

氏 名(本籍)	あり 有	た 田	こう 康	いち 一
学位の種類	博 士 ( 農 学 )			
学位記番号	農 博 第 8 6 9 号			
学位授与年月日	平 成 1 8 年 3 月 2 4 日			
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当			
研究科専攻	農学研究科環境修復生物学専攻 (博士課程)			
学位論文題目	植物プランクトンの必須栄養元素供給源としての製鋼ス ラグの有効性に関する研究			
論文審査委員	(主 査)	教 授	谷 口	旭
	(副 査)	教 授	佐 藤	實
		教 授	三 枝	正 彦

# 論文内容要旨

## 1. はじめに

鉄は光合成や呼吸における電子伝達、硝酸還元、クロロフィルの生合成などに必要なため、植物プランクトンにとって必須の元素である。しかし、海洋表層のような酸化的で弱アルカリ性の環境においては、短時間のうちに難溶性の沈殿を生じてしまうためその生物学的有用性は著しく低下する。それゆえ、全鉄濃度が高い沿岸水においてさえも、植物プランクトンは潜在的に鉄制限を受けているといわれている。さらに陸圏からの供給が及びにくい外洋域では、鉄制限がより強く発現しており、マクロ栄養塩が豊富であるにもかかわらず植物プランクトン量が少ない海域が存在する。また、沿岸域における環境問題の一つとして、アンモニア態窒素が大量に残存し、リンが相対的に少ない処理済都市廃水が流入することによる栄養塩バランスの崩壊と基礎生産の低下が指摘されている。

これらの栄養塩環境を改善する手段の一つとして、我々の研究室では製鉄過程で大量に副生する製鋼スラグに注目してきた。なぜなら製鋼スラグには、鉄をはじめリンやケイ素といった植物プランクトンの必須栄養元素が含まれているため、上記のようにアンバランスな栄養塩環境を整えることができると期待されるからである。この考えに基づき、我々の研究室では植物プランクトン自然群集に対する製鋼スラグ添加効果を明らかにしてきた。しかし、様々な生物種が含まれる自然群集に対する結果であるため、製鋼スラグに由来する元素を植物プランクトンが利用して増殖できるのか否かについては明確ではない。

そこで本研究では、培養株を用いたバイオアッセイにより、製鋼スラグ由来元素の有効性を直接的に確認することを目的とした。

## 2. 材料と方法

供試製鋼スラグには鉄成分を多く含有する脱炭スラグを選び、粒径 5–20  $\mu\text{m}$  の粉碎粒子（スラグ）を用いた。その成分組成は、Total Fe・17.9%、 $\text{P}_2\text{O}_5$ ・2.1%、 $\text{SiO}_2$ ・14.1%、CaO・43.4%、MnO・3.4%、MgO・8.6%、S・0.07%、 $\text{Al}_2\text{O}_3$ ・2.8%、 $\text{TiO}_2$ ・2.8% および others・6.9% であった（東北大学工学部日野研究室調べ）。

培養容器には、蛍光光度計用ガラス製キュベット (25 mm×150 mm GLASS TEST TUBE, PYREX<sup>®</sup> USA) を使用した。供試株の増殖は、キュベットを直接、蛍光光度計 (MODEL 10-AU-005, TURNER DESIGNS) に差し込むことで測定可能な *in vivo* chlorophyll *a* 蛍光値 (蛍光値) により毎日記録した。それぞれの供試株は、鉄無添加の培地で 3 日間前培養して得られる対数増殖期後期の細胞群を、蛍光値が 1 前後となるように各実験区に接種した。なお、各実験区は原則 3 本だてとし、結果はその平均値で示した。

## 2.1 製鋼スラグ由来元素の植物プランクトン必須栄養元素としての可能性

海水中の溶存鉄濃度は非常に低濃度であり、またその存在状態により生物学的有用性は左右されるため、測定・分析には特殊技術を要する。さらに、スラグからの鉄の溶出特性は明らかではないため、その有効性を分析化学的手法によって評価するのは困難である。そこで、いわゆるバイオアッセイを行った。具体的には、人工海水培地の ESAW 培地 (Harrison *et al.*, 1980) に鉄源としてスラグを添加し、供試珪藻 *Thalassiosira guillardii* の増殖応答を判定基準としてスラグ由来鉄の有効性を評価することとした。

スラグに含有されている鉄が全て溶出すると仮定した場合、約 2 mg/L のスラグ添加によって ESAW 培地の規定鉄濃度 (6.6  $\mu$ M Fe) を与えることができる。ところで、スラグ由来鉄の効果を評価するためには、同時に溶出すると考えられるリンおよびケイ素による影響を回避する必要がある。そこで、リンおよびケイ素の濃度を規定濃度 (20  $\mu$ M P, 105.6  $\mu$ M Si) の 1.5 倍に改変した鉄無添加の ESAW 培地 (PSi 1.5 培地) を調製し、これを基礎培地とした。この培地に鉄源としてスラグを 2 mg/L から 50 mg/L まで 5 段階の濃度で添加したスラグ添加区 (Slag 2 区、Slag 10 区、Slag 20 区、Slag 30 区、Slag 50 区) を設定した。これらスラグ添加区の理論上の鉄濃度に相当する無機鉄添加区として、FeCl<sub>3</sub> 添加区 (FeCl<sub>3</sub> 1 区、FeCl<sub>3</sub> 5 区、FeCl<sub>3</sub> 10 区、FeCl<sub>3</sub> 15 区、FeCl<sub>3</sub> 25 区) を設けた。さらに、理想的な増殖が期待されるコントロール区として、規定濃度の FeEDTA 溶液 (6.6  $\mu$ M Fe, 9.8  $\mu$ M EDTA) を添加した FeEDTA 区、および鉄のコンタミによる影響を確認するための鉄無添加

区 (Non Fe 区) を設けた。

次いで、PSi 1.5 培地に鉄源として規定濃度の FeEDTA 溶液を等倍、1/10 倍、1/100 倍および 1/1000 倍に希釈して添加した実験区 (FeEDTA 区、1/10 FeEDTA 区、1/100 FeEDTA 区、1/1000 FeEDTA 区) および鉄無添加区により *T. guillardii* の鉄要求を調べ、生物学的に有用な鉄がスラグからどの程度溶出するのかを推定した。

またさらに、リンもしくはケイ素濃度を段階的に改変し、鉄無添加で調製した ESAW 培地に鉄源としてスラグを添加することで、同時に添加されたことになるスラグ由来リンもしくはケイ素の有効性についても評価した。

## 2.2 処理済都市廃水存在下における製鋼スラグ由来元素の有効性

処理済都市廃水 (処理廃水) の流入により窒素過多となった栄養塩環境の改良材としてスラグを利用することを想定し、スラグおよび処理廃水に由来する元素の有効性を評価した。なお、以下のスラグ添加区は Slag 20 区および Slag 50 区とした。

処理廃水中に残存する窒素は主にアンモニア態窒素であるため、ESAW 培地の窒素源をアンモニア態窒素 ( $\text{NH}_4$ ) に改変した (改変 ESAW 培地)。供試株の *T. guillardii* を培地に馴化させた後、アンモニア態窒素条件下におけるスラグ由来の鉄、リンおよびケイ素の有効性をあらためて評価した。

次いで、処理廃水 (Sewage) に由来する元素を利用して *T. guillardii* が増殖できるか否かを確認するために、鉄および窒素無添加でリンおよびケイ素濃度が異なる 3 種類の培地を調製した。窒素および鉄を評価する場合には、改変 PSi 1.5 培地 (リンおよびケイ素濃度が ESAW 培地規定濃度の 1.5 倍) を使用した。そして、リンを評価する場合には改変 P 0 培地 (リン無添加、ケイ素濃度が 1.5 倍) を、ケイ素を評価する場合には改変 Si 0 培地 (ケイ素無添加、リン濃度が 1.5 倍) をそれぞれ使用した。これらの培地に異なる窒素源 ( $\text{NH}_4$ , Sewage, Non N) および鉄源 (FeEDTA, Non Fe) を添加することにより合計 13 実験区を設定した。処理廃水の添加量は、ESAW 培地の規定窒素濃度 ( $549.1 \mu\text{M N}$ ) と同程度のアンモニア態窒素濃度になるように 40% (v/v) とし、人工海水の塩分ベースおよび蒸留水により塩分調整を行った。

なお、NH<sub>4</sub> を添加した改変 P<sub>Si</sub> 1.5 培地の FeEDTA 添加区を Control 区、鉄無添加区を Non Fe 区とした。

以上の結果をふまえ、スラグと処理廃水とを同時に添加した場合のスラグ添加効果について評価した。

### 2.3 沿岸自然海水における製鋼スラグ由来鉄の有効性

自然生態系へのスラグ利用を想定した場合、自然海水由来の諸成分が存在している条件下で、スラグ由来元素が多種類の植物プランクトンの増殖に有効であることを確認しておくことが重要である。とりわけ鉄については、沿岸自然海水中にすでに十分量存在する可能性があり、さらにキレート作用のある溶存有機物による影響も懸念される。そこで、沿岸自然海水に由来する成分の存在下におけるスラグ由来鉄の有効性を確認した。

自然海水強化培地である ESNW 培地 (Harrison *et al.*, 1980) を鉄無添加で調製し (ESNW-Fe 培地)、鉄源としてスラグを 20 mg/L 添加した (ESNW-Fe+Slag 区)。また、鉄およびリン無添加の培地 (ESNW-FeP 培地) にもスラグを添加した (ESNW-FeP+Slag 区)。これら 2 種類の培地は、鉄が制限的な環境もしくは窒素が過剰な環境を再現しているものとし、それぞれに鉄無添加区 (ESNW-Fe 区、ESNW-FeP 区) を設けて比較した。さらに、規定濃度の FeEDTA を添加して標準的に調製した ESNW 培地は、富栄養で増殖に理想的な環境を再現するコントロール区として設定した (ESNW 区)。

なお、供試株とした合計 5 種の植物プランクトン培養株は、珪藻綱 *Thalassiosira pseudonana* および *Skeletonema costatum*、プリムネシウム藻綱 *Isochrysis* sp.、クリプト藻綱 *Rhodomonas salina*、プラシノ藻綱 *Tetraselmis tetrathele* である。

## 3. 結果と考察

### 3.1 製鋼スラグ由来元素の植物プランクトン必須栄養元素としての可能性

珪藻 *Thalassiosira guillardii* は、コントロール区にあたる FeEDTA 区で

は 1 日目から増殖しているのに対し、鉄無添加の Non Fe 区では期間を通して増殖していない (Fig. 1a)。このことから、*T. guillardii* の増殖に寄与するほどの鉄のコンタミはなかったことがわかる。一方、鉄源として脱炭スラグを 20 mg/L (Slag 20 区) 以上添加することにより、*T. guillardii* は規定鉄濃度 (6.6  $\mu\text{M}$  Fe) の FeEDTA 区と同等の増殖を示した (Figs. 1d-1f)。これにより、スラグに由来する鉄は生物学的に有用であることが明らかとなった。

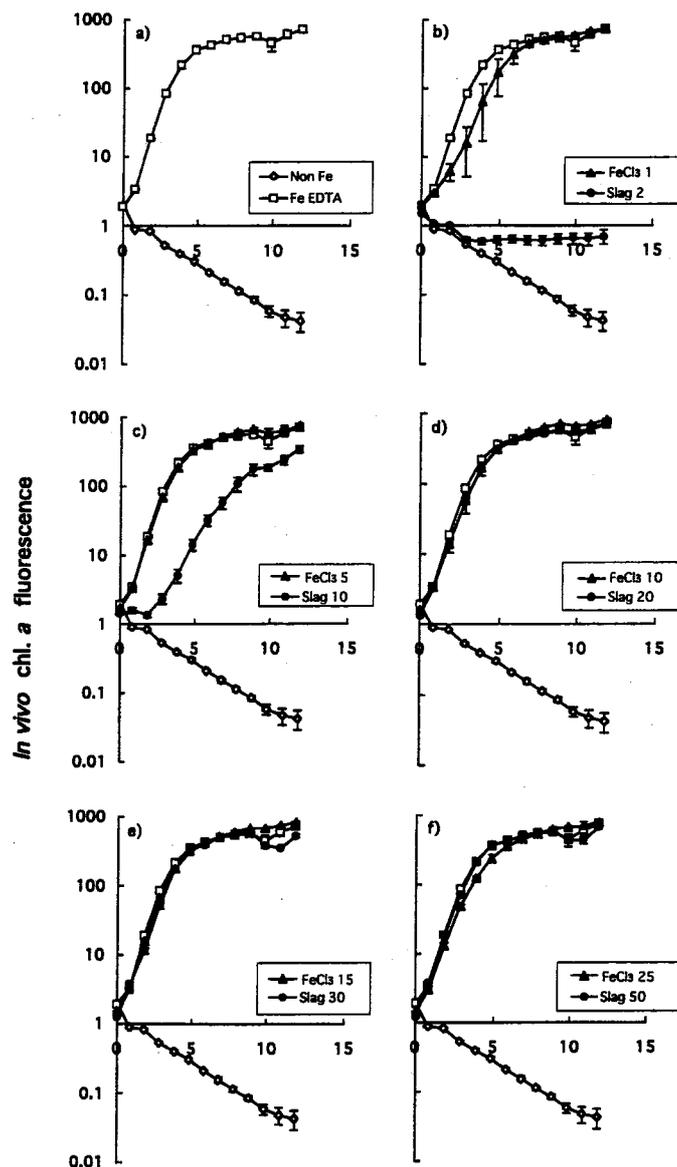


Fig. 1. Variations of *in vivo* chlorophyll *a* fluorescence of *Thalassiosira guillardii* under the enrichment with different amounts of decarburization steelmaking slag or FeCl<sub>3</sub> in PSI 1.5 medium (a modified ESAW medium with 30  $\mu\text{M}$  of phosphorus and 158.4  $\mu\text{M}$  of silicon).

また、本培養実験条件下において *T. guillardii* の増殖が律速する鉄濃度は、規定濃度の 1/1000 から 1/100 (6.6 nM Fe - 66 nM Fe) に存在し、FeEDTA 区と同等の増殖を示すには規定濃度の 1/10 以上つまり 0.66  $\mu$ M (1/10 FeEDTA 区) 以上の鉄が必要であることも明らかとなった (Fig. 2)。

以上より、スラグを 20 mg/L 添加した場合には、その鉄含有量 (66  $\mu$ M Fe) のうち少なくとも 1% が生物学的に有用な鉄として供給されていたと推定された。

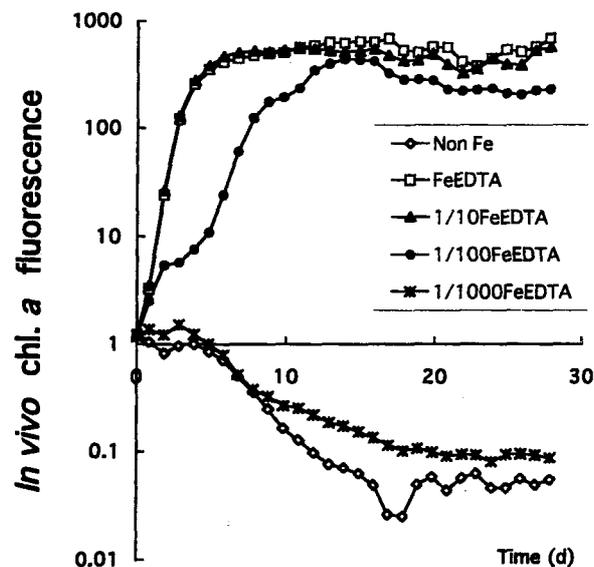


Fig. 2. Variations of *in vivo* chlorophyll a fluorescence of *Thalassiosira guillardii* in PSI 1.5 media added with different amounts of FeEDTA.

さらに、生物学的に有用なリンも鉄と同時にスラグから供給されることが明らかとなった (Fig. 3)。各培地のスラグ添加区と FeEDTA 区との増殖様を比較すると、スラグを 50 mg/L 添加した場合 (Slag 50 区) には、培地リン濃度の差分にあたる 10  $\mu$ M 未満のリンが供給されていたと推定され、これはリン含有量の 68% 未満に相当した。

一方、ケイ素もまた鉄と同時に供給される可能性が示されたが、コンタミの影響が大きく定量的な評価は困難であった。

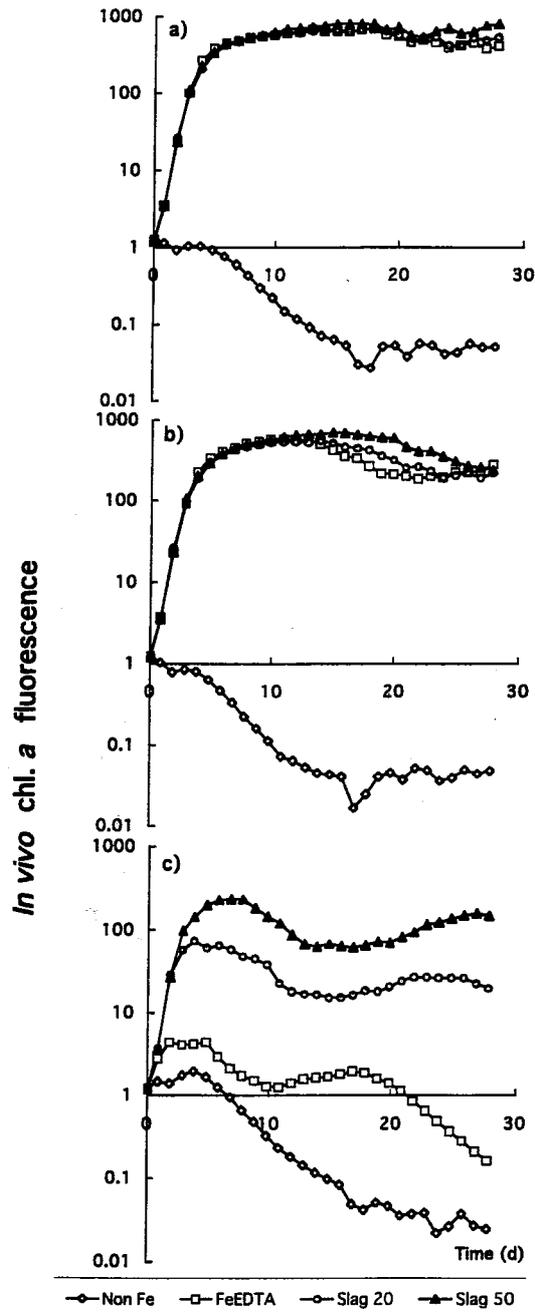


Fig. 3. Variations of *in vivo* chlorophyll *a* fluorescence of *Thalassiosira guillardii* in modified ESAW media containing excess silicon and three different concentrations of phosphorus with addition of two different amounts of decarburization steelmaking slag or FeEDTA.

a) P 1 medium with 20  $\mu\text{M}$  of phosphorus and 158.4  $\mu\text{M}$  of silicon;

b) P 0.5 medium with 10  $\mu\text{M}$  of phosphorus and 158.4  $\mu\text{M}$  of silicon;

c) P 0 medium with no phosphorus and 158.4  $\mu\text{M}$  of silicon.

### 3.2 処理済都市廃水存在下における製鋼スラグ由来元素の有効性

アンモニア態窒素に改変した ESAW 培地においても、スラグ由来の鉄、リンおよびケイ素は *T. guillardii* の増殖に有効であることを確認した。

一方、処理廃水中の窒素、鉄、リンおよびケイ素もまた有効であった (Fig. 4)。改変 P<sub>Si</sub> 1.5 培地において処理廃水由来窒素を評価する Sewage-FeEDTA 区の最大蛍光値は、Control 区の 0.87 倍であり、また、対数増殖期後期の延長がみられた (Fig. 4a)。その原因として、処理廃水を窒素源とすることにより Control 区よりも高濃度となったアンモニア態窒素による増殖阻害が考えられた。この処理廃水添加区を基準とすると、改変 P<sub>Si</sub> 1.5 培地において処理廃水由来鉄を評価する Sewage-Non Fe 区 (Fig. 4a)、および改変 P<sub>0</sub> 培地において処理廃水由来リンを評価する Sewage-FeEDTA 区 (Fig. 4b) の最大蛍光値は、それぞれ 0.66 倍および 0.23 倍であった。以上のことから、処理廃水に由来する生物学的に有用な鉄およびリンは、窒素に対して相対的に不足していることが明らかとなった。

さらに、改変 P<sub>Si</sub> 1.5 培地に窒素源として処理廃水を、鉄源としてスラグを同時に添加した Sewage-Slag 50 区 (Fig. 5a) の最大蛍光値は、処理廃水のみを添加した実験区 (Sewage-Non Fe 区、Fig. 4a) の 1.4 倍となった。すなわち、処理廃水存在下においてもスラグ由来鉄は有効であり、処理廃水に不足する鉄を補えることが明らかとなった。また、改変 P<sub>0</sub> 培地に同時添加した Sewage-Slag 20 区および Sewage-Slag 50 区 (Fig. 5b) の最大蛍光値はともに、処理廃水単独添加区 (Sewage-FeEDTA 区、Fig. 4b) の 1.3 倍となった。すなわち、不足していたリンもまたスラグにより補われることが明らかとなったが、スラグ単独添加時にみられた添加量に伴う最大蛍光値の増加 (Slag 20 区に対して Slag 50 区は 1.6 倍) はなかった。

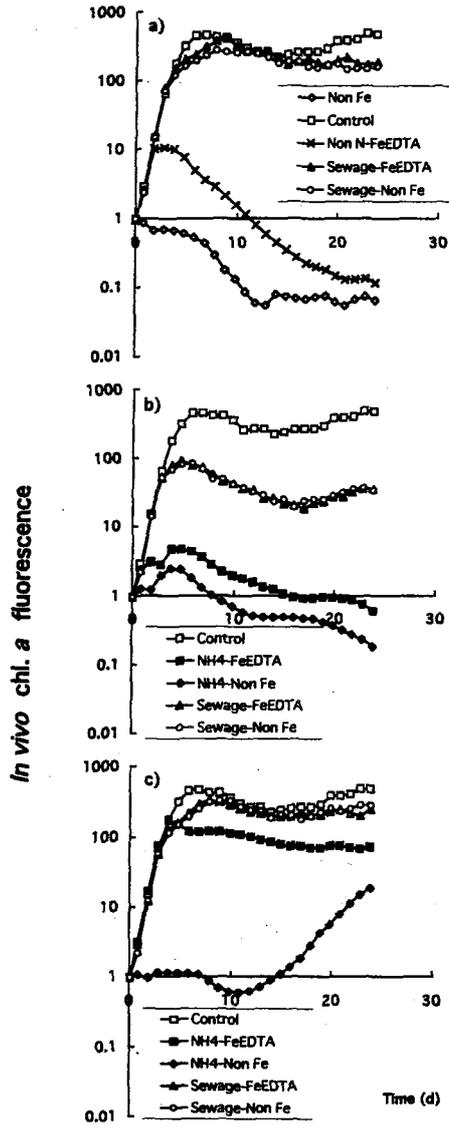


Fig. 4. Variations of *in vivo* chlorophyll *a* fluorescence of *Thalassiosira guillardii* in modified ESAW media containing treated urban sewage at amount of 40% (v/v).  
 a) modified PSI 1.5 medium with no ammonium; b) modified P 0 medium with no ammonium; c) modified SI 0 medium with no ammonium.

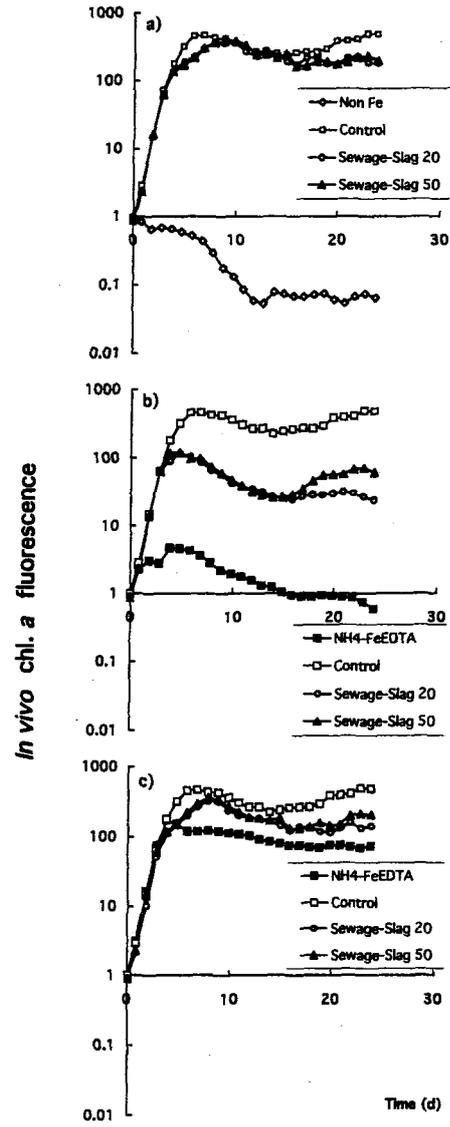


Fig. 5. Variations of *in vivo* chlorophyll *a* fluorescence of *Thalassiosira guillardii* in modified ESAW media containing treated urban sewage at amount of 40% (v/v) with addition of two different amounts of decarburization steelmaking slag.  
 a) modified PSI 1.5 medium with no ammonium; b) modified P 0 medium with no ammonium; c) modified SI 0 medium with no ammonium.

### 3.3 沿岸自然海水における製鋼スラグ由来鉄の有効性

鉄無添加の ESNW-Fe 区および ESNW-FeP 区において、珪藻 2 種を含む合計 5 種の植物プランクトン培養株全ての増殖が低く抑えられた (Fig. 6)。つまり本培養実験条件下においては、自然海水に由来する生物学的に有用な鉄が十分に低濃度であることが確認された。一方、スラグ添加区 (ESNW-Fe+Slag 区、ESNW-FeP+Slag 区) における供試株それぞれの比増殖速度は、コントロール区にあたる ESNW 区とほぼ同等であった。すなわちスラグ由来鉄は、自然海水由来の諸成分と共存したときにも有効であり、様々な種類の植物プランクトンからなる自然群集に対して有効であることが期待できる。さらに、珪藻 2 種 (Figs. 6a and 6b) は他種に比べて高い増殖速度を維持していたことから、スラグ添加により鉄制限が解除された場合には、自然群集においても珪藻類がいち早く反応して優占する可能性が示された。

## 4. まとめ

植物プランクトン培養株を用いたバイオアッセイにより、脱炭スラグ由来の鉄、リンおよびケイ素が生物学的に有用であることが明らかとなった。さらに、スラグ由来鉄は様々な溶媒条件下でも有効であり、珪藻以外の植物プランクトンの増殖にも有効であった。また、リンの溶出・利用効率は鉄に比べて良いことが推定されたが、植物プランクトンの体元素組成比を示すレッドフィールド比 ( $C:N:P:Si:Fe = 106:16:1:15:0.001$ ) から考えれば、鉄に比べてリンはむしろ相対的に不足していた。換言すれば、リンは比較的短時間でスラグから供給され、鉄はより長く供給され続ける可能性があるということになる。さらに、スラグ由来ケイ素もまた有効であることが示されたことから、相対的に窒素が過剰な水域においては、珪藻類のブルームにあわせてスラグを利用することにより、新たな環境負荷を低く押さえつつ、基礎生産を回復もしくは向上させることが期待できる。

以上のことから、製鋼スラグは植物プランクトンの必須元素供給源として有効であり、栄養塩環境改良材として利用できる可能性が確認できた。ただし、実海域での利用に際しては、その栄養塩環境を改善するのにふさわしい製鋼ス

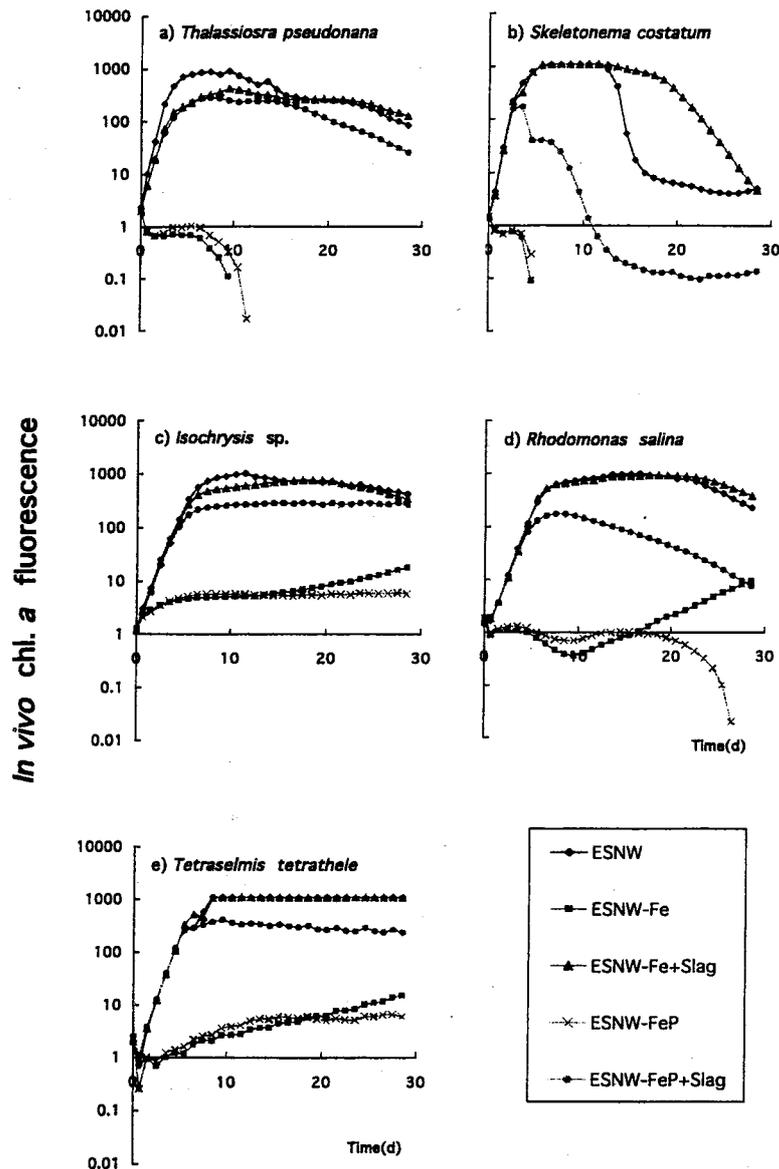


Fig. 6. Variations of *in vivo* chlorophyll *a* fluorescence of five phytoplankton species (a-e) on five treatments. ESNW (◆): a standard ESNW medium; ESNW-Fe (■): a modified ESNW medium without FeEDTA; ESNW-Fe+Slag (▲): enriched with decarburization steelmaking slag (20 mg/L); ESNW-FeP (×): a modified ESNW medium without FeEDTA and phosphorus; ESNW-FeP+Slag (●): enriched with decarburization steelmaking slag (20 mg/L).

ラグを選定し、様々な生物群集に対する影響を長期にわたり慎重にモニタリングする必要がある。

## 5. 参考文献

Harrison, P. J., R. E. Waters and F. J. R. Taylor, 1980. A broad spectrum artificial seawater medium for coastal and open ocean phytoplankton.

J. Phycol., 16 : 28 - 35

## 論文審査結果要旨

海水中における鉄の無機的な溶解度は極めて低く、難溶性の水酸化物を形成するため、溶存態の鉄濃度は低い。さらに、有機錯体など多様な化学形態をとるが、その分布や植物プランクトンの利用可能な形態など未解明なことが多い。これらのことから、植物プランクトンは、鉄供給源の限られる外洋域では量的な、全鉄濃度が高い沿岸海域でも質的な鉄制限を受けているといわれている。また、沿岸海域では、処理済都市廃水の放流によって窒素過多の過栄養環境が拡大している。本研究は、製鋼スラグによって海域の鉄制限を解除することをめざし、スラグ溶出成分の生物学的有用性を植物プランクトン培養株によるバイオアッセイで確認したものである。培養容器に蛍光光度計用のキュベットを用いることで、数多くの実験区を効率良くモニタリングすることが可能となった。培養系内へ添加したスラグは、粒径 5-20 $\mu\text{m}$  の脱炭スラグ粉碎粒子であった。

第一章および第二章では、人工海水培地（ESAW 培地）の窒素源を硝酸態あるいはアンモニア態窒素とし、試薬の鉄、リンおよびケイ素で適宜改変した培地とスラグ添加培地とにおける珪藻 *Thalassiosira guillardii* の増殖曲線を比較した。その結果、硝酸態かアンモニア態かの別に拘わらず、窒素源が十分に存在するときには、スラグ由来の各元素が有効であった。このとき、スラグに含有されていた鉄およびリンのそれぞれ 1% および 68% 程度が溶出利用されたことも明らかになった。さらに、処理廃水を窒素源とした場合には、廃水に不足していた鉄およびリンがスラグから補われる可能性も示された。

第三章では、沿岸域の自然海水を栄養塩強化した培地（ESNW 培地）を用いて同様の実験をし、本培養系内では自然海水に由来する生物学的に有用な鉄は不十分であること、そこへスラグを添加すると溶出鉄が有効に働くことを確認した。この結果は、珪藻 2 種およびプリムネシウム藻、クリプト藻およびブラシノ藻 1 種、計 5 種類の植物プランクトンで確かめられたので、スラグに由来する鉄が多く種の種にとって有効であると期待される。

以上の実験はいずれも周到なデザインと精緻な技法で実施され、信頼度の高い結果を得た。この成果は、栄養塩環境の修復や海域の基礎生産力向上の基礎になるものであり、将来への貢献度は大きいものと期待され、審査委員一同は博士（農学）の学位を授与するに値すると判断した。