のことから、4.1.1項の炭酸カルシウムの析出試験において帯広の溶液中のCa²⁺濃度の経時変化に温度依存性が見られず、かつ、試験開始から1週間後にCa²⁺濃度の大幅な低下が見られた理由としては、溶液中のCa²⁺が土壌から溶出したSO₄²⁻と結合して硫酸カルシウムとなって析出したためであると考えることができる。このようなグラウト溶液中のCa²⁺濃度の低下、すなわち、カルシウム塩の析出をグラウトの固化原理から考えるとすれば、帯広の土壌の場合にはバイオグラウトというよりも、例えばケミカルグラウトと呼べるものである。このように、実際にバイオグラウトの現場施工を行う際には、対象となる地盤中に含まれている各種成分について事前に調べておく必要があると思われる。

4.3 土壤微生物の分離および菌数計測

札幌、岡山、沖縄の3地点を対象とした試験前後における土壤微生物の菌数測定結果を表-5に示す。なお、同表中の数値の単位cfu/gは土壌1g中に含まれる菌数を表し、cfu(colony forming unit)は培地上で培養した菌が形成する集団(コロニー)の数を意味する。

この表より、以下のようなことがわかる。試験前の菌数については、3地点の間に多少の違いは見られるが、各地点の土壌中には10⁶~10⁷の微生物が生息していると推定され、希釈平板法によって得られる一般的な土壌の菌数⁹⁾である。その内訳は、①細菌>②放線菌>③菌類(カビ・酵母)の順番になっている。菌類は、細菌や放線菌に比べると菌数は1~2桁少ないが、菌種はそれらの3~4倍多い。8週間後の菌数に関しては、細菌は1桁減少(札幌および沖縄)あるいは同じ桁のまま減少(岡山)し、放線菌は全地点において確認できなくなり、菌類(カビ・酵母)の菌数が1桁増加(札幌および沖縄)あるいは一定値(岡山)となっている。

よって、今回のような配合のバイオグラウトを各地点において施工した場合には、一時的に微生物相の割合は変化する。すなわち、微生物の総菌数としては、岡山で約1/2、札幌と沖縄で約1/10に減少する可能性がある。なお、微生物は有機物、水分、温度などの影響を受けるため、季節によって微生物相(菌数)が変化すること¹⁰⁾が知られているが、今回の変化は土壌中における微生物相の季節変動の範囲内にあり、バイオグラウトの施工による微生物環境に与える影響は小さいと考えられる。しかし、季節変動の範囲

表-5 試験前後における土壤微生物の菌数測定結果

	札幌		岡山		沖縄	
	試験前	8週間後	試験前	8週間後	試験前	8週間後
細菌	6.6×10 ⁶ 5種類	4.6×10 ⁵ 7種類	8.3×10 ⁶ 6種類	3.8×10 ⁶ 4種類	6.1×10 ⁶ 10種類	2.9×10 ⁵ 6種類
放線菌	1.1×10 ⁶ 5種類	0 0種類	1.1×10 ⁶ 1種類	0 0種類	3.2×10 ⁵ 3種類	0 0種類
菌類 (カビ・酵母)	8.1×10 ⁴ 15種類	2.9×10 ⁵ 10種類	1.3×10 ⁵ 23種類	1.3×10 ⁵ 18種類	2.8×10 ⁴ 11種類	1.2×10 ⁵ 18種類

単位: cfu/g

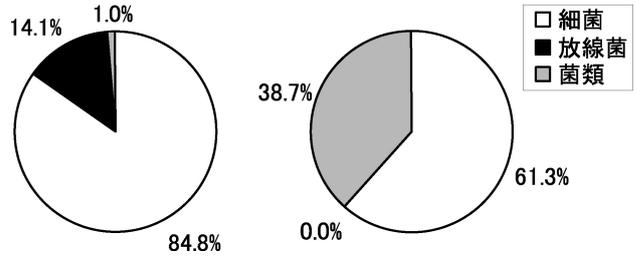


図-9 札幌(4℃)における試験前後の微生物相の変化(左:試験前, 右:試験後)

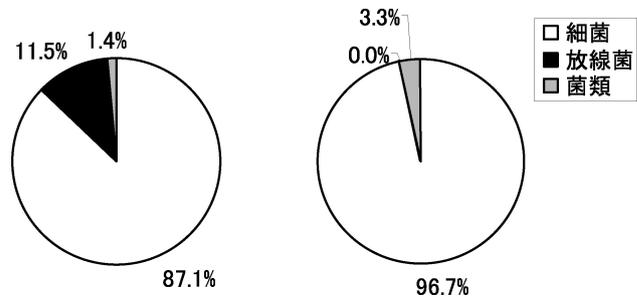


図-10 岡山における試験前後の微生物相の変化(左:試験前, 右:試験後)

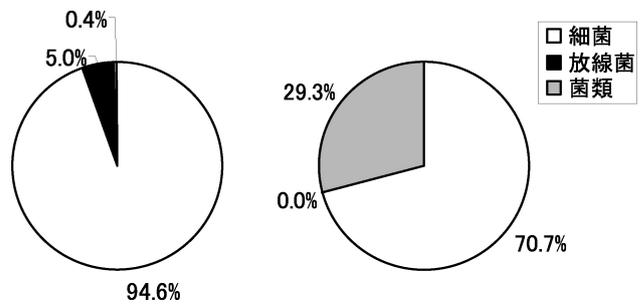


図-11 沖縄における試験前後の微生物相の変化(左:試験前, 右:試験後)

内の変化を議論するためには、もう少し長期間にわたる試験を行う必要がある。今後は室内試験および現場試験などによって、上記の仮説を実際に検証して行く予定である。

表-5の菌数測定結果を用いて、試験前後における微生物相の変化を割合で示したものを図-9~11に示す。これらの図より、細菌は菌数の割合が約24%減少(札幌および沖縄)あるいは10%程度増加(岡山)していること、また、放線菌は全地点において8週間後には確認できなくなること、さらに、菌類(カビ・酵母)は菌数の割合が約30~40%増加(札幌および沖縄)あるいはほぼ一定(岡山)となっていること、などを視覚的に理解することができる。

以上のことから、本論文における試験条件下においては、

各地点の土壌中に生息する細菌と菌類(カビ・酵母)がグルコースの代謝によって二酸化炭素を生成させ、グラウト溶液中の Ca^{2+} 濃度を低下、すなわち、炭酸カルシウムを析出させたものと考えられる。また、8週間後における菌類(カビ・酵母)の菌数増加が著しい札幌と沖縄については、細菌よりも菌類(カビ・酵母)の方が二酸化炭素を生成させ、炭酸カルシウムの析出に寄与した割合が大きいと推察される。

4.4 土壌微生物の遺伝子解析

本論文の主題は微生物の分類学ではなく、かつ、誌面の都合により、ここでは系統樹の記載を省略して推定された細菌および菌類(カビ・酵母)の帰属分類群の結果を表-6および表-7にそれぞれ示す。なお、同表中の表記は *Bacillus axarquiensis* のような「属+種」または *Penicillium janthinellum* Biourge のような「属+種+命名者」となっている。これらの細菌および菌類(カビ・酵母)は、両地点において最も出現頻度が高い菌であり、次のようなことがわかる。

表-6の細菌に関しては、試験前には一番多い細菌が各地点により異なるという地域性を示していたが、8週間後には全地点において *Bacillus* 属となった。また、推定される帰属分類群のバイオセーフティレベル¹¹⁾については、*Arthrobacter* sp.についてはレベルが不明であるが、その他についてはすべてレベル1、すなわち、人間に疾病を起こしたり、あるいは動物に対して獣医学的に重大な疾患を起こしたりする可能性がないものである。

表-7の菌類(カビ・酵母)については、地点および試験前後を問わず、分類学上はすべてカビであると推定された。沖縄については、試験前後において *Aspergillus* sp. と推定され、塩基配列が一致していることから同種である可能性がある。しかし、遺伝子解析を実施した塩基配列数が600 bp程度と、遺伝子全体から見れば極めて狭い部分しか見えていないため、推察の域を超えるものではない。

一般の土壌は、微生物にとっていわゆる飢餓状態にあり、

表-6 細菌の帰属分類群の推定結果

	推定される帰属分類群	
	試験前	8週間後
札幌	<i>Arthrobacter</i> sp.	<i>Bacillus drentensis</i> に近縁な <i>Bacillus</i> sp.
岡山	<i>Bacillus axarquiensis</i> または <i>Bacillus malacitensis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
沖縄	<i>Cupriavidus taiwanensis</i> に近縁な <i>Cupriavidus</i> sp.	<i>Bacillus megaterium</i> に近縁な <i>Bacillus</i> sp.

表-7 菌類(カビ・酵母)の帰属分類群の推定結果

	推定される帰属分類群	
	試験前	8週間後
札幌	<i>Penicillium janthinellum</i> Biourge	<i>Fusarium</i> sp.
岡山	<i>Penicillium raperi</i> に近縁な <i>Penicillium</i> sp.	<i>Penicillium</i> sp.
沖縄	<i>Aspergillus</i> sp.	<i>Aspergillus</i> sp.

その土壌に対して有機物が供給された場合は、多種多様な微生物の間で占有するための激しい競争が生じる。この競争に勝ち定着できるのは、有機物の供給に関する刺激に速やかに反応して休眠から目覚め、個体数を増加させたり、胞子を発芽させたり、菌糸を成長させたりすることができる微生物であると思われる。表-6の *Bacillus* 属の細菌および表-7の *Penicillium* 属、*Aspergillus* 属の菌類は、上記の条件を兼ね備えており¹²⁾、今回の炭酸カルシウムの析出試験において最も出現頻度が高い菌として推定された結果の妥当性を示すものであると考える。

5. ま と め

本論文で得られた主な知見をまとめると、以下に示すとおりである。

- ①北海道から沖縄県までの国内5地点より採取した土壌(微生物)を用いて炭酸カルシウムの析出試験を実施し、試験時における温度の違いが炭酸カルシウムの析出に与える影響について実験的検討を実施した。その結果、 Ca^{2+} 濃度の経時変化において温度依存性、すなわち、温度が高くなるにつれて Ca^{2+} 濃度の低下が大きくなる傾向が見られたが、その程度は地点によって差があること、また、5~35℃の低~中温域において全地点の試験管内における Ca^{2+} 濃度が低下、すなわち、炭酸カルシウムが析出することがわかった。
- ②帯広については、 Ca^{2+} 濃度の経時変化が温度の影響をほとんど受けないことがわかった。すなわち、試験を開始してから1週間以内に溶液中の Ca^{2+} 濃度が温度に関係なく大きく低下したが、これは土壌中に含まれていた SO_4^{2-} が溶出した後に溶液中の Ca^{2+} と結合し、硫酸カルシウムとなって析出した可能性が高いと推定された。
- ③温度25℃における炭酸カルシウムの析出試験の前後において微生物相および菌数の変化について調査した。その結果、菌類(カビ・酵母)の菌数が増加または一定値となっていることから、溶液中の Ca^{2+} 濃度の低下に最も寄与している可能性が高いと推定された。
- ④温度25℃における炭酸カルシウムの析出試験の前後において最も出現頻度が高い菌の遺伝子解析を実施した。その結果、それらは *Bacillus* 属の細菌および *Penicillium* 属や *Aspergillus* 属の菌類であると推定された。
- ⑤以上の結果から、国内の場所を問わずバイオグラウトの施工対象となる土壌中に生息する微生物を利用して、温度5~35℃の低温~中温域においてグラウト溶液中に炭酸カルシウムが析出する見通しが大略得られた。

なお、今回の土壌微生物の菌数測定および遺伝子解析においては、微生物学的に新たな知見が得られたわけではなく、また、本論文の主題である炭酸カルシウム析出に及ぼす温度依存性との間に直接的な関係は存在していない。しかし、炭酸カルシウム法によるバイオグラウトの実用化の

ためには、炭酸カルシウムの析出に際して有用な土壌微生物の菌種と菌数の把握が非常に重要であり、温度25℃に限定された今回の一連の調査によって基礎的な情報の一部を取得することができたと考えている。土壌微生物を、地質工学、地盤工学、資源工学などの分野における未利用資源として考え、今後ともさらなる研究を鋭意進めていきたい。

謝辞 本研究は、日本学術振興会科学研究費補助金基盤研究(B)(課題番号：18300304, 研究代表者：川崎了)および平成18年度北海道ガス大学助成金により行われた。また、土壌微生物の分離・菌数測定および遺伝子解析に関しては、(株)テクノスルガの小出知己氏よりご助言を得た。さらに、日本各地の土壌採取に際しては、以下の関係各位(所属機関は土壌採取時)よりご協力を得た。末筆ながらここに記して、深甚なる感謝の意を表する次第である。石島洋二氏、平井祐次郎氏、清水了氏(以上、(財)北海道科学技術総合振興センター)、荒木肇氏(北海道大学)、高橋宣之氏、丹羽勝久氏(以上、(株)ズコーシャ)、村上章氏(岡山大学)、赤木知之氏、渡嘉敷直彦氏(以上、琉球大学)

引用文献

- 川崎了・村尾彰了・広吉直樹・恒川昌美・金子勝比古(2006)：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.
- 渡邊恒雄(2000)：土にはどんな菌類がいるか, 新・土の微生物(6)生態的にみた土の菌類(日本土壌微生物学会編), 博友社, pp.5-37.
- 内閣府沖縄総合事務局農林水産部土地改良課(2007)：土壌, 沖縄の自然環境, 沖縄の「農」, <http://ogb.go.jp/nousui/nns/c1/page3-3.htm>, 2009年2月22日.
- 鈴木彰(2004)：土壌微生物を制御する水, 空気, 温度, pH, 土壌微生物生態学(堀越孝雄・二井一禎編著), 朝倉書店, pp.20-36.
- 例えば, 土壌微生物研究会(2004)：新編土壌微生物実験法, 養賢堂, pp.15-73.
- ALTSCHUL, S. F., MADDEN, T. L., SCHÄFFER, A. A., ZHANG, J., ZHANG, Z., MILLER, W. and LIPMAN, D. J. (1997) : Gapped BLAST and PSI-BLAST : a new generation of protein database search programs, *Nucleic Acids Research.*, Vol.25, No.17, pp.3389-3402.
- 例えば, 杉山純多・渡辺信・大和田紘一・黒岩常祥・高橋秀夫・徳田元(2002)：新版微生物学実験法, 講談社サイエンティフィック, pp.252-253.
- STUMM, W. and MORGAN, J. J.(1996) : Aquatic chemistry : chemical equilibria and rates in natural waters, John Wiley & Sons, Inc., New York, pp.362-364.
- 石沢修一・鈴木達彦(1979)：土壌微生物の生態, 共立出版, pp.10-45.
- 石沢修一・鈴木達彦(1979)：土壌微生物の生態, 共立出版, pp.80-112.
- 日本細菌学会(2007)：病原細菌に関するバイオセーフティマニュアル(案), 126p.
- VAN ELSAS, J. D., JANSSON, J. K. and TREVORS, J. T. (2007) : Modern soil microbiology, CRC Press, pp.83-146.

(2009年2月24日受付, 2009年9月11日受理)

Jour. Japan Soc. Eng. Geol., Vol.51, No.1, pp.10-18, 2010

Effect of Temperature on Precipitation of Calcium Carbonate using Soil Microorganisms

Satoru KAWASAKI, Satoru OGATA, Naoki HIROYOSHI, Masami TSUNEKAWA,
Katsuhiko KANEKO and Rei TERAJIMA

Abstract

We have been performing fundamental laboratory tests in order to develop a novel conceptual grout, hereafter called biogrout. Hardened biogrout consists primarily of calcium carbonate or silica, typical cement elements in soil and rock. These compounds can fill the voids and cracks in soil and rock using microbial metabolism. This paper reports some test results for biogrout using calcium carbonate and discusses them. We performed a series of precipitation tests on calcium carbonate in test tubes using soil microorganisms sampled from various parts of Japan, examining the effect of temperature on the precipitation of calcium carbonate when testing. As a result, it was indicated that precipitation of calcium carbonate using soil microorganisms occurred at temperatures ranging from 5 to 35°C. Furthermore, we measured the number of soil microorganisms used in the tests and conducted gene analyses of them. The phases of soil microorganisms before testing were compared to those after testing by determining the number of living soil microorganisms, the highest relative frequency of soil microorganisms, and their attributive taxonomical groups. In consequence, it is possible that fungi such as the *Penicillium* and *Aspergillus* species frequently metabolized organic nutrition, and at the same time their number increased via their metabolism.

Key words : microorganism, calcium carbonate, biogrout, temperature