

平成23年度

環境研究総合推進費補助金 研究事業

総合研究報告書

製鋼スラグと腐植物質による生態系修復技術の受容性と

環境リスクの総合評価

(K2134), K22053, K2350

平成23年3月

(代表研究者) 産業技術総合研究所 駒井 武

国立環境研究所 肴倉 宏史

北海道大学大学院 福嶋 正巳

東京大学 山本 光夫

補助事業名	平成23年度環境研究総合推進費補助金研究事業
所 管	環境省
国庫補助金	58,612,000円
研究課題名	製鋼スラグと腐植物質による生態系修復技術の受容性と環境リスクの総合評価
研究期間	平成21年4月28日～平成24年3月31日
代表研究者	駒井 武（独立行政法人産業技術総合研究所）
共同研究者	肴倉宏史（独立行政法人国立環境研究所） 福嶋正巳（国立大学法人北海道大学） 山本光夫（国立大学法人東京大学） 川辺能成（独立行政法人産業技術総合研究所） 竹内美緒（独立行政法人産業技術総合研究所） 原 淳子（独立行政法人産業技術総合研究所）

総合研究成果報告書

平成23年度環境研究総合推進費補助金研究事業

製鋼スラグと腐植物質による生態系修復技術の受容性と環境リスクの総合評価

(目次)

1. 研究目的および目標	-----	(1)
2. 研究内容および方法	-----	(1)
3. 研究成果の概要	-----	(2)
4. 研究結果と考察	-----	(4)
4. 1 製鋼スラグと腐植物質の相互作用と環境リスク評価	-----	(4)
4. 1. 1 製鋼スラグと腐植物質の相互作用および長期溶出特性	----	(4)
4. 1. 2 製鋼スラグからの鉄溶出における微生物作用	-----	(19)
4. 1. 3 環境安全品質に関する技術指針の提案	-----	(62)
4. 2 腐植物質の構造解析に基づく共存金属の環境挙動	-----	(70)
4. 2. 1 溶存有機物の構造と鉄(II)に対する錯形成能	-----	(73)
4. 2. 2 溶存有機物の分子量分画とそれらの鉄(II)錯形成能	----	(92)
4. 2. 3 海水溶存有機物と鉄(II)との錯体の生物利用性	-----	(105)
4. 3 腐植酸鉄の生成機構および実海域での実証的検討	-----	(133)
4. 3. 1 製鋼スラグと腐植様物質の海水への溶出特性評価	----	(134)
4. 3. 2 海藻生育試験による鉄添加効果の検討	-----	(144)
4. 3. 3 実海域での実証的検討	-----	(150)
4. 3. 4 実証試験の現場検証	-----	(156)
5. 結論と課題	-----	(166)
6. 研究発表等	-----	(170)

1. 研究目的

沿岸海域における磯焼けなどの生態系を修復する手法として、海水中の溶存鉄の不足に着目した製鋼スラグと腐植物質による磯焼け回復技術の開発とその実証が注目されている。この回復効果には腐植物質と2価鉄の錯形成の寄与が示唆されるが、詳細なメカニズムや長期安定性は明らかになっていない。一方、製鋼スラグにはふっ素、ほう素、鉛などの有害元素が含まれ、有害金属の環境中の動態や生態系への影響に関する環境リスクの側面も重要である。このため、製鋼スラグと腐植物質の相互作用により、環境中で可溶性のフルボ酸鉄を新たに生成させる溶出メカニズムを解明し、海域の藻場再生を促進させるための化学的、生物学的な検討に基づき、循環型社会に適合した生態系修復技術を開発する。

本研究では、磯焼け回復メカニズムの解明をもとに、腐植物質の分画・構造解析と腐植酸鉄の生成に及ぼす微生物の役割を明らかにし、可溶性のフルボ酸鉄の生成促進や環境中の長期安定性を検討する。また、これらの基盤研究で集積された知見に基づき、開発した技術の環境安全性や環境リスクの総合評価を行い、生態系修復技術としての受容性と環境リスクの両面を重視した技術指針の作成に必要な基盤データを構築する。さらに、製鋼スラグと腐植物質を活用した生態系修復技術の評価を可能にするため、循環資材の検査試験法および環境安全品質基準を提示する。

2. 研究方法

製鋼スラグと腐植物質を用いた生態系修復技術の社会受容性と環境リスクに関する総合的な評価を可能にするため、以下の研究を実施する。

(1) 製鋼スラグと腐植物質の相互作用と環境リスクの評価（産業技術総合研究所・国立環境研究所）

様々な種類と性状の製鋼スラグを用いて鉄および有害成分の溶出特性を検討し、環境微生物の観点から腐植物質との相互作用に関する基礎試験を実施する。また、海域を模擬した環境条件下で製鋼スラグと腐植物質の長期安定性の評価を行い、溶出メカニズムの検討に基づいて、腐植物質の共存条件下での有害元素の溶出と環境挙動を明らかにする。製鋼スラグの有効活用と環境影響については、国立環境研究所を中心に環境リスクの評価が実施されている。この検討と本研究の成果を基礎にして、人や生態系への環境リスクに関わる種々のデータを集積し、産業技術総合研究所と国立環境研究所が共同で環境安全性に関わる技術的な指針を作成する。

(2) 腐植物質の構造解析に基づく共存金属の環境挙動（北海道大学）

腐植物質中のフルボ酸、フミン酸の分画と錯体形成に関して、その経年変化とその詳細な構造分析に関する検討を行い、フルボ酸・フミン酸分画中のどの成分が最も早く溶出し、磯焼け回復効果へ寄与しているかを明らかにする。また、溶存鉄との錯体形成挙動の分析と共存金属の存在・挙動についての検討を行う。

(3) 腐植酸鉄の生成機構および実海域での実証的検討（東京大学）

(1), (2)で得られた知見をもとに、最適な腐植物質と二価鉄の量を推定し、腐植酸鉄（フルボ酸鉄）の生成機構の解明と生成促進の検討を行う。また、海藻生育水槽実験を行い、最適条件の確認および環境モニタリングを行う。実証試験は北海道内で実際の磯焼け海域の海水が利用できる水槽を利用して行い、海藻としてはコンブやアオサを用いて海藻の種類の違いによる修復効果を評価する。

3. 研究成果の概要

製鋼スラグと腐植物質の相互作用と環境への影響に関して、二価鉄などの有用成分の溶出特性や錯体形成に関する室内実験、海洋を模擬した実証実験および環境リスクに関する総合評価を行い、以下の具体的な成果を得た。

平成21年度は、様々な製鋼スラグを使用して鉄および有害成分の溶出特性を検討し、環境微生物の観点から腐植物質との相互作用を解明したほか、環境リスクの同定とその定量的なリスク評価を可能にした。また、アルカリ水溶液で抽出される腐植物質と海水により抽出される腐植物質の錯体形成に関して、その詳細な構造分析結果を比較検討して、鉄錯体の生成機構を明らかにした。さらに、海洋を模擬した試験を北海道内で行い、腐植酸鉄の生成機構と生成促進に関する基礎データを集積した。また海藻生育実験により最適な腐植物質と二価鉄の定量的な関係を明らかにした。

平成22年度は、海域を模擬した試験により製鋼スラグと腐植物質の長期安定性の評価を行い、溶出メカニズムの検討に基づいて、腐植物質の共存条件下での有害元素の溶出と環境挙動を明らかにした。また、海水で抽出される腐植物質の溶出速度と溶出成分の構造的特色的変化について実験的に検討し、磯焼け回復効果における製鋼スラグと腐植物質の定量的な寄与を明らかにした。さらに、製鋼スラグと腐植物質の生態系修復効果に関して、海藻生育水槽実験により最適条件の確認を行い、実海域での実証実験の環境モニタリングにより各種データを集積した。

平成23年度は、製鋼スラグと腐植物質を用いた生態系修復技術の優位性と人や生態系への環境リスクに関わる各種データを集積し、循環型社会構築の観点から製鋼スラグと腐植物質を用いた技術の受容性と環境安全性に関わる技術的な指針を作成した。また、微生物反応を考慮した腐植物質と溶存鉄との錯体形成メカニズムの解明と共存金属の存在・挙動についての検討を行い、実環境における環境挙動を考慮に入れた各種データを解析した。さらに、磯焼け発生海域の実海水を用いた水槽実験や実証試験のモニタリング等を実施し、海藻の種類の違いや環境条件による修復効果の影響等を評価し、その結果を技術的な指針として反映させた。

製鋼スラグと腐植物質の相互作用と環境リスクの評価に関する研究では、室内試験や海域での実証試験を通じて生態系修復メカニズムを提示することができた。製鋼スラグと腐植物質を併用することにより、ワカメや昆布の生育に必須の二価鉄および栄養塩の

溶出が促進され、生態系修復の相乗効果が大きいことが分かった。また、製鋼スラグと腐植物質の相互作用により、単独の使用の場合と比べて鉛やヒ素、クロムなどの重金属の溶出が抑制され、人や生態系への環境影響が大幅に軽減されることも新たに判明した。また、腐植物質の構造解析に基づく共存金属の環境挙動の研究では、製鋼スラグと腐植物質の活用により相互作用を定量的に評価する分析手法を確立し、微生物反応を考慮した腐植物質と溶存鉄の錯体形成メカニズムを明らかにすることができた。これにより、海域の実環境において海藻類および海草類への鉄錯体の取り込みの形態やその便益を定量的に評価することが可能となった。さらに、腐植酸鉄の生成機構および実海域での実証的検討では、実際の海洋モニタリングや海洋環境を模擬した水槽試験により、製鋼スラグと腐植物質の配合比を変化させた実証的な研究を実施し、上記の基礎試験によって得られた相互作用や錯体形成の効果を検証することができた。実海域での環境モニタリングでは、海藻の種類の違いや環境条件による修復効果を確認するとともに、得られた各種データを用いて受容性と環境リスクの総合評価に関する技術的な指針を作成することができた。

4. 研究成果の詳細

4. 1 製鋼スラグと腐植物質の相互作用と環境リスク評価

4. 1. 1 製鋼スラグと腐植物質の相互作用および長期溶出特性

4. 1. 1. 1 目的

製鋼スラグと腐植物質の相互作用においては、海洋生態系への影響の観点から、有害重金属をはじめとする他の成分に対する作用についても検討をしておくことが重要である。

そこで、製鋼スラグと腐植物質として、電気炉酸化スラグと堆肥中の金属含有量を分析するとともに、それらの配合比を変更して溶出試験を行い、各種成分の溶出濃度への影響を検討した。溶出試験では、溶媒として純水の他に海水も用いることで、海水による相互作用への影響も併せて検討することとした。

また、実際の海域では pH の上昇は限定的と考えられることから、純水浸漬および海水浸漬による1年間の静置溶出試験、ならびに、pH の上昇を抑えるために酸を添加しながらのシリアルバッチ試験を行い、主に重金属類の溶出挙動について評価を行った。

4. 1. 1. 2 研究の概要

純水または海水を用いて、あらかじめ所定量の堆肥を4日間浸漬したものに製鋼スラグを混合することによる溶出試験を行った。溶出試験は、製鋼スラグを混合後に反復振とうで6時間行い、固液分離後の残渣に再び純水または海水を入れて30日間静置し、再び固液分離後に純水または海水を入れ42日間静置し、一つの試料から合計3回の溶出液を得た。

その結果、純水溶媒、海水溶媒の場合ともに、堆肥とスラグが相補的に溶出を抑制させる方向で働く傾向が見られ、海水、堆肥、スラグの相互作用によっても有害物質の溶出を促進する傾向は特に見られなかった。TOC濃度は堆肥量が多いほど高くなる傾向にあり、3000 rpm・20分間の遠心分離操作によっても濃度の変化しない分画であることが確認された。鉄は、堆肥浸漬液で堆肥量が多いほど高濃度であったが、スラグ投入後は定量下限以下 (<0.05 mg/L) またはその付近まで低下した。

次に、溶媒として純水または海水を用いて、堆肥と製鋼スラグを所定の割合で混合し、42日目までに溶媒の入れ替えを3回行ったものについて、1年間の長期静置溶出試験を行った。また、海水中で実現象として想定される pH 上昇の抑制や海流による洗い出しの影響を調べるために、酸を添加しながらのシリアルバッチ試験を行い、主に重金属類の溶出挙動について評価を行った。

その結果、浸漬試験では、海水溶媒での pH は 9.7~11.3 の範囲であり、特に堆肥を混合した場合は 9.7~10.7 で他の条件よりも低い状態を保っていた。このとき重金属類では V の溶出が 0.01 mg/L 前後で見られるのみであった。また、pH を調整したシリアルバッチ試験では、環境基準の定められている金属類の溶出濃度は十分に低いレベルに保たれ、スラグを腐植物質と混合して海水中に浸漬する場合のリスクは十分に低いと考えられた。

4. 1. 1. 3 研究の方法

上記の研究目的のため、重金属類溶出挙動に対する海水溶媒と pH の影響について実験的に検討した。

(1) 試料

試料は、製鋼スラグ（電気炉酸化スラグ）1 検体と、堆肥 1 検体を用いた。

製鋼スラグは最大粒径 40 mm であった。これをタングステンカーバイド製カッターによる粉砕器を用いて粉砕し、篩い目 0.125 mm 通過画分を粉砕試料とした（粉砕スラグと呼ぶことがある）。

堆肥は、最大長さ 20 mm 程度、最大太さ 5 mm 程度の黒色チップ状であった。これを 40°C の乾燥機で 24 時間乾燥した後、乳鉢で粉砕し、篩い目 0.5 mm 通過画分を粉砕試料とした（粉砕堆肥と呼ぶことがある）。

(2) 各粉砕試料の含有量分析

含有量分析は、スラグ粉砕試料と堆肥粉砕試料のそれぞれについて、3 検体ずつ行った。

スラグ粉砕試料 1 g を秤量し、硝酸と塩酸の混酸を用いて加熱分解を行った後に 5C ろ紙でろ過し、5N 硝酸で定容し抽出液を得た。残渣はろ紙とともに電気炉で 600°C に加熱した後、白金ルツボに全て移し、メタホウ酸リチウムを用いてアルカリ融解を行い、5N 硝酸で定容し抽出液を得た。それぞれの抽出液について ICP 発光分析、ICP 質量分析を行い、重金属類を中心とする各種金属濃度を測定し、各抽出液への抽出量の合計から金属含有量を求めた。

堆肥粉砕試料は電気炉で 600°C に加熱した後、硝酸と塩酸の混酸を用いて加熱分解を行った後に 5C ろ紙でろ過し、5N 硝酸で定容し抽出液を得た。抽出液について ICP 発光分析、ICP 質量分析を行い、重金属類を中心とする各種金属濃度を測定し、抽出液への抽出量から金属含有量を求めた。

(3) 溶出試験方法

試験の流れを図 4.1.1-1 に、溶出試験条件を表 4.1.1-1 にそれぞれ示す。

溶媒は、純水 (MiliQ 精製水) と海水 (小笠原海域採水水) の 2 種類を用いることとした。

試験は、あらかじめポリエチレン製容器に溶媒と粉砕堆肥を所定量入れたものを 4 日間静置し、これに粉砕スラグを所定量入れ、溶出操作と固液分離操作を 3 回繰り返すこととし、1 回目は環告 46 号試験に準ずる方法とした。このとき、固液分離では 3000 rpm で 20 分行う遠心分離操作の影響を調べた。2 回目は、1 回目の残渣に新たな溶媒を加え、30 日間静置後に固液分離（ろ過のみ）を行った。3 回目は、2 回目の残渣に新たな溶媒を加え、さらに 42 日間静置後に固液分離（ろ過のみ）を行った。

ろ液の pH と EC を直ちに測定後、硝酸を体積比 0.5% となるように添加し冷蔵庫に保存した。各種金属と TOC は、保存液を適宜希釈し、ICP 発光分析装置、ICP 質量分析装置および TOC 測定装置でそれぞれ測定した。

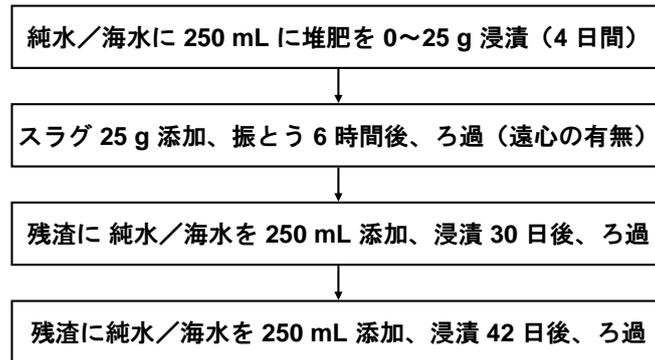


図 4. 1. 1-1 試験の流れ

表 4. 1. 1-1 溶出試験条件

	溶媒	溶媒量 (mL)	浸漬堆肥量 (g)	溶媒/浸漬堆肥比	スラグ量 (g)	スラグ/溶媒比	初回溶出操作時間 (h)	遠心分離	ろ過
P0/1-46N	純水	250	0	堆肥なし	25	10	6	あり	0.45・m メンブレンフィルター
P0/1-46C								なし	
P1/4-46N			6.25	0				あり	
P1/4-46C								なし	
P1/2-46N			12.5	0				あり	
P1/2-46C								なし	
P1/1-46N			25	0				あり	
P1/1-46C								なし	
S0/1-46N	海水	250	0	堆肥なし	25	10	6	あり	
S0/1-46C								なし	
S1/4-46N			6.25	0				あり	
S1/4-46C								なし	
S1/2-46N			12.5	0				あり	
S1/2-46C								なし	
S1/1-46N			25	0				あり	
S1/1-46C								なし	

(3) 長期静置溶出試験

溶媒は、純水 (MiliQ 精製水) と海水 (小笠原海域採水水) の 2 種類を用いることとした。

試験は、あらかじめポリエチレン製容器に溶媒と粉碎堆肥を所定量入れたものを 4 日間静置し、これにスラグを所定量入れ、溶出操作と固液分離操作を 3 回繰り返した (昨年度報告)。この試料に新たな溶媒をさらに加えて、1 年間静置後に固液分離を行った。

ろ液の pH と EC を直ちに測定後、硝酸を体積比 0.5% となるように添加して冷蔵保存した。各種金属と TOC は、冷蔵保存液を適宜希釈し、ICP 発光分析装置、ICP 質量分析装置および TOC 測定装置でそれぞれ測定した。

(4) pH 調整シリアルバッチ試験

試験操作の流れを図 4. 1. 1-2 に示す。ポリエチレン製容器内でスラグと堆肥を 1 : 1 の

割合で混合し、これに海水、10%希釈海水、および、純水の3種類を溶媒として、スラグの50倍量（重量体積比）添加して密栓した。これを2つずつ用意し、合計6本の容器を毎分200回、振幅4-5 cmの条件で反復浸透を行った。うち1つずつの容器を30分ごとにとりだし、pHが9以下となるように塩酸を滴下しpH調整を行う作業を振とう開始から5時間経過するまで行った。さらに、21時間後に再度pH調整を行い、22時間後に0.45 mmメンブランフィルターでろ過を行った。塩酸添加による溶媒量の増加は、初期溶媒量の1.2%以下とした。ろ過後、試料を容器へ再び戻し、新たな溶媒を加えて同様の操作を2回繰り返した。以上によって、1試料につき3つのろ液を得た。

ろ液の分析方法については長期静置溶出試験と同様の方法で行った。

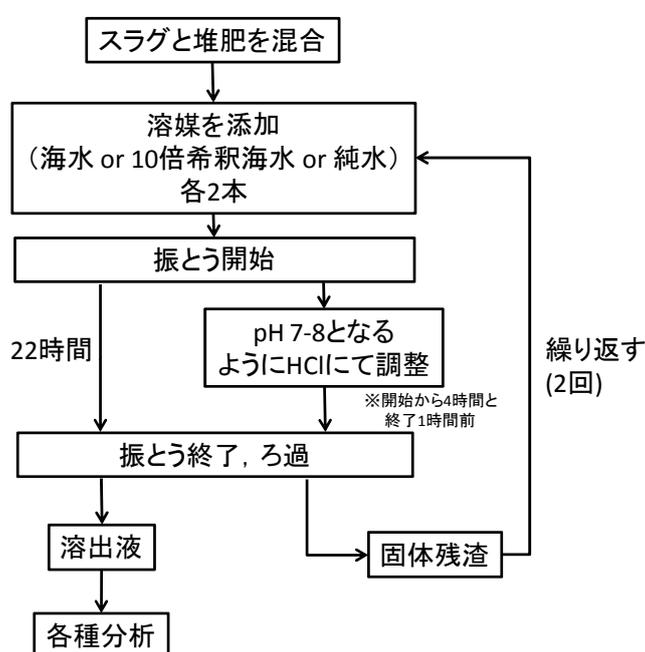


図 4. 1. 1-2 pH調整シリアルバッチ試験の流れ

4. 1. 1. 4 結果

(1) 含有量分析結果

表-4. 1. 1-2 に、含有量分析結果を示す。

製鋼スラグ中には鉄が16.6%の他、含有量1%以上の主成分としてカルシウム21.3%、アルミニウム4.9%、マンガン4.0%、マグネシウム3.0%、クロム1.1%が含まれた。主にケイ酸(SiO₂)から成ると推定される王水残渣量は22.2%であった。含有量1%以下の微量成分では、ホウ素、バリウム、カリウム、ナトリウム、ストロンチウム、チタン、バナジウム、亜鉛を数百mg/kg以上含み、ヒ素、銅、モリブデン、ニッケル、鉛、セレンは数十mg/kg以下であった。カドミウムは定量下限(1mg/kg)以下であった。

堆肥中の灰化後の残渣量は43.9%であった。減量分は有機物に相当すると推測される。堆肥の構成元素は、1%以上の主成分としてカルシウム4.7%、鉄2.3%、アルミニウム1.3%が含

まれた。含有量 1%以下の微量成分では、バリウム、カリウム、マグネシウム、マンガン、ナトリウム、ストロンチウム、チタン、亜鉛を数百 mg/kg 以上含み、ヒ素、ホウ素、クロム、銅、モリブデン、ニッケル、鉛、セレン、バナジウムは数十 mg/kg 以下であった。カドミウムは定量下限 (1 mg/kg) 以下であった。

製鋼スラグと堆肥を比較すると、製鋼スラグの方が 5 倍以上多い元素としてホウ素、カルシウム、クロム、鉄、マグネシウム、マンガン、モリブデン、バナジウムが挙げられ、堆肥の方が 2 倍以上多い元素としてヒ素、カリウム、ナトリウム、鉛が挙げられる。また、各 3 検体による分析値の変動係数は、堆肥の方が高い傾向があった。

表 4.1.1-2 含有量分析結果

	製鋼スラグ			堆肥		
	平均	標準偏差	変動係数	平均	標準偏差	変動係数
	mg/kg	mg/kg		mg/kg	mg/kg	
Al	49300	97	0.2	12600	2370	18.8
As	2	0	0.3	5	1	24.6
B	297	7	2.2	17	4	25.5
Ba	322	4	1.3	456	53	11.5
Ca	213000	1010	0.5	47000	8640	18.4
Cd	<1	<1	0.0	<1	<1	16.2
Cr	11000	1210	11.0	37	3	9.1
Cu	64	1	1.8	85	16	18.7
Fe	166000	5520	3.3	23300	2380	10.2
K	436	6	1.4	6140	947	15.4
Mg	29800	748	2.5	4200	378	9.0
Mn	40100	1210	3.0	482	59	12.2
Mo	23	1	4.8	2	0	13.7
Na	559	3	0.5	1180	220	18.5
Ni	39	19	49.1	24	2	9.4
Pb	8	1	9.4	20	6	30.6
Se	1	0	0.9	1	0	19.5
Sr	409	0	0.1	139	25	18.2
Ti	2720	84	3.1	853	104	12.1
V	766	27	3.5	45	6	12.4
Zn	161	4	2.3	192	20	10.6
王水残渣	222000	1880	0.8			

(2) 溶出試験用堆肥浸漬水（純水、海水、堆肥浸漬水）の組成

表 4.1.1-3 に、純水と海水の各溶媒、および、各溶媒に 4 日間浸漬後の堆肥浸漬水の溶液組成を示す。

pH は 7.5-7.9 であまり大きくは変わらなかった。EC は、純水では堆肥の増加とともに高くなったが、海水では海水そのものの数値が高いため違いは見られなかった。TOC は純水+堆肥と海水+堆肥の濃度は同程度であり、同様に、堆肥の増加とともに高くなり、堆肥：海水=1:10 の場合 150-186 mg/L であった。個々の元素では、堆肥量の増加に伴い、鉄のよ

うに純水と海水のいずれも濃度が増加する場合、ヒ素のように純水のみで増加する場合、モリブデンのように海水のみで増加する場合があった。この他、海水の場合は原水の濃度が高いため堆肥の影響が見られず、ほぼ一定の場合もあった。また、ホウ素は海水のみで測定され、堆肥の増加にともない減少する傾向が観察された。

続く溶出試験では、これらの組成の溶液に製鋼スラグを浸漬することとなる。

表 4.1.1-3 純水、海水、堆肥浸漬水の溶液組成

	単位	純水	堆肥浸漬水 (純水)				海水	堆肥浸漬水 (海水)		
		P0/1-S	P1/4-S	P1/2-S	P1/1-S	S0/1-S	S1/4-S	S1/2-S	S1/1-S	
溶媒		純水	純水	純水	純水	海水	海水	海水	海水	
溶媒	g	250	250	250	250	250	250	250	250	
堆肥	g	0	6.25	12.5	25	0	6.25	12.5	25	
スラグ	g	0	0	0	0	0	0	0	0	
液固比	L/kg	1/0	40/1	20/1	10/1	1/0	40/1	20/1	10/1	
EC	mS/m	0.0	0.3	0.6	0.9	5000	5000	5100	5100	
pH		7.7	7.5	7.6	7.6	7.9	7.3	7.3	7.3	
TOC	mg/L	-	48	80	150	4.4	57	97	186	
Al	mg/L	<0.01	0.12	0.16	0.21	<0.01	0.13	0.16	0.23	
As	mg/L	<0.001	0.002	0.004	0.007	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	
B	mg/L	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	4.2	3.9	3.6	3.0	
Ba	mg/L	<0.01	0.011	0.019	0.033	<0.01	0.20	0.29	0.39	
Ca	mg/L	<0.05	31	50	88	410	570	680	920	
Cd	mg/L	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	
Cr	mg/L	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	
Cu	mg/L	<0.005	0.018	0.020	0.021	0.001	0.024	0.040	0.056	
Fe	mg/L	<0.05	0.64	1.2	1.9	<0.05	0.50	0.95	2.8	
K	mg/L	<0.1	23	43	70	400	460	470	530	
Mg	mg/L	<0.001	4	8	14	1330	1390	1350	1310	
Mn	mg/L	<0.005	0.14	0.26	0.46	0.01	0.02	0.03	0.05	
Mo	mg/L	<0.005	0.011	0.019	0.035	<0.005	1.3	2.3	3.9	
Na	mg/L	<0.05	2.1	4.2	8.3	10600	11300	11100	11100	
Ni	mg/L	<0.005	<0.005	<0.005	0.008	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	
Pb	mg/L	<0.001	<0.001	0.002	0.002	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	
Se	mg/L	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	
Si	mg/L	<0.05	2.9	5.1	8.9	<0.05	2.1	3.7	6.9	
Sr	mg/L	<0.001	0.09	0.15	0.26	6.7	6.4	6.1	6.3	
V	mg/L	<0.001	0.006	0.006	0.008	0.001	0.001	0.006	0.008	
Zn	mg/L	<0.005	0.005	0.008	0.010	0.006	<0.005	0.005	0.010	

(3) スラグのみ (堆肥なし) による溶出試験結果

表 4.1.1-4 に、スラグのみによる溶出試験結果を示す。純水溶媒は環告 46 号に準じたものとなるが、スラグ試料粒径が 0.125 mm 以下である点が異なっている。純水の場合の pH 12.1 に対して海水は 10.1 と低く、海水の緩衝作用によって pH の上昇が抑制されていることがわかる。純水による溶出液の主要成分はカルシウムであり、その他、アルミニウム、ナト

リウム、ストロンチウムが多い。環境基準設定項目ではホウ素が 2.0 mg/L とやや高かった。海水溶媒では、カルシウム溶出濃度は 1900 mg/L で、純水溶出液+海水溶媒の 780 mg/L を大きく越えた。このことは、海水溶出液の pH 上昇が緩衝作用によって抑制されたことにより、水酸化カルシウム溶解度が高かったためと推測される。これと対比的に、マグネシウムの濃度低下は溶解度の低下によると思われる。環境基準設定項目に注目すると、ホウ素は海水中に 4.2 mg/L 含まれていたものが 0.31 mg/L に低下し、他の成分は定量下限以下であった。その他として、モリブデンとバナジウムの溶出が低濃度ではあるが確認された。鉄の溶出濃度はいずれも定量下限以下であった。

表 4.1.1-4 スラッグのみ（堆肥なし）の条件における溶媒と 6 時間振とう溶出液の分析結果

	単位	純水	純水 +スラッグ	海水	海水 +スラッグ
		P0/1-S	P0/1-46C	S0/1-S	S0/1-46N
溶媒		純水	0	海水	0.0
溶媒	mL	250	250	250	250
堆肥	g	0	0	0	0
スラッグ	g	0	25	0	25
遠心		-	あり	-	あり
EC	mS/m	0.0	4.9	5000	5000
pH		7.7	12.1	7.9	10.1
TOC	mg/L	-	12	4.4	5.0
Al	mg/L	<0.01	12	<0.01	<0.01
As	mg/L	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
B	mg/L	<0.05	2.0	4.2	0.31
Ba	mg/L	<0.01	0.030	<0.01	0.9
Ca	mg/L	<0.05	373	410	1850
Cd	mg/L	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005
Cr	mg/L	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005
Cu	mg/L	<0.005	<0.005	0.001	<0.005
Fe	mg/L	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05
K	mg/L	<0.1	2.7	402	542
Mg	mg/L	<0.001	0.011	1326	175
Mn	mg/L	<0.005	0.001	0.01	<0.005
Mo	mg/L	<0.005	<0.005	<0.005	0.048
Na	mg/L	<0.05	11.3	10610	10800
Ni	mg/L	<0.005	0.007	<0.005	<0.005
Pb	mg/L	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
Se	mg/L	<0.005	<0.005	<0.005	0.005
Si	mg/L	<0.05	<0.05	<0.05	1.1
Sr	mg/L	<0.001	6.2	6.7	7.7
V	mg/L	<0.001	<0.001	0.001	0.008
Zn	mg/L	<0.005	<0.005	0.006	<0.005

(4) 遠心分離操作の影響

表 4.1.1-5 に、遠心分離操作の有無についての比較結果を示す。この表から、各溶出液について、遠心分離操作を行うことによる溶出濃度測定結果への影響はほとんど見られないことがわかる。ただし、純水+スラグのアルミニウム、海水+スラグを除いてのマグネシウムとマンガン、および、海水+堆肥+スラグのケイ素は、遠心分離によって結果が大きく（半分程度か、それ以下）減少している。その原因として、遠心操作なしの溶出液では、ろ紙を通過した微小粒子が寄与した可能性が考えられる。なお、TOC はほとんど変化が無いことから、3000 rpm で 20 分間行う遠心分離操作では沈降しない成分が主体であることが確認できた。

表 4.1.1-5 遠心分離操作による溶出濃度測定結果

		純水+スラグ		純水+堆肥+スラグ		海水+スラグ		海水+堆肥+スラグ	
		P0/1-46 N	P0/1-46 C	P1/1-46 N	P1/1-46 C	S0/1-46 N	S0/1-46 C	S1/1-46 N	S1/1-46 C
堆肥量	g	0.0	0.0	25	25	0.0	0.0	25	25
溶媒量	g	250	250	250	250	250	250	250	250
スラグ量	g	25	25	25	25	25	25	25	25
遠心操作		なし	あり	なし	あり	なし	あり	なし	あり
EC	S/m	4.9	4.9	1.9	1.9	5.0	5.0	5.0	4.9
pH		12.2	12.1	11.3	11.2	10.0	10.1	9.6	9.5
TOC	mg/L	11	12	108	112	6	5	162	149
Al	mg/L	19	12	206	205	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
As	mg/L	<0.001	<0.001	0.003	0.003	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
B	mg/L	1.9	2.0	0.54	0.54	0.29	0.31	1.1	1.1
Ba	mg/L	0.030	0.030	0.075	0.076	0.9	0.9	0.8	0.8
Ca	mg/L	384	373	235	237	1880	1850	2250	2070
Cd	mg/L	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005
Cr	mg/L	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	0.006	<0.005
Cu	mg/L	<0.005	<0.005	0.036	0.048	<0.005	<0.005	0.010	0.009
Fe	mg/L	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05
K	mg/L	2.7	2.7	82.3	84.6	532	542	699	690
Mg	mg/L	0.020	0.011	0.055	0.039	196	175	205	112
Mn	mg/L	0.007	0.001	0.014	0.008	<0.005	<0.005	0.009	0.006
Mo	mg/L	<0.005	<0.005	0.037	0.037	0.052	0.048	0.10	0.11
Na	mg/L	11.2	11.3	15.6	16.1	10700	10800	11200	11000
Ni	mg/L	<0.005	0.007	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005
Pb	mg/L	0.001	<0.001	0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
Se	mg/L	<0.005	<0.005	0.010	0.010	<0.005	0.005	0.010	0.013
Si	mg/L	<0.05	<0.05	3.5	3.5	1.1	1.1	5.8	3.8
Sr	mg/L	6.0	6.2	0.86	0.86	7.7	7.7	7.3	7.4
V	mg/L	<0.001	<0.001	0.006	0.007	0.008	0.008	0.062	0.060
Zn	mg/L	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005

(6) 堆肥浸漬水～繰り返し溶出操作による結果の比較

表 4.1.1-6 と 4.1.1-7 に、繰り返し溶出試験の結果をまとめて示した。

まず、純水溶媒（表 4.1.1-6）に注目すると、電気伝導度（EC）の挙動はカルシウムと良く類似しており、カルシウムの寄与が大きいことがわかる。カルシウムは 2 回目溶出液（30 日）で最大濃度となり、3 回目では減少する結果となった。pH は、堆肥浸漬水は 7.5～7.7 であるが、溶出液は pH 12 前後の高アルカリ性であった。堆肥量が少ないほど pH は高い傾向があった。TOC は、堆肥量が多いほど高くなる傾向にあり、溶媒から 2 回目溶出液までの変化は特に見られなかった（3 回目は未測定）。鉄に関しては、堆肥浸漬液で堆肥量が多いほど高濃度となっているものの、スラグと混合後は全て定量下限以下（ <0.05 mg/L）であった。環境基準設定項目について見ると、ヒ素は堆肥浸漬した際に最大で 0.007 mg/L と低濃度であるが検出され、スラグを加えて振とうを繰り返すことで低下する傾向が確認された。ホウ素はスラグを加えることで最大 2.2 mg/L に達したが、堆肥量の多い条件ほど溶出はおさえられ、3 回目溶出液ではいずれの条件も低下する傾向が見られた。クロム（全クロム）は全ての溶出液で定量下限以下（ <0.005 mg/L）であった。鉛は一部で検出されているが、特異的であり、微粒子による可能性を確認する必要があると思われる。セレンは 1 回目溶出液で堆肥とスラグともにある場合のみ検出されているが、2 回目以降は定量下限以下（ <0.005 mg/L）であった。以上のことから、純水溶媒においては堆肥とスラグそれぞれから溶出する可能性のある有害物質については、相補的に溶出抑制の方向で働く傾向にあることがわかった。ただし、各々のメカニズムの詳細については不明の部分が多く、今後の課題である。

次に、海水溶媒（表 4.1.1-7）を見ると、pH は 11 以下であり、海水による緩衝作用が確認できる。TOC は純水の場合と同様に堆肥量が多いほど高く、2 回目溶出液までやや低下する傾向が見られる。鉄については、堆肥浸漬液と 3 回目溶出液で検出された。環境基準設定項目では、ヒ素は 0.005 mg/L 以下の低濃度であった。ホウ素は海水中に含まれるが、スラグによって濃度が低下する傾向が見られ、2 回目、3 回目溶出液でも初期濃度の $1/2$ 程度に抑制された。クロム（全クロム）は 1 回目溶出液で 0.01 mg/L 以下の低濃度で検出されたが、2 回目以降は定量下限以下（ <0.005 mg/L）であった。鉛は全て定量下限以下（ <0.001 mg/L）であった。セレンは 0.01 mg/L 以下の低濃度であった。以上より、海水、堆肥、スラグの相互作用によっても有害物質の溶出を促進する傾向は特に見られなかった。

鉄の溶出挙動に関しても、初期に堆肥からの溶出分がスラグ添加によって定量下限以下に減少する傾向が見られた。この傾向の要因の一つに、pH 上昇による沈殿生成の可能性が考えられる。したがって、実際の海中における挙動を評価するための模擬試験として、より大量の海水中に浸漬するか、液固比は同程度であっても pH の上昇を抑制するような工夫が必要と考えられる。

表 4. 1. 1-6 純水溶媒による堆肥浸漬水繰り返し溶出試験結果のまとめ（単位は表 4. 1. 1-5 と共通）

	純水(100) + スラグ(10)				純水(100) + 堆肥(2.5) + スラグ(10)				純水(100) + 堆肥(5) + スラグ(10)				純水(100) + 堆肥(10) + スラグ(10)			
	P0/1 -S	P0/1 -46N	P0/1 -30D	P0/1 -72D	P1/4 -S	P1/4 -46N	P1/4 -30D	P1/4 -72D	P1/2 -S	P1/2 -46N	P1/2 -30D	P1/2 -72D	P1/1 -S	P1/1 -46N	P1/1 -30D	P1/1 -72D
堆肥量	0	0	0	0	6.25	6.25	6.25	6.25	12.5	12.5	12.5	12.5	25	25	25	25
溶媒量	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250
スラグ量	0	25	25	25	0	25	25	25	0	25	25	25	0	25	25	25
EC	0.0	4.9	8.7	7.9	0.3	3.2	7.0	4.8	0.6	3.2	5.3	3.9	0.9	1.9	3.2	2.7
pH	7.7	12.2	12.6	12.5	7.5	11.9	12.5	12.3	7.6	11.7	12.4	12.5	7.6	11.3	12.1	12.0
TOC	0	11	6.8	-	48	21	46	-	80	45	79	-	150	108	140	-
Al	<0.01	19	1.0	1.5	0.12	247	7.3	5.6	0.16	389	22	10	0.21	206	49.3	22.5
As	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.002	<0.001	<0.001	0.001	0.004	0.002	<0.001	0.002	0.007	0.003	<0.001	0.002
B	<0.05	1.9	2.2	1.8	<0.05	0.61	2.0	1.6	<0.05	0.47	1.4	1.2	<0.05	0.54	1.2	1.0
Ba	<0.01	0.030	0.024	0.066	0.011	0.46	0.21	0.06	0.019	0.33	0.28	0.12	0.033	0.075	0.17	0.10
Ca	<0.05	384	694	612	31	342	567	385	50	418	439	314	88	235	296	234
Cd	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005
Cr	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005
Cu	<0.005	<0.005	<0.005	0.002	0.018	0.008	0.020	0.008	0.020	0.019	0.13	0.010	0.021	0.036	0.16	0.030
Fe	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	0.64	<0.05	<0.05	0.012	1.2	<0.05	<0.05	0.015	1.9	<0.05	<0.05	0.031
K	<0.1	2.7	<0.1	1.1	23	35	6.1	1.7	43	66	13	4	70	82	35	13
Mg	<0.001	0.020	<0.001	<0.001	4	0.011	<0.001	<0.001	7.6	0.012	<0.001	<0.001	14	0.055	<0.001	0.011
Mn	<0.005	0.007	<0.005	<0.005	0.14	0.005	<0.005	0.012	0.26	0.005	0.006	0.015	0.46	0.014	0.013	0.018
Mo	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	0.011	<0.005	0.013	0.006	0.019	<0.005	0.016	0.008	0.035	0.037	0.016	0.009
Na	<0.05	11	3.8	2.7	2.1	12	4.4	1.2	4.2	14	5.2	1.6	8.3	15.6	8.0	2.4
Ni	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	0.002	<0.005	<0.005	0.006	0.003	0.008	<0.005	0.012	0.006
Pb	<0.001	0.001	<0.001	0.005	<0.001	<0.001	0.026	<0.001	0.002	<0.001	0.003	<0.001	0.002	0.001	<0.001	<0.001
Se	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	0.009	<0.005	<0.005	<0.005	0.012	<0.005	<0.005	<0.005	0.010	<0.005	<0.005
Si	<0.05	<0.05	<0.05	0.19	2.9	1.0	1.1	0.8	5.1	1.9	1.9	1.2	8.9	3.5	3.2	1.6
Sr	<0.001	6.0	3.6	2.5	0.089	3.0	4.0	1.5	0.15	2.3	3.3	1.7	0.26	0.86	2.1	1.5
V	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.006	<0.001	<0.001	<0.001	0.006	<0.001	<0.001	0.001	0.008	0.006	<0.001	0.003
Zn	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	0.005	<0.005	<0.005	<0.005	0.008	<0.005	<0.005	<0.005	0.010	<0.005	<0.005	<0.005

表 4.1.1-7 海水溶媒による堆肥浸漬水繰り返し溶出試験結果のまとめ（単位は表 4.1.1-5 と共通）

	海水(100) + スラグ(10)				海水(100) + 堆肥(2.5) + スラグ(10)				海水(100) + 堆肥(5) + スラグ(10)				海水(100) + 堆肥(10) + スラグ(10)			
	S0/1 -S	S0/1J -46N	S0/1 -30D	S0/1 -72D	S1/4 -S	S1/4 -46N	S1/4 -30D	S1/4 -72D	S1/2 -S	S1/2 -46N	S1/2 -30D	S1/2 -72D	S1/1 -S	S1/1 -46N	S1/1 -30D	S1/1 -72D
堆肥量	0	0	0	0	6.25	6.25	6.25	6.25	12.5	12.5	12.5	12.5	25	25	25	25
溶媒量	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250
スラグ量	0	25	25	25	0	25	25	25	0	25	25	25	0	25	25	25
EC	5.0	5.0	5.0	7.1	5.0	5.0	5.0	7.1	5.1	5.0	5.0	7.1	5.1	5.0	5.0	7.2
pH	7.9	10.0	11.0	10.3	7.3	10.1	10.4	10.8	7.3	10.1	10.2	9.5	7.3	9.6	9.8	8.6
TOC	4.4	5.8	3.7		57	44	47		97	92	71		186	162	121	
Al	<0.01	<0.01	0.12	0.11	0.13	<0.01	0.11	0.10	0.16	<0.01	0.11	0.10	0.23	<0.01	0.15	0.13
As	<0.001	<0.001	<0.001	0.002	<0.001	0.001	<0.001	0.002	<0.001	0.002	<0.001	0.002	<0.001	0.004	<0.001	0.003
B	4.2	0.29	1.7	1.7	3.9	0.53	1.1	1.1	3.6	0.83	1.3	1.1	3.0	1.1	1.7	1.2
Ba	<0.01	0.92	0.55	0.26	0.20	1.1	1.3	0.6	0.29	0.95	1.2	0.51	0.39	0.81	1.3	0.70
Ca	410	1880	1780	2170	569	2190	1730	1680	682	2370	1900	1570	916	2250	1750	1780
Cd	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005
Cr	<0.005	<0.005	<0.005	0.003	<0.005	0.007	<0.005	0.002	<0.005	0.008	<0.005	0.001	<0.005	0.006	<0.005	<0.005
Cu	0.001	<0.005	<0.005	<0.005	0.024	<0.005	0.006	0.012	0.040	0.008	<0.005	0.011	0.056	0.010	<0.005	<0.005
Fe	<0.05	<0.05	<0.05	0.037	0.50	<0.05	<0.05	0.018	0.95	<0.05	<0.05	0.026	2.8	<0.05	<0.05	0.012
K	402	532	401	398	458	567	420	410	473	627	432	415	527	699	455	417
Mg	1330	196	8	94	1390	54	67	399	1350	50	46	493	1310	205	34	222
Mn	0.011	<0.005	0.037	<0.005	0.022	<0.005	0.048	<0.005	0.03	<0.005	0.089	0.002	0.05	0.009	0.13	0.15
Mo	<0.005	0.052	0.009	0.017	1.3	0.075	<0.005	0.016	2.3	0.085	0.005	0.023	3.9	0.10	0.011	0.1
Na	10600	10700	10600	10600	11300	10800	11000	10800	11100	11100	11100	109000	11100	11200	11300	10800
Ni	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	0.001	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	0.01	<0.005	<0.005	<0.005
Pb	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
Se	<0.005	<0.005	<0.005	0.007	<0.005	<0.005	<0.005	0.008	<0.005	0.007	<0.005	0.007	<0.005	0.010	<0.005	0.007
Si	<0.05	1.1	<0.05	0.19	2.1	3.1	0.58	0.176	3.7	4.8	1.3	0.47	6.9	5.8	3.2	1.7
Sr	6.7	7.7	10	7.5	6.4	7.8	11	7.4	6.1	8.0	10	7.2	6.3	7.3	11	7.5
V	0.001	0.008	0.009	0.003	0.001	0.033	0.006	0.002	0.006	0.053	0.012	0.004	0.008	0.062	0.013	0.002
Zn	0.006	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	0.005	<0.005	<0.005	<0.005	0.010	<0.005	<0.005	<0.005

(7) 長期静置溶出試験結果

表 4.1.1-8 に試験結果を示す。スラグと堆肥の混合割合を変えることにより、何らかの促進作用が無いかわかることを目的とし、昨年度の繰り返し溶出試験に用いた試料を1年間溶媒に浸漬したものである。昨年度の時点でも有害重金属の特段の溶出は認められなかったが、1年間浸漬しても同様の結果が得られた。すなわち、純水を溶媒とした場合は pH の上昇が海水溶媒よりも高く、11.3~12.7 の範囲であり、そのためアルカリ性側で溶出が促進される金属では Al、Cu、Ni が海水溶媒よりも高い溶出濃度となっているが、その濃度レベルは 1.0 mg/L 以下であった。一方、海水を溶媒とした場合の pH は 9.7~11.3 の範囲であり、特に堆肥を混合した場合は 9.7~10.7 と低かった。また、このとき重金属類では V の溶出が 0.01 mg/L 前後で見られるのみであった。K、Na などのアルカリ金属の濃度が高いのは海水由来であるが、海水における Ca の濃度は 410 mg/L であるのでカルシウムはスラグ由来分の占める割合が高いと思われる。

表 4.1.1-8 純水、海水、堆肥浸漬水の溶液組成

	スラグ+純水	堆肥+スラグ+純水	堆肥+スラグ+純水	堆肥+スラグ+純水	スラグ+海水	堆肥+スラグ+海水	堆肥+スラグ+海水	堆肥+スラグ+海水
	P0/1-1Y	P1/4-1Y	P1/2-1Y	P1/1-1Y	S0/1-1Y	S1/4-1Y	S1/2-1Y	S1/1-1Y
堆肥量設定	0	a	b	c	0	a	b	c
溶媒量	250	250	250	250	250	250	250	250
スラグ量	25	25	25	25	25	25	25	25
EC	9.7	0.2	0.2	2.5	92.5	94.4	93.1	82.5
pH	12.7	11.6	11.3	12.0	11.3	10.3	9.7	10.7
Al	<0.01	6.5	8.1	6.9	<0.01	<0.01	<0.01	0.41
As	<0.001	<0.001	<0.001	0.005	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
B	2.0	0.9	1.8	1.6	2.1	1.5	1.3	2.3
Ba	0.48	0.015	0.066	0.084	0.22	0.53	0.67	0.50
Ca	789	317	277	256	2178	2102	1494	2247
Cd	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005
Cr	<0.003	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005
Cu	<0.005	0.239	0.18	0.16	<0.005	<0.005	<0.005	0.066
Fe	<0.005	<0.005	<0.005	0.068	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005
K	3.9	1.4	3.0	7.9	528	554	547	563
Mg	<0.001	0.017	0.034	0.062	0.13	217	566	0.92
Mn	<0.005	0.035	0.09	0.130	<0.005	<0.001	<0.001	0.045
Mo	<0.005	0.063	0.065	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	0.058
Na	10.2	1.4	1.7	2.0	10818	11220	11217	11079
Ni	<0.005	0.016	0.002	0.023	<0.01	<0.005	<0.01	<0.01
Pb	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
Se	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05
Si	0.20	1.1	2.2	3.4	4.0	0.24	0.33	2.37
Sr	6.7	0.9	1.1	1.2	9.8	9.8	8.9	10.7
V	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.012	0.009	0.006	0.013
Zn	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005

(2) pH 調整シリアルバッチ試験結果

はじめに表 4.1.1-9 に pH 調整を行った際の添加前後の pH ならびに HCl 添加量を示す。

全体的な傾向として、1時間ごとに pH を 10 以下（目標は pH 9 であった）に調整しても、1 時間後の pH は再び上昇しており、アルカリ成分の溶出は実験を通して継続していることがわかる。したがって試験中を通して pH を十分に制御するためには、自動滴定装置の導入が必要であるが、この点については今後の課題としたい。

なお、pH 調整に使用した HCl の添加量は、回を重ねるごとに減少しており、スラグ中のアルカリ成分の溶出速度が低下してきていることがわかる。また、溶媒間で比較すると、10 倍希釈海水と純水に比べて、海水の方が pH の低下幅が大きいことがわかる。これは、海水中の成分による pH 緩衝作用によるものと思われる。

表 4.1.1-9 pH 調整結果

		1 回目				2 回目				3 回目			
		添加前 pH	添加後 pH	HCl 添加量 (累積) mol/kg-slag	HCl 添加体積比 (累積)%	添加前 pH	添加後 pH	HCl 添加量 (累積) mol/kg-slag	HCl 添加体積比 (累積)%	添加前 pH	添加後 pH	HCl 添加量 mol/kg-slag	HCl 添加体積比 (累積)%
海水	1 時間後	10.14	6.23	1.44	0.24	9.35	6.23	0.48	0.08	8.98	6.26	0.24	0.04
	2 時間後	9.77	5.75	1.92	0.32	8.78	5.75	0.53	0.16	8.60	7.96	0.29	0.12
	3 時間後	9.67	8.64	2.02	0.48	8.87	8.64	0.58	0.24	8.53	7.94	0.34	0.20
	4 時間後	9.50	8.31	2.11	0.64	8.93	8.31	0.67	0.40	8.69	8.17	0.38	0.28
	5 時間後	9.58	7.77	2.23	0.84	8.91	7.77	0.74	0.52	8.71	7.75	0.46	0.40
	21 時間後	9.82	8.20	2.35	1.04	9.56	8.20	0.84	0.68	9.23	8.24	0.53	0.52
10 倍希釈海水	1 時間後	12.14	9.40	1.92	0.32	10.37	9.40	0.48	0.08	8.84	5.93	0.24	0.04
	2 時間後	11.01	8.71	2.40	0.40	9.13	8.71	0.53	0.16	8.80	7.60	0.29	0.12
	3 時間後	11.04	7.33	2.88	0.48	9.35	7.33	0.62	0.32	9.08	7.88	0.34	0.20
	4 時間後	10.53	8.53	3.07	0.80	9.35	8.53	0.70	0.44	9.03	7.69	0.38	0.28
	5 時間後	10.36	6.53	3.31	0.84	9.23	6.53	0.77	0.56	9.00	7.54	0.43	0.36
	21 時間後	10.80	8.36	3.34	0.88	10.13	8.36	0.86	0.72	9.78	8.23	0.50	0.48
純水	1 時間後	12.06	8.85	1.92	0.32	10.74	8.85	0.48	0.08	10.38	6.20	0.24	0.04
	2 時間後	11.56	9.34	2.50	0.56	9.00	9.34	0.53	0.16	9.24	7.86	0.29	0.12
	3 時間後	11.34	7.88	2.98	0.64	9.54	7.88	0.62	0.32	9.28	8.10	0.34	0.20
	4 時間後	10.79	8.45	3.22	0.68	9.37	8.45	0.70	0.44	9.12	8.16	0.38	0.28
	5 時間後	10.63	7.08	3.46	0.72	9.52	7.08	0.79	0.60	9.27	7.29	0.46	0.40
	21 時間後	10.98	8.11	3.74	1.20	10.50	8.11	0.96	0.88	10.19	8.38	0.58	0.60

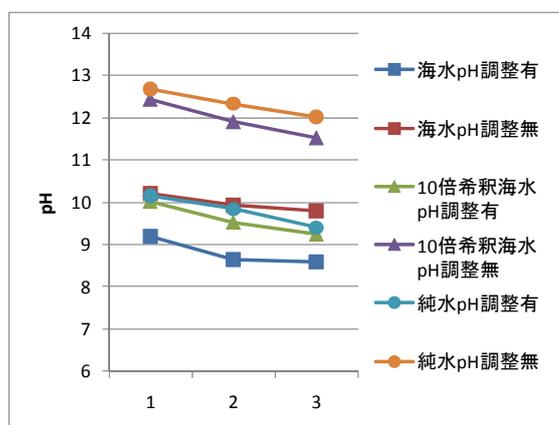


図 4.1.1-2 各溶出液の pH

図 4.1.1-3 に、固液分離を行い得られた溶出液の pH 変化を示す。pH 調整を行うことにより、海水では約 1 程度、10 倍希釈海水と純水では約 2 程度、それぞれ pH 値を下げるこ

とができ、3回目溶出操作においては全て pH10 以下とすることができた。

表 4.1.1-10 に、溶出液中の各成分の溶出濃度測定結果を示す。各成分の溶出濃度は、溶媒を交換するにしたい減少する場合 (Ba、Ca、Cr、Cu、Mo、Sr)、横ばい (K、Na、Si)、増加する場合 (B、Fe、Mg、Mn、V)、不明 (Fe、Pb) の 4 パターンに分かれた。

有害元素では As、Cd、Pb、Se はいずれも環境基準を下回った。ただし、塩濃度の高い海水の分析に際して 10 倍以上の希釈水を測定せざるを得なかったため、定量下限は環境基準の 1/2~1 倍程度で十分に下げることができなかつた。なお、F および B は海水中にそれぞれ 1.5 および 4 mg/L 程度の濃度で存在し環境基準は適用されない。

pH 調整の有無により濃度に明らかな差異が見られたのは、全ての溶媒における Si と V、および、海水溶媒におけるであり、いずれも pH 調整を行うことによって溶出濃度は高くなる傾向が見られた。

表 4.1.1-10 pH 調整シリアルバッチ試験結果

		海水		10 倍希釈海水		純水	
		pH 調整有り	pH 調整無し	pH 調整有り	pH 調整無し	pH 調整有り	pH 調整無し
EC	1	80.4	71.6	14.1	13.1	8.7	7.0
	2	73.5	72.4	9.3	8.5	2.9	3.4
	3	76.1	73.5	8.4	7.7	0.2	0.2
pH	1	9.2	10.2	10.0	12.4	10.2	12.7
	2	8.6	9.9	9.5	11.9	9.8	12.3
	3	9.6	9.8	9.3	11.5	9.4	12.0
Al	1	<0.05	<0.05	<0.05	0.41	0.37	0.88
	2	<0.05	<0.05	<0.05	0.13	<0.05	1.7
	3	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	1.4
As	1	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005
	2	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005
	3	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005
B	1	0.82	0.73	0.15	0.23	0.081	0.038
	2	2.4	1.4	0.23	0.22	0.074	0.024
	3	3.4	2.0	0.31	0.20	0.062	0.024
Ba	1	0.31	0.25	0.18	0.12	0.13	0.065
	2	0.14	0.13	0.056	0.047	0.037	0.022
	3	0.10	0.085	0.044	0.053	0.019	0.009
Ca	1	2094	1730	1520	744	778	551
	2	684	778	494	336	414	258
	3	512	489	291	284	237	120
Cd	1	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005
	2	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005
	3	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005
Cr	1	0.013	0.012	0.009	<0.005	0.008	<0.005
	2	0.006	0.006	0.005	<0.005	<0.005	<0.005
	3	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005
Cu	1	0.024	0.026	0.026	0.079	0.033	0.060
	2	0.015	0.012	0.012	0.023	0.014	0.029
	3	0.008	0.008	0.009	0.011	0.008	0.018
Fe	1	<0.03	<0.03	<0.03	<0.03	<0.03	<0.03
	2	<0.03	<0.03	<0.03	0.070	<0.03	<0.03
	3	<0.03	<0.03	<0.03	<0.03	<0.03	0.044
K	1	581	589	89	85	34	28
	2	550	553	53	51	4.7	3.5
	3	551	554	49	48	1.9	1.0
Mg	1	725	440	10.1	0.015	1.8	0.008
	2	1249	1016	65	0.14	2.5	0.009
	3	1278	1181	91	0.29	2.0	0.024
Mn	1	0.013	<0.005	<0.005	<0.005	0.007	<0.005
	2	0.050	<0.005	0.008	0.012	0.007	<0.005
	3	0.075	<0.005	0.016	<0.005	0.011	0.011
Mo	1	0.021	0.012	0.014	0.014	0.011	0.009
	2	0.017	0.012	0.005	0.004	0.004	0.003
	3	0.016	0.013	0.004	0.002	0.002	0.001
Na	1	11330	11502	887	902	3.4	3.0
	2	11374	11478	901	905	0.48	0.30
	3	11590	11468	908	899	0.21	0.11

Ni	1	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005
	2	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005
	3	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005
Pb	1	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005
	2	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005
	3	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005
Se	1	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
	2	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
	3	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
Si	1	3.0	1.6	11	1.8	12	1.8
	2	3.3	0.4	9.7	3.2	23	0.93
	3	4.4	0.4	12	4.0	27	3.1
Sr	1	6.3	6.1	1.7	1.3	1.3	0.73
	2	5.4	5.6	1.0	0.69	0.48	0.21
	3	5.4	5.4	0.74	0.68	0.27	0.10
V	1	0.016	<0.005	0.050	<0.005	0.052	<0.005
	2	0.025	<0.005	0.064	0.014	0.111	<0.005
	3	0.030	0.005	0.073	0.024	0.115	0.010
Zn	1	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005
	2	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005
	3	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005

4. 1. 1. 5 まとめ

純水溶媒の場合、pH は堆肥浸漬液（スラグ投入前）では 7.5～7.7 であるが、スラグ投入後の溶出液は pH 12 前後の高アルカリ性であった。TOC 濃度は堆肥量が多いほど高くなる傾向にあった。鉄は、堆肥浸漬液で堆肥量が多いほど高濃度であったが、スラグ投入後は全て定量下限以下（<0.05 mg/L）であった。環境基準設定項目では、ヒ素は堆肥浸漬液で若干検出されたが、スラグ投入後は低下した。ホウ素はスラグ投入で最大 2.2 mg/L に達したが、堆肥によっていずれの条件も低下する傾向が見られた。カドミウム、全クロム、鉛、セレンは微量か定量下限以下であった。以上のことから、純水溶媒においては堆肥とスラグが相補的に溶出を抑制させる方向で働くことが示唆された。次に、海水溶媒の場合、スラグ投入後の pH は 11 以下で緩衝作用が確認できた。TOC は純水と同様に堆肥量が多いほど高かった。鉄は堆肥浸漬液と 3 回目溶出液で検出された。環境基準設定項目では、海水由来のホウ素はスラグによって濃度が低下する傾向が見られ、2 回目、3 回目溶出液でも初期濃度の 1/2 程度に抑制された。ヒ素、カドミウム、全クロム、鉛、セレンは微量か定量下限以下であった。以上より、海水、堆肥、スラグの相互作用によっても有害物質の溶出を促進する傾向は特に見られなかった。

1 年間の浸漬試験では、海水溶媒での pH は 9.7～11.3 の範囲であり、特に堆肥を混合した場合は 9.7～10.7 で他の条件よりも低い状態を保っていた。このとき重金属類では V の溶出が 0.01 mg/L 前後で見られるのみであった。スラグを限られた溶媒に浸漬すると pH が高アルカリ性になり、実環境とは異なると考えられたことから、酸を添加して pH を 8～10 に調整しながらシリアルバッチ試験を行った。その結果、環境基準の定められている重金属類の溶出濃度は低く、ほとんど確認されないレベルであった。

以上の結果から、スラグを腐植物質と混合して海水中に浸漬する場合のリスクは十分に低いと考えられた。ただし、海水の希釈分析のため定量下限が通常よりも高かった点は留意する必要がある。

4. 1. 2 製鋼スラグからの鉄溶出における微生物作用

4. 1. 2. 1 研究の目的

自然界には鉄還元細菌や鉄酸化細菌などさまざまな微生物が存在している。これら微生物は、腐植物質などの有機物をエネルギーにして活動している。したがって、腐植物質や製鋼スラグを自然環境中に供与した場合、その活動により周辺環境が変化し、スラグからの鉄の溶出を促進する可能性がある。特に、鉄還元細菌は第二鉄を第一鉄に還元する能力を持つため、スラグ中に多く含まれている第二鉄を効率よく第一鉄に還元し、環境中における物質循環に寄与している可能性がある。そこで、河川堆積物などにおける腐植物質の存在形態ならびに棲息する微生物群の鉄還元活性について評価し、自然環境における腐植酸鉄形成との関連性について検討した。また、環境微生物群に有効な炭素源の選定ならびにそれを用いた製鋼スラグからの第一鉄溶出試験を行い、環境微生物、有機炭素および製鋼スラグとの相互作用について検討した。

4. 1. 2. 2 研究の方法

(1) 環境中における腐植酸鉄形成と微生物群との相互作用に関する検討

河川堆積物の採取ポイントは図 4.1.2-1 に示す岩手県および宮城県を流域とする大川の本・支流 12 地点である。採取した河川堆積物は室温で風乾し、2mm 以下のふるいを通した後に腐植物質の分析を行った。腐植物質の分析では、福島らの方法（図 4.1.2-2(A)）によりフルボ酸、フミン酸分画を、Yuan らの方法（図 4.1.2-2(B)）により腐植物質中の鉄を分析した。また、河川堆積物中に棲息する微生物群の鉄還元活性評価では、100mL バイアルに 50mL のグルコース-アスパラギン培地（表 4.1.2-1）を入れ、湿潤河川堆積物約 0.5g を添加した。培養条件は窒素雰囲気（嫌気条件）および空気雰囲気（好気条件）の 2 種類行った。所定時間ごとに約 2mL の培養液を採取し、チューブに入れ 10000 rpm の遠心分離を行った後の上澄み液中の鉄濃度および pH を測定した。鉄イオン濃度の分析はフェロジン法で行った。

(2) 環境微生物群に有用な炭素源の選定

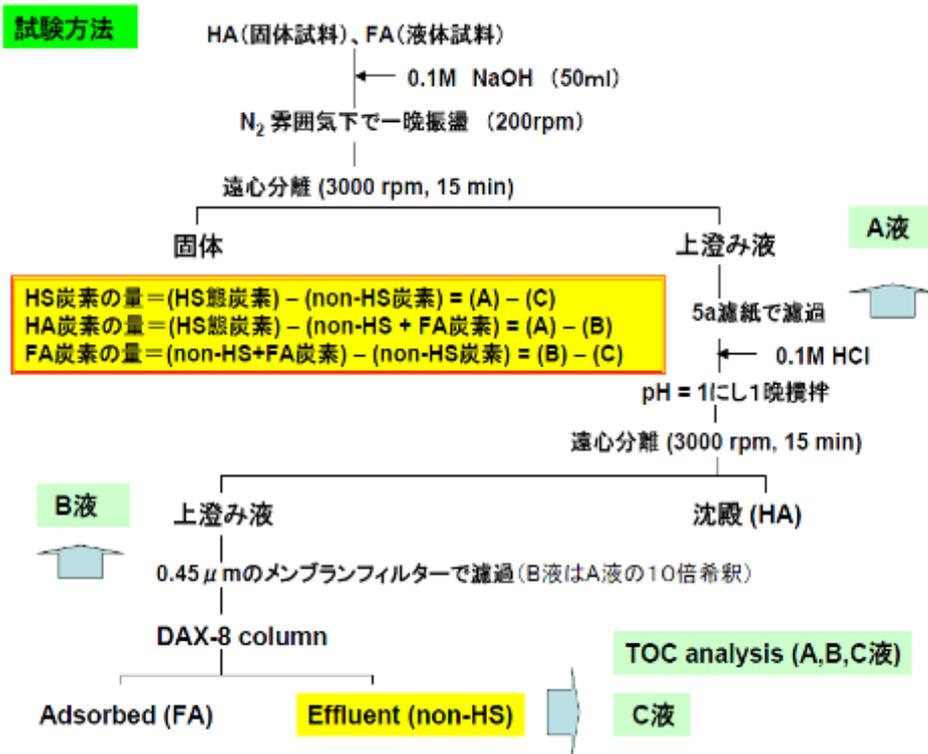
微生物群は大川で採取した河川堆積物でもっとも鉄還元活性の大きかった松川 1 の堆積物を用いた。ガラス製 100mL バイアル瓶にグルコース・アスパラギン培地（表 4.1.2-1）からグルコース、アスパラギンおよび酵母エキスを除いた培地 50mL と 0.5g の河川堆積物および炭素源を 1g 入れ、窒素雰囲気で培養した。炭素源としてはグルコース、酵母エキス、アスパラギン、樹木腐植物質および腐植酸（試薬）を用いた。所定時間ごとに約 2mL の培養液を採取し、チューブに入れ 10000 rpm の遠心分離を行った後の上澄み液中の鉄濃度および pH を測定した。鉄イオン濃度の分析はフェロジン法で行った。



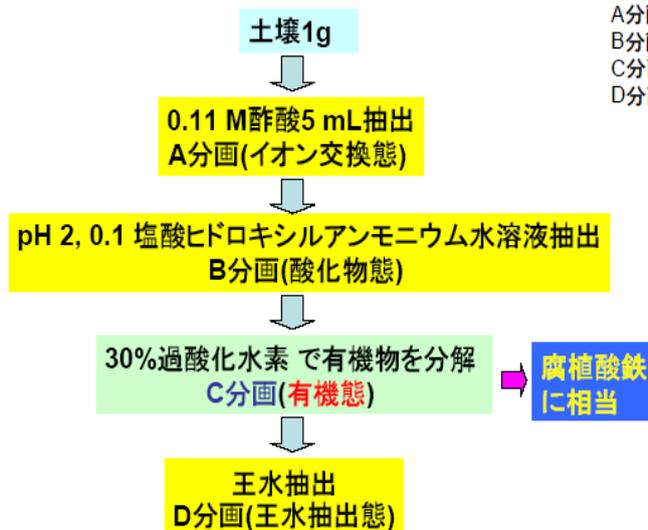
図 4.1.2-1 大川流域における河川堆積物採取地点

表 4.1.2-1 グルコース・アスパラギン培地の組成

化学物質	量
K_2HPO_4	3g
KH_2PO_4	0.8g
KCl	0.2g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.2g
酵母エキス	0.5g
アスパラギン	5g
グルコース	20g
Fe_2O_3	1g
蒸留水	1 L



土壌試料中の鉄の形態別測定スキーム



鉄の形態

- A分画: 無機の鉄塩(イオン交換態鉄)
- B分画: 鉄の酸化物(還元可能な酸化物態鉄)
- C分画: 腐植物質との錯体(有機態鉄)
- D分画: 上記以外の鉄。
砂粒子の表層に鉱物の形態で
取り込まれていた鉄(王水抽出態)

※ Yuan et al. Speciation of heavy metal in marine sediments from the east china sea by ICP-MS with sequential extraction, Environmental International 20, 769-783(2004).

図 4. 1. 2-2 (B) 河川堆積物中の鉄溶出形態測定スキーム

(3) 環境微生物、有機炭素および製鋼スラグとの相互作用に関する検討

微生物群は大川で採取した河川堆積物でもっとも鉄還元活性の大きかった松川 1 の堆積物を用いた。ガラス製 100mL バイアル瓶に 30mL のグルコース・アスパラギン培地（表 4.1.2-1）から Fe_2O_3 を除いた培地を入れ、鉄源としてスラグを 1.5g 添加した。腐植物質を添加する場合には樹木堆肥を 1.5g 添加し、窒素雰囲気 25°C で静置培養した。所定時間ごとに約 2mL の培養液を採取し、チューブに入れ 10000 rpm の遠心分離を行った後の上澄み液中の Fe^{2+} 濃度および pH を測定した。第一鉄イオン濃度の分析はフェロジン法で行った。なお、海水環境を模擬した試験においては表 4.1.2-1 の蒸留水を人工海水に置き換えた培地を用いた。

(4) 製鋼スラグおよび腐植物質との相互作用に関与する微生物群の検討

表 4.1.2-2 に示す試料 4 検体について PCR-DGGE 法による微生物相解析を行った。スラグ①、バーク②およびスラグバーク③については後述する屋外水槽試験で使用した試料であり、松川 1 については淡水環境において最も鉄還元活性の高かった試料である。

表 4.1.2-2 本試験に用いた試料

試料名
スラグ①
バーク②
スラグバーク③
松川 1

図 4.1.2-3 に PCR-DGGE（変性剤グラジエントゲル電気泳動）法による微生物相解析のフローを示す。試料からの DNA 抽出では試料 0.5 g を UltraClean DNA Isolation kit (MoBio 社)を用いて、添付のプロトコールに従って行った。PCR 反応では表 4.1.2-2 に示したプライマーを用い、バクテリア（細菌）およびアーキア（古細菌）の 16S-rRNA 遺伝子を増幅した。また、それぞれの PCR 条件を表 4.1.2-3 および表 4.1.2-4 に示す。この過程において 1 回目の PCR は、抽出した DNA を鋳型として用いた。2 回目の PCR では、1 回目の PCR 産物を鋳型とし、DGGE ゲルを用いた電気泳動を行うため、GC クランプ付（GC に富む配列）プライマーを用いて行った。2 回目の PCR の後、アガロースゲル電気泳動にて PCR 産物の増幅を確認した。

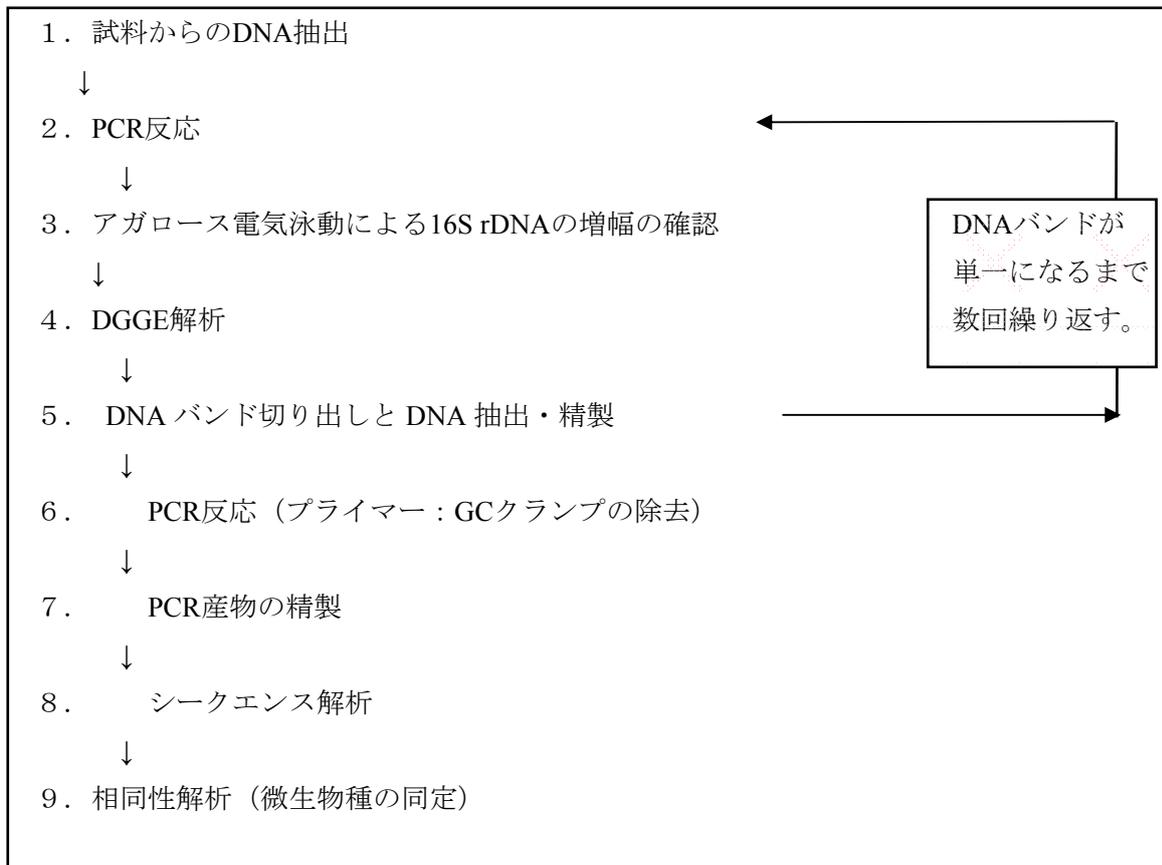


図 4.1.2-3 PCR-DGGE 法による微生物相解析のフロー

表 4.1.2-2 PCR に用いたプライマーの配列

対象	プライマー	配列
バクテリア	27F	5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'
	1525R	5'-AAAGGAGGTGATCCAGCC-3'
	341FGC	5'-CGCCCGCCGCGCGGCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGG GGCCTACGGGAGGCAGCAG-3'
	534R	5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3'
アーキア	46F	5'-YTAAGCCATGCRAAGT-3'
	1492R	5'-GGCTACCTTGTTACGACTT-3'
	340FGC	5'-CGCCCGCCGCGCGGCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGG GCCCTACGGGTGCASCAG-3'
	519R	5'-TTACCGCGGCKGCTG-3'

表 4.1.2-3 バクテリアのための PCR 条件

1 回目の PCR (Primer:27F, 1525R)		
95°C	5min	
95°C	1min	}
52°C	2min	
72°C	2min	
		30 cycles
72°C	5min	
10°C	∞	
2 回目の PCR (Primer:341FGC, 534R)		
95°C	5min	
95°C	1min	}
55°C	30sec	
72°C	30sec	
		30 cycles
72°C	5min	
10°C	∞	

表 4.1.2-4 アーキアのための PCR 条件

1 回目の PCR (Primer:46F, 1492R)		
95°C	5min	
95°C	1min	}
53.5°C	30sec	
72°C	1min	
		35cycles
72°C	10min	
10°C	∞	
2 回目の PCR (Primer:340FGC, 519R)		
95°C	1min	
95°C	1min	}
65°C	30sec	
72°C	30sec	
		35cycles
72°C	5min	
10°C	∞	

DGGE 解析では広範囲のバンドが得られるように、ゲル中の DNA 変性剤の濃度勾配を 30-70% (変性剤 100%とは、7M 尿素、40%ホルムアミドに相当) として DGGE 解析を行った (表 4.1.2-5)。電気泳動後、エチジウムブロマイドで染色を行い、脱染色後、UV トランスイルミネーター上でバンドを検出した。検出したバンドを滅菌されたメスで切り出した。切り出したゲルに、TE buffer(pH8.0)を加え、室温で一晩振とうさせた後、エタノール沈殿法により DNA の抽出・精製を行った。なお、分離能が低く、複数のバンドが混在している可能性のあるバンドについては、バンドが単一になるまで GC クランプ付 PCR および DGGE 解析を繰り返した。各バンドから抽出した DNA を鋳型として、シーケンス反応を行うため、GC クランプを外す PCR を行った。GC クランプを外す PCR の条件を表 4.1.2-6 に示す。

アガロースゲル電気泳動により、PCR 産物を確認し、次いで、アガロースから目的バンドを切り出して、精製キット (MonoFas ; ジーエルサイエンス社製) により、PCR 産物を精製した。精製した PCR 産物を鋳型として、ダイターミネーター法 (Big Dye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit ; ABI 社製) によりシーケンシング反応を行った。シーケンス解析は、ABI Prism310 Genetic Analyzer (ABI 社製) を用いた。解読した各バンドの DNA シーケンスを基に、インターネットを利用した FASTA 検索により EMBL (European Molecular Biology Laboratory: 欧州分子生物学研究所) のデータベースから微生物種の同定を行った。

表 4.1.2-5 DGGE ゲル濃度と泳動条件

ゲル作成のための試薬・泳動温度	濃度・条件
変性剤濃度勾配	30-70%
重合剤濃度 (10% Ammonium Persulfate)	0.7%
TEMED	0.07%
泳動温度	60°C

表 4.1.2-6 GC クランプの除去に用いた PCR 反応条件

バクテリア (Primer:341F, 534R)			
95°C	5min	}	30 cycles
95°C	1min		
55°C	30sec		
72°C	30sec		
72°C	5min		
4°C	∞		
アーキア (Primer:340F, 519R)			
95°C	1min	}	30cycles
95°C	1min		
65°C	30sec		
72°C	30sec		
72°C	5min		
4°C	∞		

4. 1. 2. 3 結果と考察

(1) 環境中における腐植酸鉄形成と微生物群との相互作用に関する検討

表 4.1.2-7 および図 4.1.2-4 に採取した河川堆積物に対するフミン酸を構成する炭素、フルボ酸を構成する炭素および非腐植酸を構成する炭素の割合を示す。多くの河川堆積物で試料中の有機炭素割合は 0.1%未満であったが、大川支流の松川上流部（松川 1,2）で試料中の有機炭素量が 1%以上と多くなっていた。また、有機炭素の形態はほとんどの地点でフミン酸態の割合が多くなっていたが、金成沢川ではフルボ酸態の割合が他地点と比べて多くなっていた。

表 4. 1. 2-7 河川堆積物中の有機炭素の存在割合（単位%）

場所	フミン酸態	フルボ酸態	非腐植酸態
松川1	1.1E+00	1.2E-01	2.3E-01
松川2	8.9E-01	8.5E-02	3.0E-01
松川3	3.6E-02	1.2E-03	1.7E-02
大川1	1.6E-02	8.3E-04	1.0E-02
大川4	3.6E-02	2.4E-03	1.4E-02
田茂木川1	4.5E-02	1.4E-03	1.6E-02
田茂木川2	1.3E-02	1.3E-03	6.8E-03
金成沢1	8.5E-03	2.4E-02	2.3E-02
金成沢2	3.6E-02	2.3E-02	3.5E-02
八瀬川1	5.4E-02	2.4E-02	3.4E-02
八瀬川2	2.0E-02	4.2E-03	2.9E-02
二十一川1	3.7E-01	4.4E-02	8.3E-02

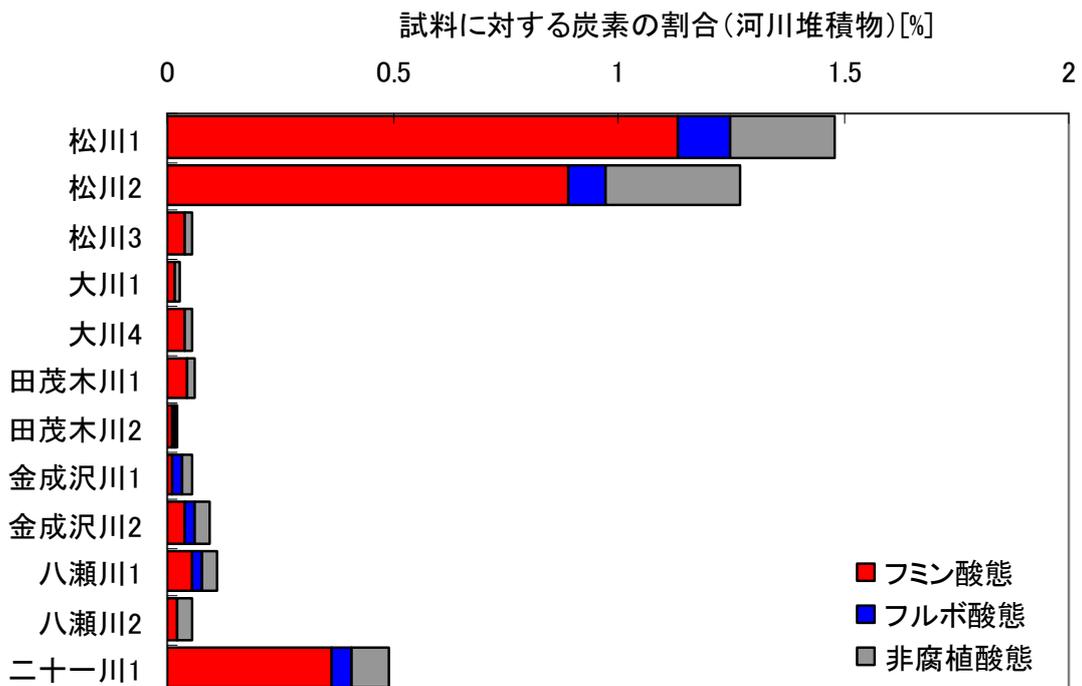


図 4. 1. 2-4 河川堆積物中の有機炭素の存在割合

表 4.1.2-8 および図 4.1.2-5 は河川堆積物中の鉄の存在形態を示したものである。ほとんどの地点で試料中の鉄分は王水抽出態であり、腐植酸鉄は 1%未満であった。一方、松川上流部では腐植酸鉄が約 0.2-0.3%と他の地点と比較して非常に多く含まれていた。この腐植酸鉄には比較的水溶性の高いフルボ酸鉄も含まれているため、これが溶出し周辺環境への鉄の物質循環に寄与している可能性が示唆された。

表 4.1.2-8 河川堆積物中の溶出鉄の存在割合（単位%）

場所	イオン交換態	酸化物態	腐植態	王水抽出態	合計
松川1	1.9E-03	7.6E-02	2.5E-01	1.5E+00	1.8E+00
松川2	4.2E-04	4.6E-02	3.8E-01	1.3E+00	1.7E+00
松川3	2.4E-04	2.8E-02	4.7E-03	1.8E+00	1.8E+00
大川1	4.1E-04	2.5E-02	3.1E-03	6.4E-01	6.7E-01
大川4	1.2E-03	2.7E-02	7.5E-03	9.2E-01	9.5E-01
田茂木川1	6.0E-05	1.2E-02	1.4E-03	1.5E+00	1.6E+00
田茂木川2	9.1E-05	1.5E-02	2.6E-03	8.4E-01	8.6E-01
金成沢川1	9.8E-06	1.4E-02	1.2E-02	3.3E+00	3.3E+00
金成沢川2	2.9E-05	2.4E-02	1.6E-02	3.6E+00	3.7E+00
八瀬川1	1.4E-06	2.3E-02	2.1E-02	4.3E+00	4.3E+00
八瀬川2	1.7E-04	3.2E-02	2.5E-02	4.0E+00	4.1E+00
二十一川1	5.7E-06	1.7E-02	3.8E-02	2.0E+00	2.0E+00

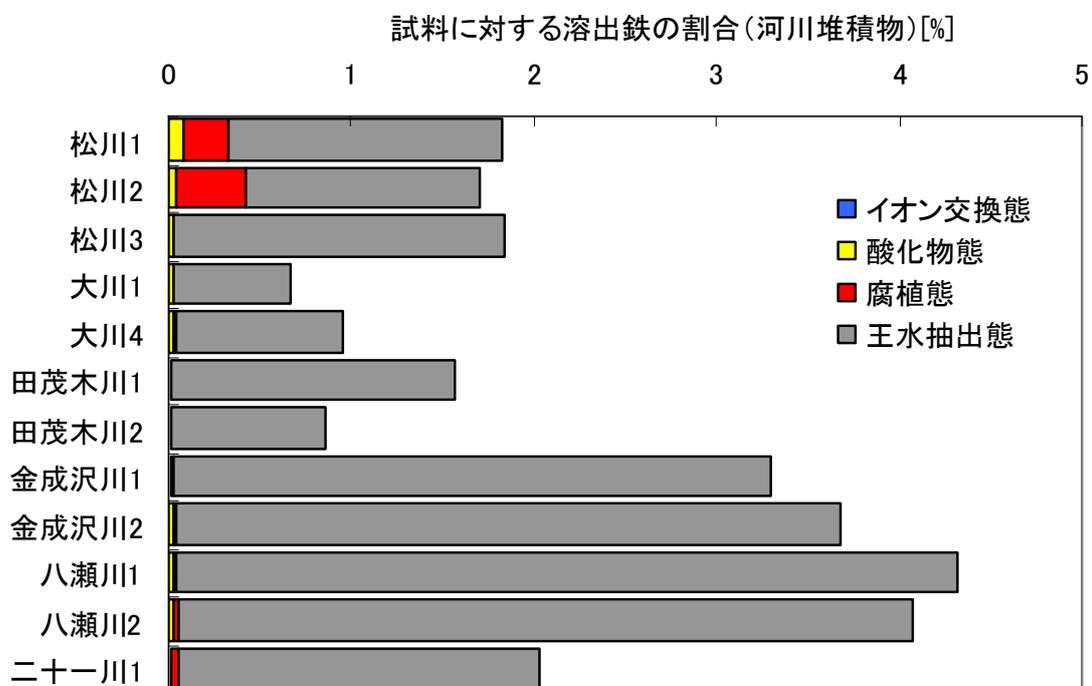


図 4.1.2-5 河川堆積物中の溶出鉄の存在形態

図 4.1.2-6 に河川堆積物中に棲息する微生物群による鉄還元試験（好氣的条件）の結果を示す。試験開始 4 日後から松川 1 および松川 2 において、溶液中の鉄イオンが上昇していることがわかる。また、第一鉄イオン濃度と全鉄濃度にほとんど差異がないことから、溶液中の鉄の存在形態はほとんどが第一鉄イオン (Fe^{2+}) であると考えられた。この反応は河川堆積物中に棲息する鉄還元細菌により鉄源である酸化鉄 (Fe_2O_3) が還元されたためである。一方、好氣的な条件のため還元生成した Fe^{2+} は鉄還元細菌の活性が低下すると、溶液中に供給された酸素や鉄酸化細菌の働きにより酸化され酸化鉄として再沈殿する。これが溶液中に鉄が溶出しある程度時間がたつと減少する理由である。

図 4.1.2-7 に河川堆積物中に棲息する微生物群による鉄還元試験（嫌氣的条件）の結果を示す。嫌氣的条件ではどの地点においても鉄還元が認められた。特に松川 1 では他地点より 3 倍程度多くの酸化鉄 (Fe_2O_3) が 2 価鉄に還元された。また、還元された Fe^{2+} は溶液中に酸素がないため酸化されることなく安定して溶液中に存在していた。このように河川堆積物中の腐植酸鉄が多い地点において、そこに棲息する微生物群の鉄還元活性が高くなっており、腐植酸鉄の形成に棲息する微生物群が深く関与することが示唆された。

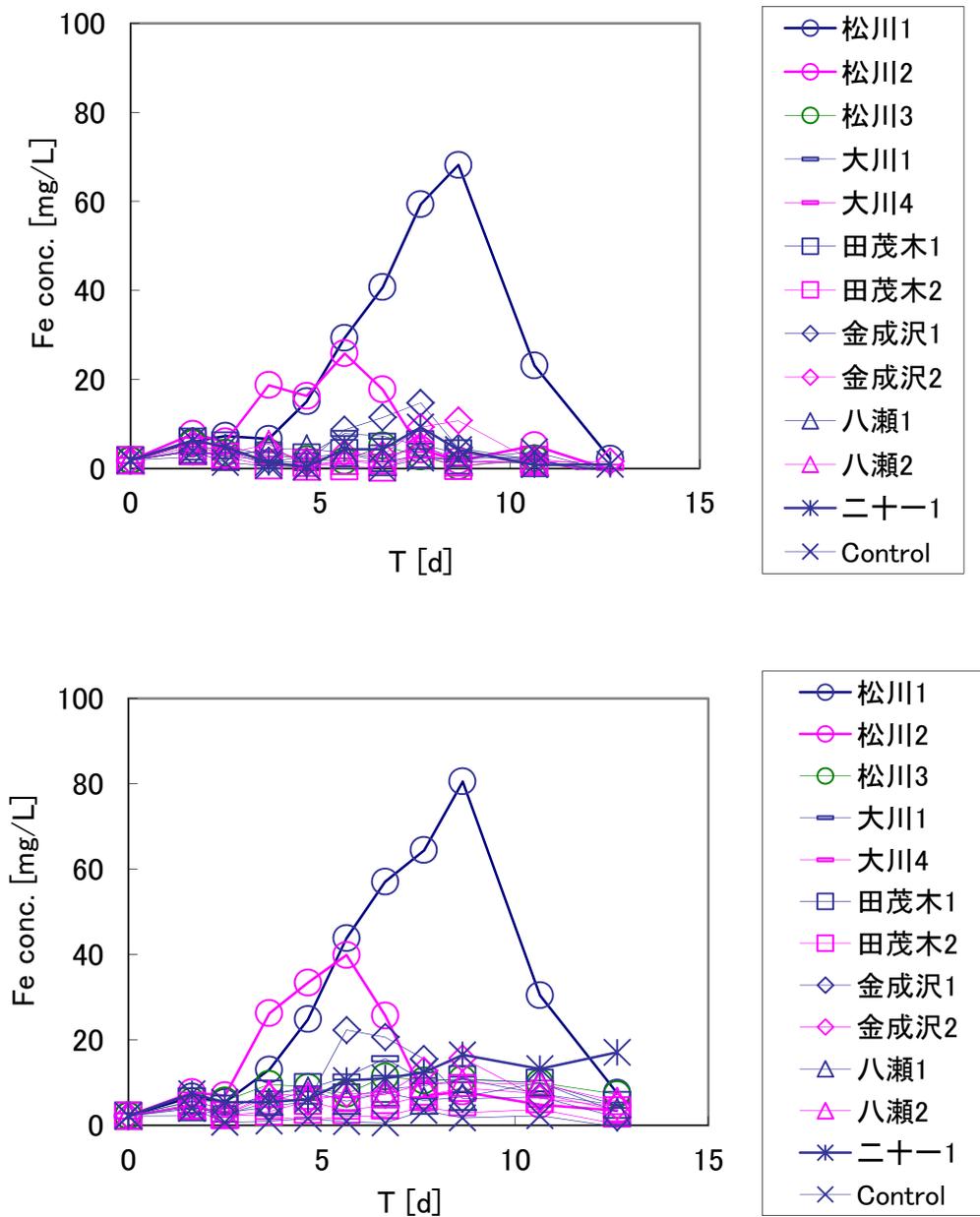


図 4. 1. 2-6 河川堆積物中に棲息する微生物群による鉄還元挙動 (好氣的条件)

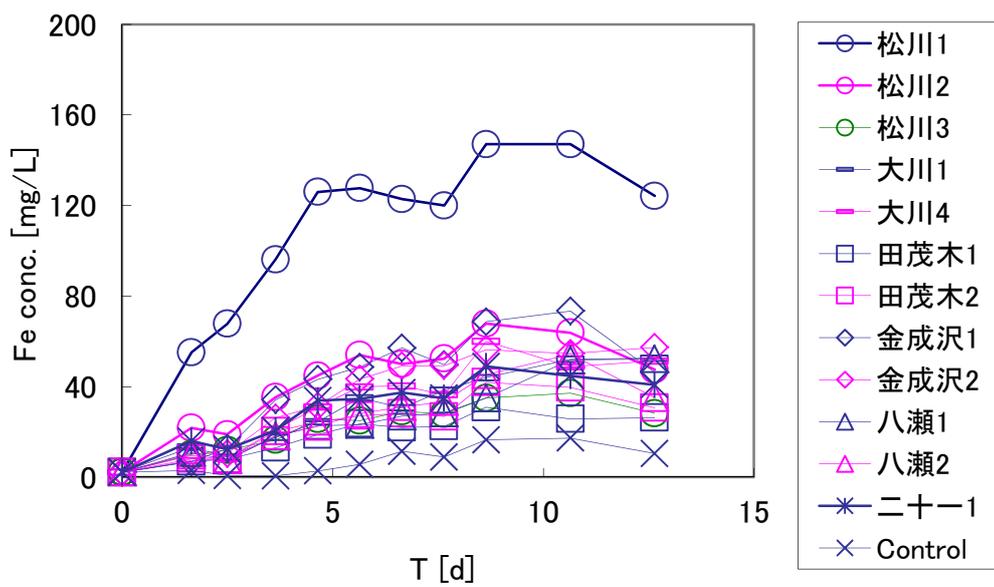
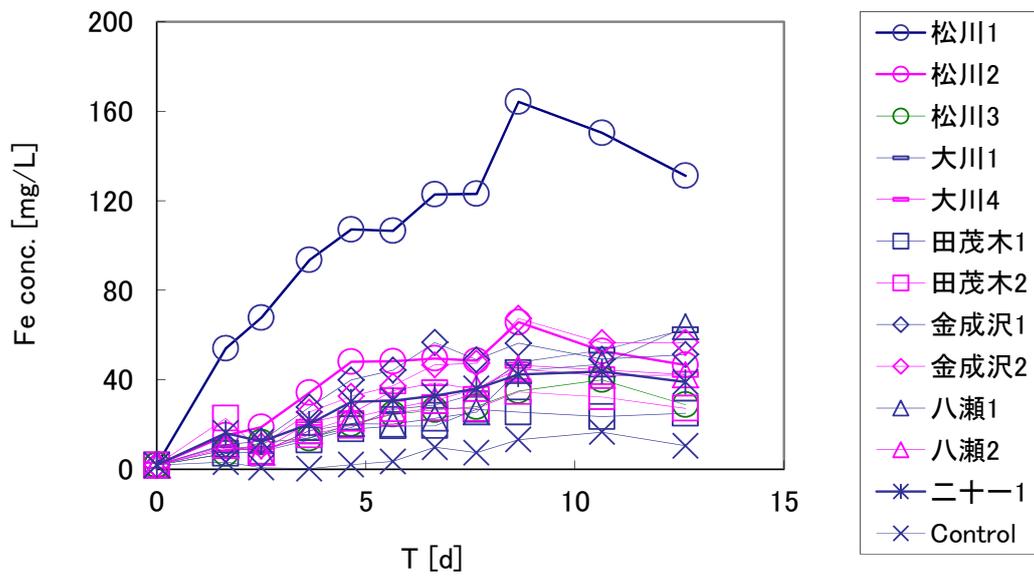


図 4. 1. 2-7 河川堆積物中に棲息する微生物群による鉄還元挙動 (嫌気的条件)

(2) 環境微生物群に有用な炭素源の選定

これまで、自然環境中における腐植物質と微生物との作用について検討し、河川堆積物中の腐植酸鉄が多い地点において、そこに棲息する微生物群の鉄還元活性が高くなることが明らかになった。一方、一般環境中において製鋼スラグを用いて上述した反応を促進するためには微生物群に有効な炭素源の選定が重要となる。そこで、腐植物質などさまざまな炭素源を用いて微生物による製鋼スラグからの鉄溶出試験を行い、微生物群に有用な炭素源を検討した。

図 4.1.2-8 に炭素源を変えたときの微生物群による鉄溶出挙動 (Fe^{2+})、図 4.1.2-9 に全鉄および図 4.1.2-10 にその場合の pH の変化を示す。なお図中の記号は以下の通りである。

炭素源	記号	
	微生物接種無し	微生物接種有り
無し	nn	ny
酵母エキス	Yn	Yy
グルコース	Gn	Gy
アスパラギン	An	Ay
樹木腐植物質	Bn	By
腐植酸 (試薬)	Hn	Hy

図 4.1.2-8、図 4.1.2-9 より鉄の溶出挙動は炭素源により異なるといえる。酵母エキスやアスパラギンを利用した場合には鉄の溶出はほとんど促進されなかった。もっとも溶出量が大きい炭素源は腐植酸 (試薬) を利用した場合であったが、微生物を接種しない場合でもある程度溶出が進行し、その約 70%が Fe^{2+} であることから、比較的溶出しやすい Fe^{2+} が腐植酸自体に含まれているものと考えられた。

グルコースを炭素源とした場合では実験開始後 pH の低下が認められた。これは微生物を接種した場合のみ確認されることから、微生物群によるグルコースの消費により、乳酸や酢酸などの有機酸が形成されたためと考えられた。また、全鉄イオン濃度は約 100 時間後には腐植酸を用いた場合の濃度よりも大きくなった。しかし、その約 50%以上は Fe^{3+} であり、微生物群による鉄還元反応が促進されるというよりは、pH の低下により Fe_2O_3 中の Fe^{3+} の溶出が促進されたものと考えられた。250 時間後以降経過すると全鉄イオンは減少していくが、これは Fe^{3+} が再沈殿したものと考えられる。最終的には全鉄イオンのほとんどが Fe^{2+} となっており、微生物群による鉄還元反応にグルコースは有用であると考えられた。

樹木腐植物質を用いた場合には、その速度は遅いものの鉄の溶出が促進された。また、それ自体に鉄が多く含まれておらず、 Fe^{2+} への還元反応も進行していることから微生物群による鉄還元反応に有用であると考えられた。また、この腐植物質は廃材を利用しており資材の有効利用という観点からも、本腐植物質を利用する意義は大きいものといえる。

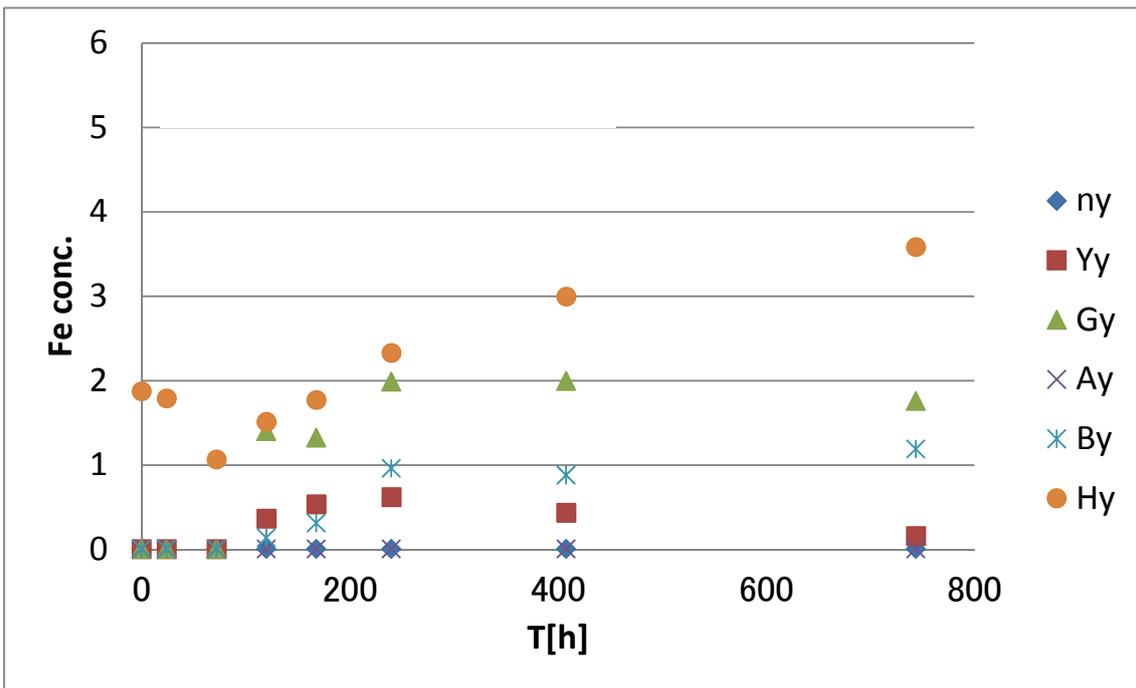
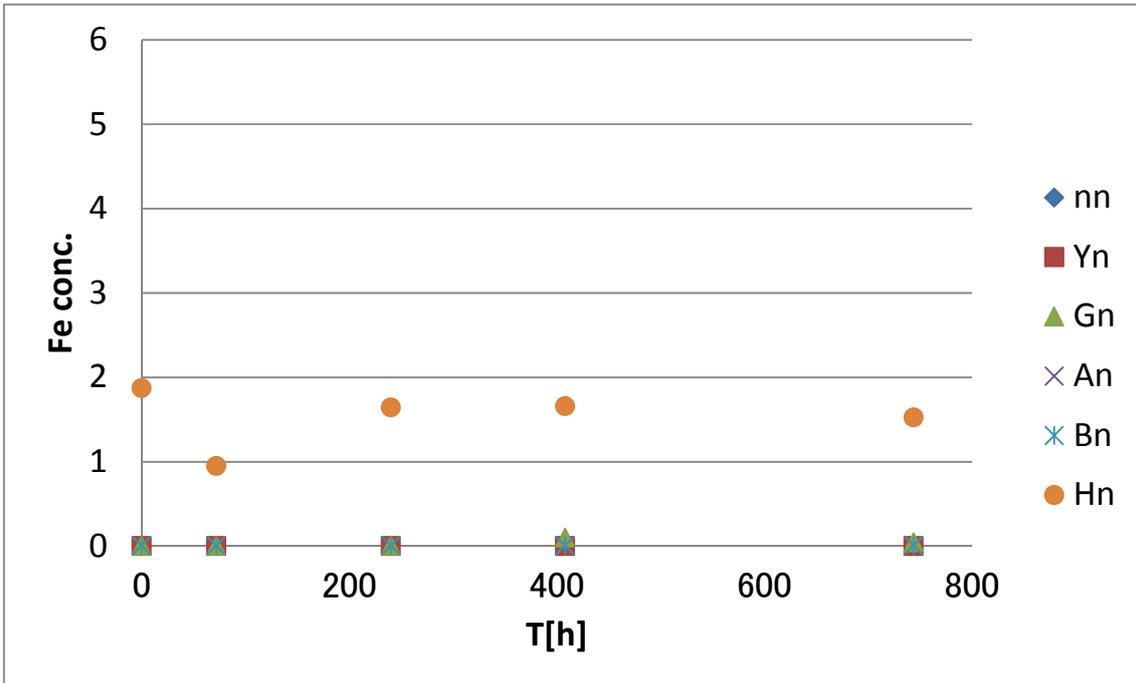


図 4.1.2-8 炭素源を変化させた場合における微生物群による鉄溶出挙動 (Fe^{2+})

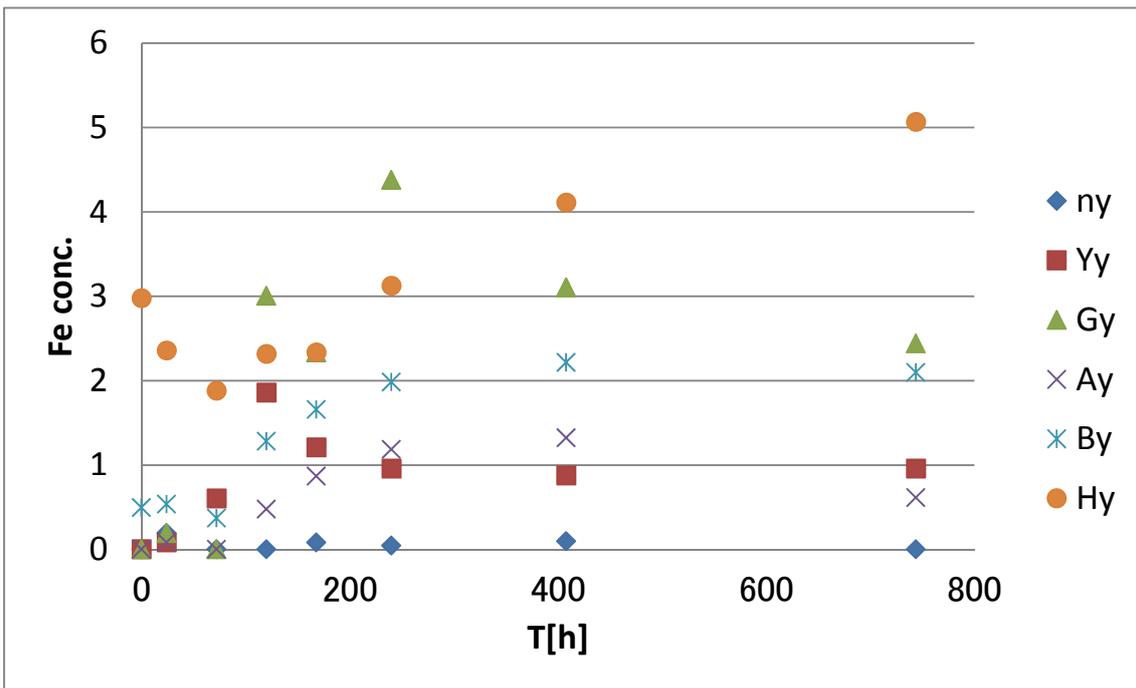
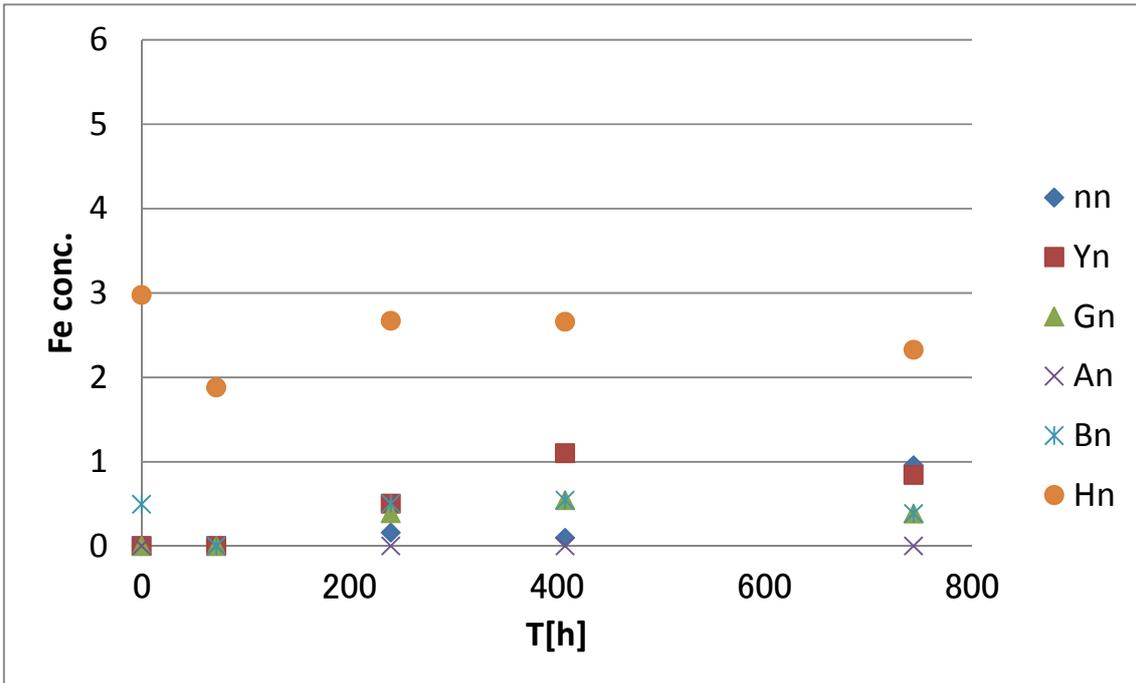


図 4.1.2-9 炭素源を変化させた場合における微生物群による鉄溶出挙動（全鉄）

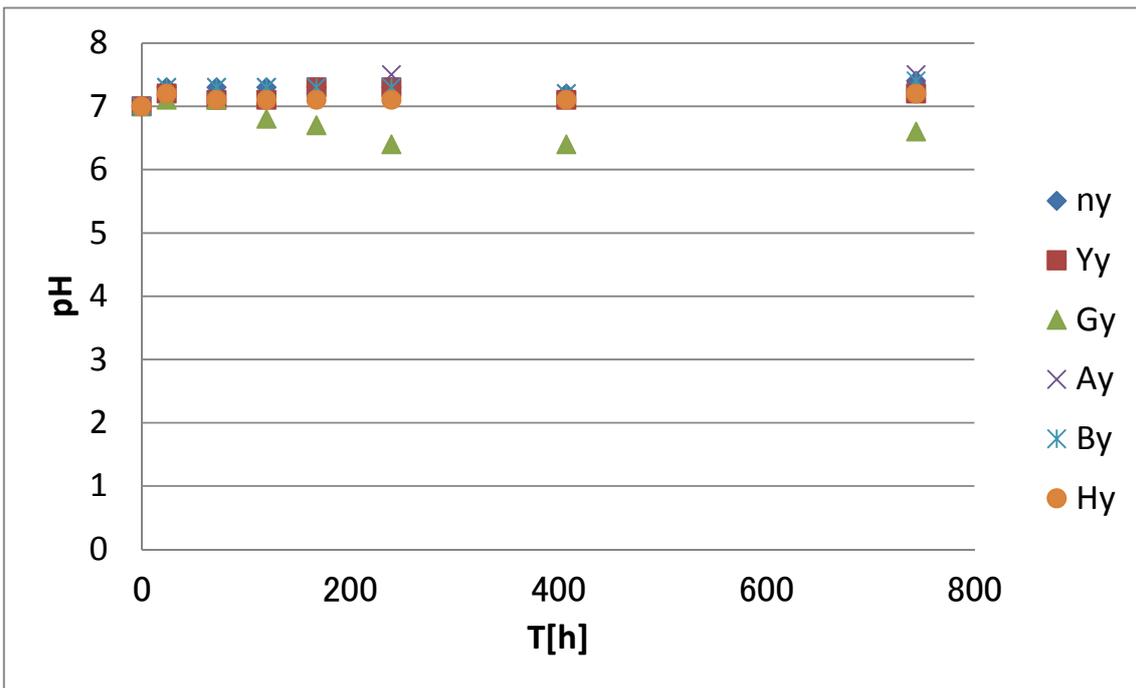
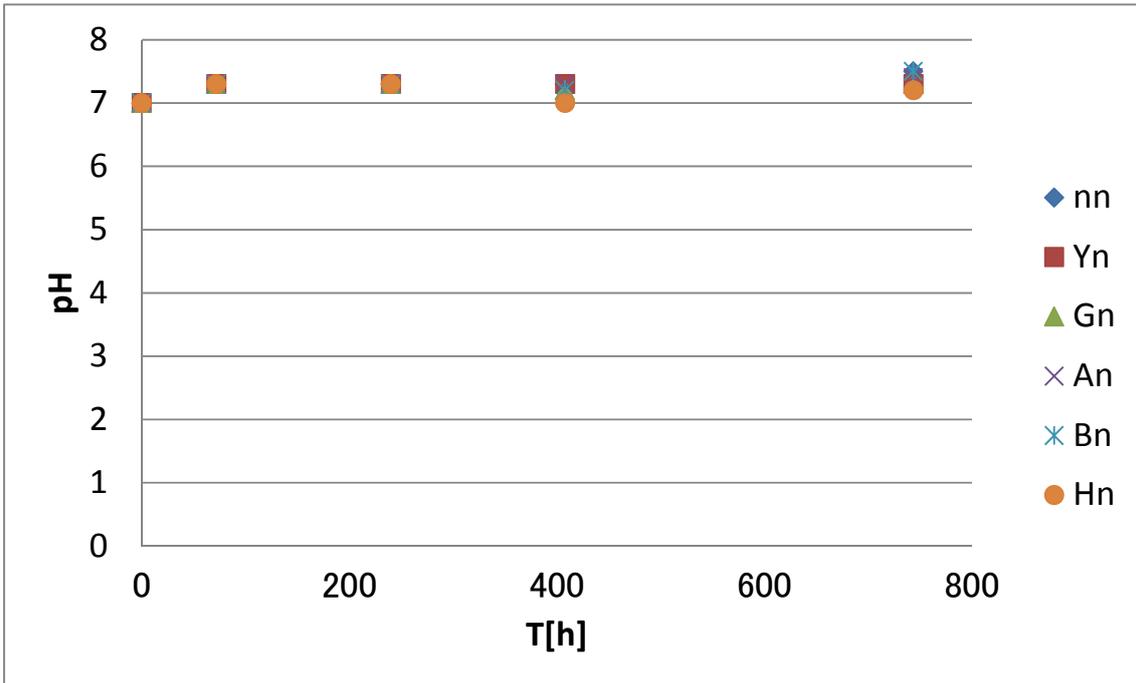


図 4.1.2-10 炭素源を変化させた場合における微生物群による鉄溶出挙動に伴う pH 変化

(3) 環境微生物、有機炭素および製鋼スラグとの相互作用に関する検討

これまで環境中の腐植酸鉄と鉄還元細菌との作用および環境中への鉄の供給に有用な炭素源について検討してきた。一方、鉄源として製鋼スラグを供与した場合、製鋼スラグから溶出する有害元素等により微生物群による鉄溶出反応が阻害される可能性がある。そこで、様々な種類と性状の製鋼スラグを用いて環境微生物を用いた溶出試験を行った。製鋼スラグについては転炉スラグとそれを炭酸化処理した炭酸スラグの2種類を用いた。また、使用した腐植物質は樹木腐植物質である。

転炉スラグを用いた場合は溶液中の pH が約 13 まで上昇し、微生物による鉄の溶出が阻害された。一方、製鋼スラグを炭酸化処理したものをを用いた場合では、溶液の pH が 8 前後と安定し、鉄還元細菌による第一鉄イオンの溶出促進が認められた。図 4.1.2-11 に微生物群による炭酸化スラグからの鉄溶出挙動を示す。なお図中の記号は以下の通りである。

記号	腐植物質添加	微生物接種
HnBn	無	無
HyBn	有	無
HnBy	無	有
HyBy	有	有

本図より、微生物を接種した系ではどちらも鉄の溶出が促進されていることがわかる。また腐植物質を添加した系では、添加しない場合よりも約 3 倍溶出が促進された。

図 4.1.2-12 に全鉄に対する Fe^{2+} の割合を示すが、腐植物質を添加した場合には、溶液中の鉄の約 80%以上が Fe^{2+} と高濃度で 2 価鉄を維持することが可能であった。一方、腐植物質がない場合、実験開始から 120 時間程度までは高い割合で Fe^{2+} が存在するものの、それ以降は Fe^{3+} の割合が上昇してきた。これは、実験開始直後は微生物による鉄還元活性が高く、培養液中の鉄還元細菌に有用な炭素源を全て消費し、活性が低下すると鉄酸化細菌や自然酸化が進行したためと考えられる。一方、腐植物質が存在する場合、長期間鉄還元細菌に有用な炭素源が少しずつ供給されるため、高い鉄還元活性を維持できるものと推定された。

図 4.1.2-13 は本実験における pH 変化を示す。微生物を接種した 2 系統については、どちらも溶液中に有機酸が放出されたため pH が低下している。腐植物質を添加しない場合では鉄還元活性が低下したあたりから pH の再上昇が認められた。これは有機酸を形成する微生物の活性が低下し、製鋼スラグからアルカリ成分の溶出が加速されたためと考えられる。一方、腐植物質が存在する場合には、pH が 5 前後と弱酸性を維持していることから、有機酸形成と鉄還元反応を長期間継続できるものと推定された。以上の結果から鉄還元細菌などの環境微生物に適切な製鋼スラグと腐植物質を供与することにより、環境中への鉄溶出がさらに促進され、生態系修復に大きく寄与する可能性が示唆された。

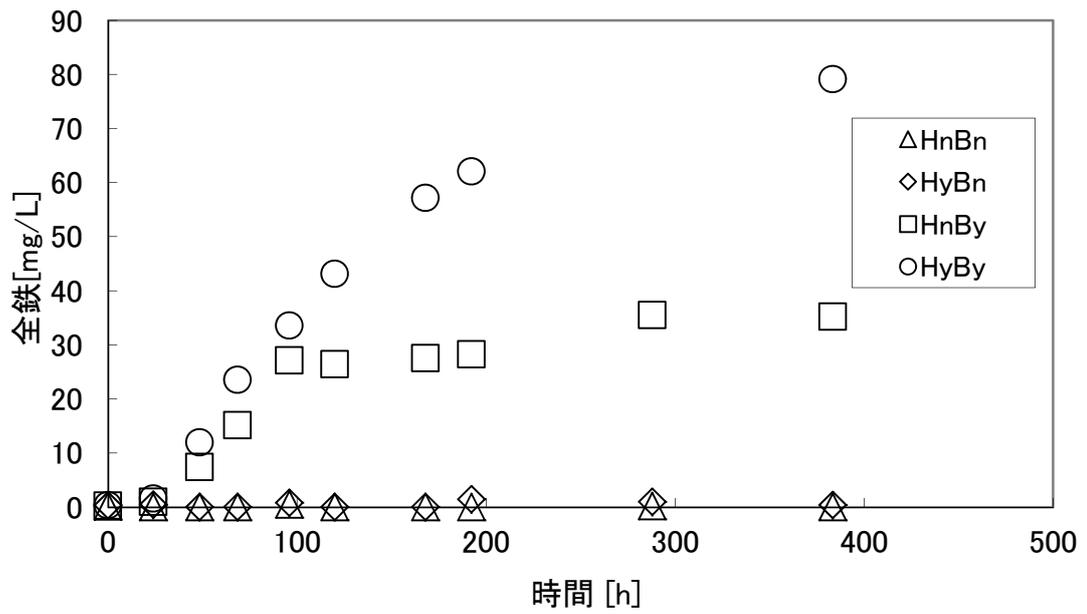
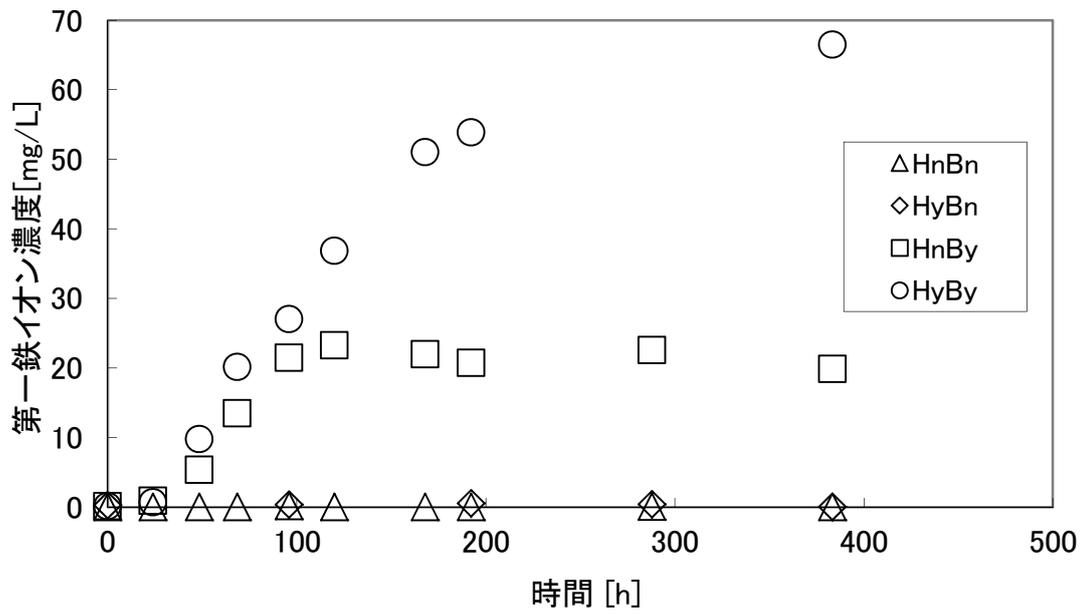


図 4.1.2-11 微生物群による炭酸化スラグからの鉄溶出挙動（上：Fe²⁺、下：全鉄）

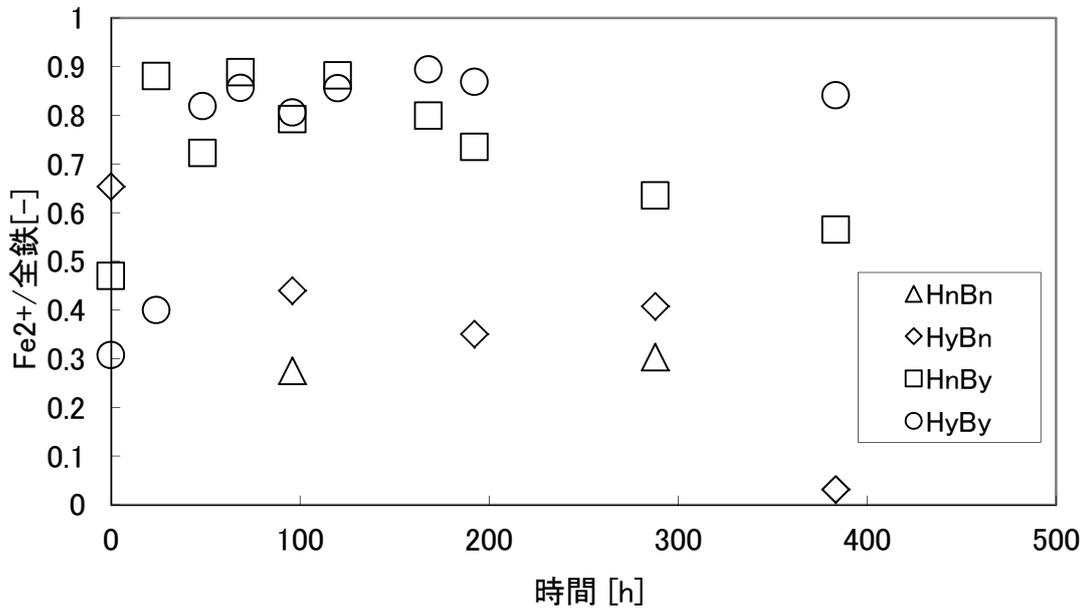


図-4.1.2-12 微生物群による炭酸化スラグからの鉄溶出挙動、全鉄に対する Fe^{2+} の割合変化

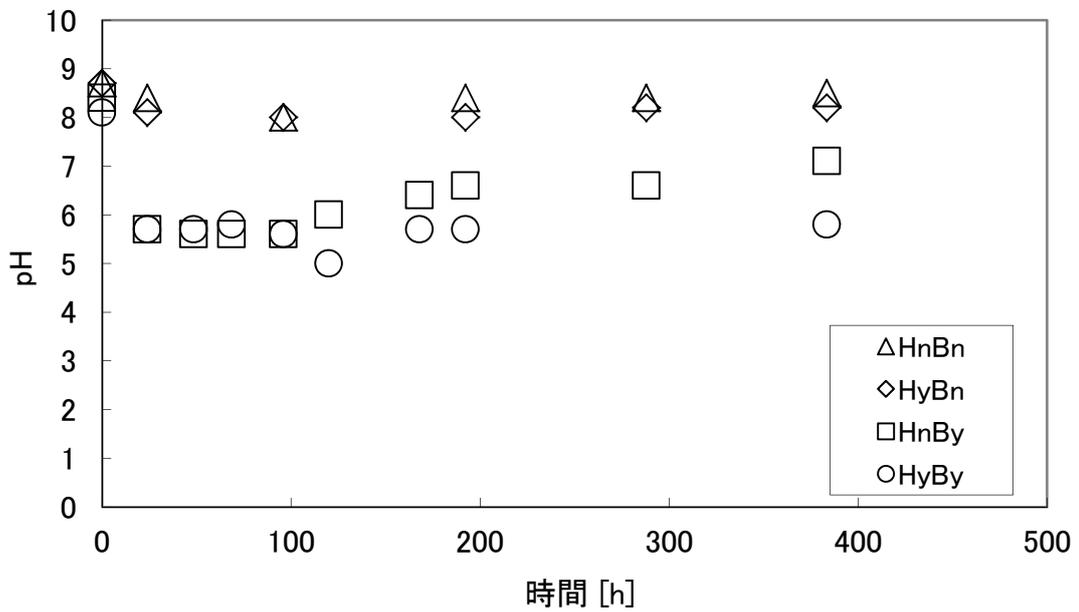


図 4.1.2-13 微生物群による炭酸化スラグからの鉄溶出挙動、pH 変化

図 4.1.2-14 に微生物群による炭酸化スラグからの二価鉄溶出に及ぼす腐植物質および海水の影響を示す。摂取した微生物群は昨年度の成果により最も鉄還元活性の大きかった松川 1 の微生物群である。微生物群を供与することによりスラグからの二価鉄溶出が促進された。一方、図では示していないが微生物群を摂取しない場合ではスラグからの鉄の溶出がごく微量であり、この二価鉄の溶出は微生物による活動によるであるといえる。淡水と海水の系とを比較すると溶出速度は淡水の方が速いものの、全溶出量は海水の方が多くなった。これは、本試験で用いた微生物群は淡水から採取したものであり、海水に順応するのに時間を要したためと考えられる。また、海水の場合で全溶出量が多くなったのは、海水によりスラグ中の金属が腐食し、溶出しやすくなったためと推測される。さらに腐植物質の有無による溶出挙動について比較すると、腐植物質を供与した場合には淡水、海水とも全溶出量が供与しない場合の 2-3 倍多くなった。図 4.1.2-15 に全鉄に対する二価鉄の割合を示すが、腐植物質を添加した場合には、溶液中の鉄の約 80%以上が二価鉄と高濃度で維持することが可能であった。一方、腐植物質がない場合、実験開始からある程度の時間までは高い割合で二価鉄が存在するものの、それ以降は三価鉄の割合が上昇してきた。これは、実験開始直後は微生物による鉄還元活性が高く、培養液中の鉄還元細菌に有用な炭素源を全て消費し、活性が低下してくると鉄酸化細菌や自然酸化が進行したためと考えられる。一方、腐植物質が存在する場合、長期間鉄還元細菌に有用な炭素源が少しずつ供給されるため、高い鉄還元活性を維持できるものと推定された。

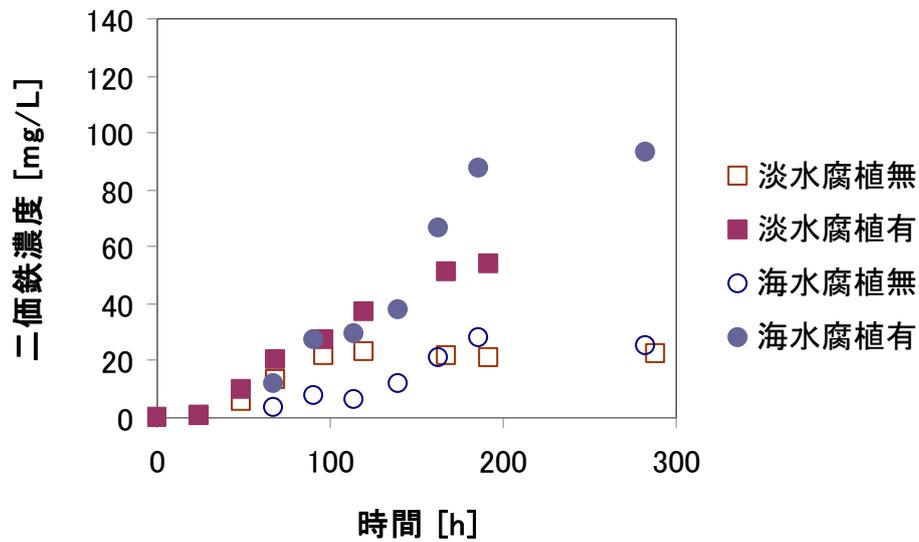


図 4.1.2-14 微生物群による炭酸化スラグからの鉄溶出挙動に及ぼす腐植物質および海水の影響（二価鉄）

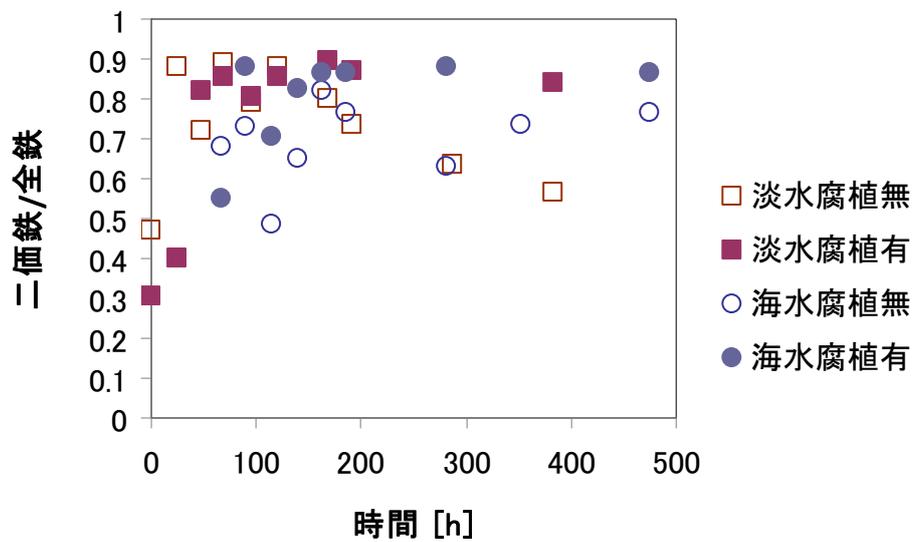


図 4.1.2-15 微生物群による炭酸化スラグからの鉄溶出挙動に及ぼす腐植物質および海水の影響（全鉄に対する二価鉄の割合）

(4) 製鋼スラグおよび腐植物質との相互作用に関する微生物群の検討

微生物は、腐植物質を電子受容体や電子供与体として利用する。また、図 4.1.2-16 に示すように電子シャトルリング（電子往復）によって不溶性 Fe(III) 鉱物の還元を仲介することが知られており、その際に、腐植物質は電子のメディエーターとして利用される。これらの腐植物質を利用する微生物を表 4.1.2-9 にまとめ、DGGE 解析結果の解釈に用いた。

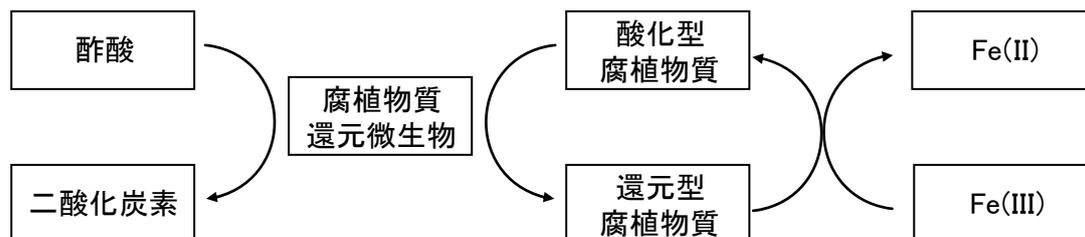


図 4.1.2-16 エレクトロンシャトルリングの模式図

表 4.1.2-9 腐植物質を利用する微生物

分類	腐植物質の 利用方法	その他の微生物学的 特徴	種名	備考	
腐植物質還元菌	電子受容体	金属還元菌	<i>Geobacter metallireducens</i>	<i>Geobacteraceae</i> 科に属する	腐植物質酸化も行うことが可能
			<i>Desulfitobacterium metallireducens</i>	<i>Geobacteraceae</i> 科に属する	腐植物質酸化も行うことが可能
			<i>Desulfitobacterium</i> 属菌	<i>Geobacteraceae</i> 科に属する	腐植物質酸化も行うことが可能
			<i>Shewanella alga</i>		腐植物質酸化も行うことが可能
			<i>Wolinella succinogenes</i>		腐植物質酸化も行うことが可能
			<i>Geothrix fermentans</i>		腐植物質酸化も行うことが可能
		脱ハロゲン微生物	<i>Desulfitobacterium dehalogenans</i>	<i>Geobacteraceae</i> 科に属する	
		硫酸還元菌	<i>Desulfovibrio</i> 属菌		
		メタン生成菌	<i>Methanospirillum hungatei</i>		
		発酵菌	<i>Propionibacterium freudenreichii</i>		
			<i>Lactococcus lactis</i>		
			<i>Enterococcus cecorum</i>		
		トルエン分解菌	種名不明		
		塩化ビニルおよび ジクロロエタン分解 菌	種名不明		
		超高熱菌	<i>Thermotoga maritima</i>		
			<i>Corynebacterium humireducens</i>		フミン酸還元菌
			<i>Pyrobaculum islandicum</i>		アーキア
			<i>Pyrodictium abyssi</i>		アーキア

次ページに続く

			<i>Pyrococcus furiosus</i>	アーキア
			<i>Archaeoglobus fulgidus</i>	アーキア
			<i>Thermococcus celer</i>	アーキア
		超高熱菌 メタン生成菌	<i>Methanopyrus kandleri</i>	アーキア
		高熱菌 メタン生成菌	<i>Methanococcus thermolithotrophicus</i> <i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i>	
腐植物質酸化菌	電子供与体	脱窒菌	<i>Pseudomonas</i> 属菌	
		脱窒菌 鉄還元菌	<i>Paracoccus denitrificans</i>	
		過塩素酸還元菌	<i>Dechloromonas</i> 属菌	
		その他	<i>Azoarcus</i> 属菌 <i>Myxobacteria</i>	
腐植物質還元菌	エレクトロン	鉄還元菌	<i>Geobacteraceae</i> 科細菌	
	シャトリング	超高熱菌	<i>Pyrobaculum islandicum</i>	アーキア

バクテリアおよびアーキアの DGGE のバンドパターンと塩基配列を解読したバンドを図 4.1.2-17 に示す。なお、青字で記載したバンドについては、腐植物質に関連のある微生物であることを示している。また、相同性解析結果を表 4.1.2-10 および表 4.1.2-11 に示す。

模擬水槽にスラグ単体を投与した場合には、1～9 の 9 バンドの塩基配列を解読したが、腐植物質に関連のある微生物種は検出されなかった。

バーク単体を投与した場合には、10～17 の 8 バンドについて塩基配列を解読することができ、バンド 11、12 および 17 の 3 バンドが腐植物質と関連のある微生物種と考えられた。バンド 11 は金属還元菌 *Shewanella putrefaciens* に近縁な微生物（相同性 95.4%）であり、同属他種の *Shewanella alga* は腐植物質を還元することが報告されている。そのため、バンド 11 は腐植物質に関連のある微生物と考えられた。バンド 12 は硫酸還元菌 *Desulfocapsa* sp. に近縁な微生物（相同性 95.5%）であった。近縁の硫酸還元菌 *Desulfovibrio* 属菌が腐植物質を還元することが報告されていることから、バンド 12 は腐植物質に関連のある微生物と考えられた。バンド 17 は硫酸還元菌 *Desulfobacterium anilini* に近縁な微生物（相同性 93.6%）であった。バンド 12 と同様に、近縁の硫酸還元菌 *Desulfovibrio* 属菌が腐植物質を還元することが報告されていることから、バンド 17 は腐植物質に関連のある微生物と考えられた。

スラグおよびバークを投与した場合には、18～26 の 9 バンドについて塩基配列を解読することができ、バンド 25 が腐植物質と関連のある微生物種であると考えられた。バンド 25 に最も近縁な微生物種は *Fusibacter* sp.（相同性 95.4%）であったが、その次に近縁な微生物種は硫酸還元菌 *Desulfobacterium anilini* に近縁な微生物（相同性 93.6%）であった。バンド 12 およびバンド 17 と同様に近縁の硫酸還元菌 *Desulfovibrio* 属菌が腐植物質を還元することが報告されていることから、バンド 25 は腐植物質に関連のある微生物である可能性が考えられた。

松川では、バンド 27～31 の 5 バンドについて塩基配列を解読することができ、バンド 27、29、30 の 3 バンドが腐植物質と関連のある微生物種であると考えられた。バンド 27 は *Pseudomonas aeruginosa*、*P. stutzeri* および *P. otitidis* と相同性が 100%であることから、*Pseudomonas* 属菌であると考えられた。*Pseudomonas* 属菌には、腐植物質を酸化する種が存在することが報告されていることから、バンド 27 は腐植物質に関連のある微生物と考えられた。バンド 29 は *Azoarcus* sp. に近縁な微生物（相同性 91%）であった。*Azoarcus* 属菌には、腐植物質を酸化する種が存在することが報告されていることから、バンド 29 は腐植物質に関連のある微生物と考えられた。バンド 30 に最も近縁な微生物種は *Alcaligenaceae* 科細菌（相同性 91.6%）であったが、その次に近縁な微生物種はトルエン分解菌である *Georgfuchsia toluolica*（相同性 90.1%）であった。トルエン分解菌の中には、腐植物質を還元する種が存在することが報告されている。また、*G. toluolica* は Fe (III)を電子受容体とし

て利用し、鉄還元能を有する。腐植物質を還元する微生物には、鉄還元菌が含まれている。これらのことから、バンド 30 は腐植物質に関連のある微生物である可能性が考えられた。

一方、アーキアでは A1～A5 の 5 バンドについて塩基配列を解読した。その結果、腐植物質に関連するアーキアは検出されなかった。A2 は相同性が 89.3%と低かったが、メタン生成菌 *Methanolobus oregonensis* に近縁な微生物と推定された。腐植物質を利用するメタン生成菌に関しては、*Methanococcus* 属菌、*Methanobacterium* 属菌、*Methanopyrus* 属菌および *Methanospirillum* 属菌の報告例がある。これらのメタン生成菌は水素と二酸化炭素を利用してメタン生成を行う (*Methanospirillum* 属菌はギ酸や酢酸も利用し、メタン生成を行うことが可能である)。一方、A2 の近縁メタン生成菌である *Methanolobus* 属菌は、メタノールやメチルアミンを利用してメタン生成を行う。*Methanococcus* 属菌、*Methanobacterium* 属菌、*Methanopyrus* 属菌および *Methanospirillum* 属菌と *Methanolobus* 属菌は、同じメタン生成菌であるが資化性が大きく異なることから、微生物的な特徴が異なるものと推察される。そのため、A2 は腐植物質に関連のある微生物である可能性は低いものと考えられた。

以上の結果より、模擬水槽中に腐植物質であるバーク堆肥あるいは製鋼スラグとの混合体を設置した場合には、腐植物質を利用する微生物が存在しており、これらの微生物群がエレクトロンシャトルリングによって製鋼スラグ中に存在する不溶性 Fe(III)の還元を仲介す可能性が示唆された。また、松川 1 についても同様の微生物群が存在する他、鉄還元細菌が存在しておりそれらの微生物群の働きにより二価鉄への還元速度が促進されるものと推測された。

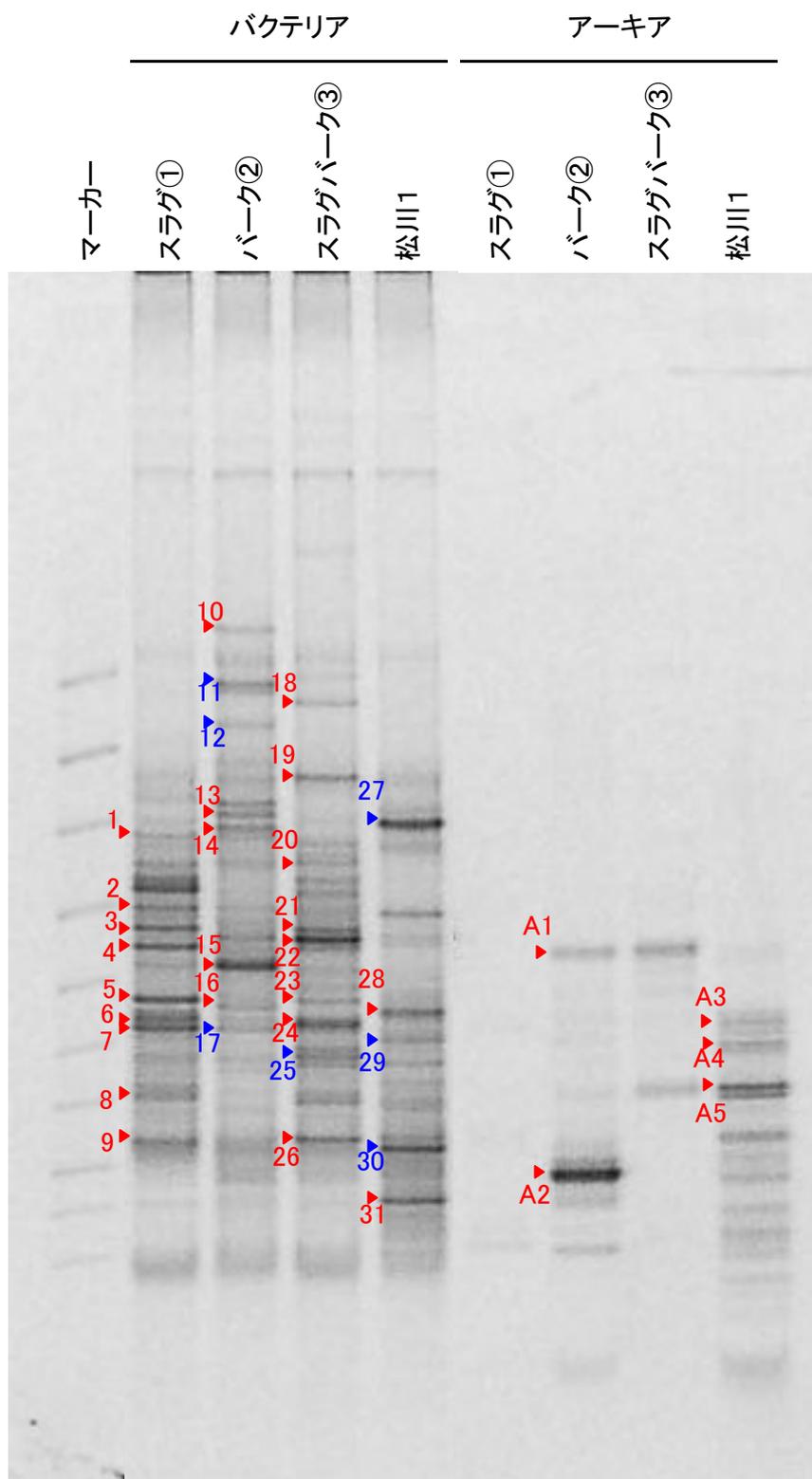


図 4.1.2-17 バクテリアおよびアーキアの DGGE 画像

表 4.1.2-10 バクテリアの相同性解析結果

Band No.	Access No.	Source	Identity (%)	Overlap (nt)	分離源	腐植物質との関連	引用文献
1	L40809	<i>Thiomicrospira pelophila</i> 16S ribosomal RNA (16S rRNA) gene	99.2	131	深海熱水噴出孔	関連性は確認できず	Muyzer et al.(1995)
	AF016046	<i>Thiomicrospira thyasirae</i> 16S ribosomal RNA gene	99.2	131	記載なし	関連性は確認できず	Brinkhoff and Muyzer (1997)
	AF013976	<i>Thiomicrospira</i> sp. JB-A1F 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99.2	131	干潟	関連性は確認できず	Brinkhoff and Muyzer (1997)
2	JQ083334	<i>Vibrio cyclitrophicus</i> strain WA54 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98.5	131	アワビの腸管	関連性は確認できず	EMBL データベース
	JN128262	<i>Vibrio kanaloae</i> strain HNS028 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.	98.5	131	カイメン	関連性は確認できず	EMBL データベース
	AJ515224	<i>Vibrio splendidus</i> partial 16S rRNA gene, strain PMV18	98.5	131	イタヤガイ	関連性は確認できず	Le Roux et al. (2004)
3	AY387858	<i>Pseudoalteromonas aliena</i> 16S ribosomal RNA gene	99.2	131	海水	関連性は確認できず	Ivanova et al. (2004)
	EU864261	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. p31 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.	99.2	131	玄武岩 (深度 2253m)	関連性は確認できず	EMBL データベース
	AF200216	<i>Psychrophilic</i> marine bacterium PS39 16S ribosomal RNA gene	99.2	131	海水	関連性は確認できず	EMBL データベース

Band No.	Access No.	Source	Identity (%)	Overlap (nt)	分離源	腐植物質との関連	引用文献
4	EU091332	<i>Vibrio splendidus</i> isolate PB1-10rrnH 16S ribosomal RNA gene	100	131	アメリカ産ヒラメ (Atlantic halibut) の稚魚	関連性は確認できず	Jensen et al. (2009) EMBL データベース
	HE584774	<i>Vibrio tasmaniensis</i> 16S rRNA gene, isolate AP16	100	131	フクトコブシ	関連性は確認できず	
	DQ923441	<i>Vibrio</i> sp. W-7 16S ribosomal RNA gene	100	131	Qingdao Fushan 湾の海洋性細菌に関連	関連性は確認できず	EMBL データベース
5	EU839359	<i>Roseobacter</i> sp. Bo10-20 16S ribosomal RNA gene	100	106	糸状性の海洋細菌に関連	関連性は確認できず	Hube et al. (2009)
	HQ852039	<i>Roseovarius</i> sp. MA1-10 16S ribosomal RNA gene	100	106	ホヤに関連のある細菌	関連性は確認できず	EMBL データベース
	FJ869041	<i>Rhodobacterales</i> bacterium CB1005 16S ribosomal RNA gene	100	106	チェサピーク湾深度13mの海水	関連性は確認できず	EMBL データベース
6	AB518880	<i>Litoreibacter janthinus</i> gene for 16S ribosomal RNA,	100	106	沿岸海洋環境	関連性は確認できず	Romanenko et al. (2011)
	AB518881	<i>Litoreibacter albidus</i> gene for 16S ribosomal RNA	100	106	沿岸海洋環境	関連性は確認できず	Romanenko et al. (2011)
	DQ167247	<i>Octadecabacter orientus</i> strain KOPRI 13313 16S ribosomal RNA gene	100	106	海洋由来の成熟したバイオフィルム	関連性は確認できず	EMBL データベース
7	AY654818	<i>Mucus</i> bacterium 80 16S ribosomal RNA	100	106	地中海産の被覆状のサ	関連性は確認できず	EMBL データベース

Band No.	Access No.	Source	Identity (%)	Overlap (nt)	分離源	腐植物質との関連	引用文献
		gene			ンゴの1種		
	AB518881	<i>Litoreibacter janthinus</i> gene for 16S ribosomal RNA	99.1	106	沿岸海洋環境	関連性は確認できず	Romanenko et al. (2011)
	AB518881	<i>Litoreibacter albidus</i> gene for 16S ribosomal RNA,	99.1	106	沿岸海洋環境	関連性は確認できず	Romanenko et al. (2011)
8	AB302385	Alpha proteobacterium B27 gene for 16S rRNA,	97.2	106	海水	関連性は確認できず	Harwati et al. (2007)
	DQ640643	<i>Wenxinia marina</i> strain HY34 16S ribosomal RNA gene	96.2	106	油田堆積物	関連性は確認できず	Ying et al.(2007)
	EU346606	Marine sponge bacterium PLATEactino+(2)-11 16S ribosomal RNA gene	96.2	106	カイメン	関連性は確認できず	Sipkema et al. (2011)
9	EU817498	<i>Alishewanella jeotgali</i> strain MS1 16S ribosomal RNA gene,	93.1	131	韓国伝統的発酵食品	関連性は確認できず	Kim et al. (2009)
	FJ595485	<i>Alteromonas</i> sp. H17 16S ribosomal RNA gene	93.1	131		関連性は確認できず	EMBL データベース
	HQ439519	<i>Algicola bacteriolytica</i> strain MR32e 16S ribosomal RNA gene	93.1	131	ハワイカネオヘ湾の岩礁表面のバイオフィルム	関連性は確認できず	EMBL データベース
10	AY167327	<i>Bacteroidetes</i> bacterium ANT9285 16S ribosomal RNA gene	85.8	127	ウェッデル海の南極の叢氷	関連性は確認できず	Brinkmeyer et al. (2003)

Band No.	Access No.	Source	Identity (%)	Overlap (nt)	分離源	腐植物質との関連	引用文献
	FN997637	<i>Bacteroidetes</i> bacterium TRS1-A1 partial 16S rRNA gene, strain TRS1-A1	85.2	128	イギリス北東部の河口堆積物	関連性は確認できず	Zhang et al. (2012)
	AJ786088	<i>Cytophaga</i> sp. N05VI partial 16S rRNA gene, isolate N05VI	85	127	干潟表面堆積物	関連性は確認できず	Koepke et al. (2005)
11	CP000681	<i>Shewanella putrefaciens</i> CN-32	95.4	65		近縁種の <i>Shewanella alga</i>	EMBL データベース
	CP002767	<i>Shewanella baltica</i> BA175	95.4	65	バルト海由来微生物に関連	は腐植物質を還元する	Caro-Quintero et al. (2012)
	CP001616	<i>Tolomonas auensis</i> DSM 9187	95.4	65	スイス淡水湖堆積物	関連性は確認できず	EMBL データベース
12	AJ511275	<i>Desulfocapsa</i> sp. Cad626 partial 16S rRNA gene	95.5	132	スイス Cadagno 湖の化学的変水層		Peduzzi et al. (2003)
	HE600778	<i>Desulfobulbaceae</i> bacterium PR3_F05 partial 16S rRNA gene,	93.9	132	フランス アドゥール川河口堆積物	近縁種の <i>Desulfovibrio</i> 属菌は腐植物質を還元する	EMBL データベース
	AJ237602	<i>Desulfobacterium catecholicum</i> 16S rRNA gene, partial, strain DSM 3882	93.2	132	ニュージーランドデラウェア湾		EMBL データベース
13	AY918928	<i>Prolixibacter bellariivorans</i> strain F2 16S ribosomal RNA gene	85.4	123	海底に堆積した燃料電池	関連性は確認できず	Holmes et al. (2007)
	EU252507	<i>Sphingomonas</i> sp. AM19 16S ribosomal RNA gene	85.4	123	東シナ海由来の光合成細菌に関連	関連性は確認できず	EMBL データベース

Band No.	Access No.	Source	Identity (%)	Overlap (nt)	分離源	腐植物質との関連	引用文献
	AF121885	Bacterium Phenol-4 16S ribosomal RNA gene	85.4	123	フェノール分解コンソージウム	関連性は確認できず	Knight et al. (1999)
14	AJ229236	Bacteria from anoxic bulk soil 16S rRNA gene (strain PB90-2)	89.4	123	冠水した嫌氣的な水田土壌	関連性は確認できず	Chin et al. (1999)
	CP002455	<i>Weeksella virosa</i> DSM 16922	89.4	123	人の尿	関連性は確認できず	EMBL データベース
	U87101	<i>Ornithobacterium rhinotracheale</i> 16S ribosomal RNA gene	89.3	122	鳥類の気道	関連性は確認できず	Vandamme et al. (1994)
15	FR872932	<i>Clostridium</i> sp. AN-AS6C partial 16S rRNA gene, strain AN-AS6C	99	105	ギリシャ地中海に面した Atalante 流域 (嫌氣的な高塩流域) の堆積物	関連性は確認できず	EMBL データベース
	FR872934	<i>Clostridium</i> sp. AN-AS8 partial 16S rRNA gene, strain AN-AS8	98.1	105	ギリシャ地中海に面した Atalante 流域 (嫌氣的な高塩流域) の堆積物	関連性は確認できず	EMBL データベース
	AJ786046	Bacterium G100VIII partial 16S rRNA gene	98.1	105	干潟深部堆積物	関連性は確認できず	Koepke et al. (2005)
16	AB377124	<i>Coralibacter albidoflavus</i> gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: 04OKA-3-121	88.2	127	不動サンゴ	関連性は確認できず	EMBL データベース
	EF040559	Marine bacterium CS-47 16S ribosomal RNA gene	88.2	127	カイメン	関連性は確認できず	EMBL データベース

Band No.	Access No.	Source	Identity (%)	Overlap (nt)	分離源	腐植物質との関連	引用文献
	AY654756	<i>Mucus</i> bacterium 113 16S ribosomal RNA	87.4	127	サンゴ虫 (<i>Oculina patagonica</i>)の 粘液	関連性は確認 できず	EMBL デー タベース
17	AB237495	<i>Desulfobacterium anilini</i> gene for 16S rRNA	93.6	109	ペンタクロ ロフェノー ルを脱塩素 するマイク ロコズムの 堆積物	近縁種 の <i>Desulfovibrio</i> 属 菌は腐植物質 を還元する	EMBL デー タベース
	FR851323	<i>Fusibacter</i> sp. BELH1 partial 16S rRNA gene	93.6	109	嫌氣的リア クターの スラッジ	関連性は確認 できず	EMBL デー タベース
	AF491333	<i>Fusibacter</i> sp. SA1 16S ribosomal RNA gene	92.7	109	南アフリカ 金鉱山	関連性は確認 できず	EMBL デー タベース
18	AF013972	<i>Thiomicrospira</i> sp. JB-B2 16S ribosomal RNA gene	97	132	ドイツの干 潟	関連性は確認 できず	Brinkhoff and Muyzer (1997)
	AF069959	<i>Thiomicrospira crunogena</i> 16S ribosomal RNA gene	96.2	132	北大西洋中 央海嶺の 熱水噴出孔	関連性は確認 できず	Wirsen et al. (1998)
	AF064544	<i>Thiomicrospira</i> sp. L-12 16S ribosomal RNA gene	96.2	132	ガラパゴス リフトの熱 水噴出孔 (深 度 2550m)	関連性は確認 できず	Ahmad et al. (1999)
19	AB470958	<i>Clostridiales</i> bacterium r41 gene for 16S rRNA	97.2	107	沖縄のコモ ンサンゴ属	関連性は確認 できず	EMBL デー タベース
	EF117250	<i>Firmicutes</i> symbiont of <i>Osedax</i> sp. 16S ribosomal RNA gene	94.5	109	環形動物 (<i>Osedax</i> sp.) の共生菌	関連性は確認 できず	Goffredi et al. (2007)
	AJ786047	Bacterium N5IX partial 16S rRNA	91.7	108	ドイツ北海 の干潟堆積	関連性は確認 できず	Koepke et al. (2005)

Band No.	Access No.	Source	Identity (%)	Overlap (nt)	分離源	腐植物質との関連	引用文献
		gene, isolate N5IX			物		
20	DQ788794	<i>Colwellia</i> sp. SLW05 16S ribosomal RNA gene	94.5	128	南極海の海水の細菌に関連	関連性は確認できず	Raymond et al. (2007)
	FJ889567	<i>Colwellia</i> sp. K3B-6 16S ribosomal RNA gene	94.5	128	北極海海水から分離した細菌に関連	関連性は確認できず	EMBL データベース
	AF388391	<i>Vibrio</i> sp. 3d clone 3d2 16S ribosomal RNA gene	94.5	128	記載なし	関連性は確認できず	EMBL データベース
21	AY387858	<i>Pseudoalteromonas aliena</i> 16S ribosomal RNA gene	99.2	131	海水	関連性は確認できず	Ivanova et al. (2004)
	FN377707	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. M12-4 partial 16S rRNA gene	99.2	131	粘土のように粘着性のある堆積物	関連性は確認できず	Srinivas et al. (2009)
	AF200216	<i>Psychrophilic</i> marine bacterium PS39 16S ribosomal RNA gene	99.2	131	海水生息細菌に関連	関連性は確認できず	EMBL データベース
22	AB362265	<i>Rikenellaceae</i> bacterium JAM-BA0501 gene for 16S rRNA,	100	123	下北半島の堆積物コア	関連性は確認できず	Kobayashi et al. (2008)
	GU112991	<i>Rikenellaceae</i> bacterium 4-1-11 16S ribosomal RNA gene	97.6	123	泥火山土壌	関連性は確認できず	EMBL データベース
	GQ863485	<i>Bacteroidales</i> bacterium APP1 16S ribosomal RNA gene	94.3	123	アルカリ性湖生息細菌に関連	関連性は確認できず	EMBL データベース

Band No.	Access No.	Source	Identity (%)	Overlap (nt)	分離源	腐植物質との関連	引用文献
23	EU839359	<i>Roseobacter</i> sp. Bo10-20 16S ribosomal RNA gene	100	106	糸状性海洋 シアノバク テリアに関 連	関連性は確認 できず	Hube et al. (2009)
	HQ852039	<i>Roseovarius</i> sp. MA1-10 16S ribosomal RNA gene	100	106	ホヤ	関連性は確認 できず	EMBL デー タベース
	FJ869041	<i>Rhodobacterales</i> bacterium CB1005 16S ribosomal RNA gene	100	106	チェサピー ク湾深度 13mの海水	関連性は確認 できず	EMBL デー タベース
24	FN814307	<i>Massilia consociata</i> partial 16S rRNA gene, type strain CCUG 58010T	88.6	132	人臨床試料	関連性は確認 できず	Kaempfer et al. (2011)
	DQ006842	<i>Neisseria animaloris</i> strain LMG 23011 16S ribosomal RNA gene	88.6	132	人	関連性は確認 できず	Vandamme et al. (2006)
	AJ239283	<i>Neisseria lactamica</i> 16S rRNA gene (partial), strain L18	88.6	132	人	関連性は確認 できず	Smith et al. (1999)
25	FR851323	<i>Fusibacter</i> sp. BELH1 partial 16S rRNA gene, isolate BELH1	95.4	109	嫌気リアク ターの スラッジ	関連性は確認 できず	EMBL デー タベース
	AB237495	<i>Desulfobacterium</i> <i>anilini</i> gene for 16S rRNA	93.6	109	ペンタクロ ロフェノー ルを脱塩素 するマイク ロコズムの 堆積物	近縁種の <i>Desulfovibrio</i> 属 菌は腐植物質 を還元する	EMBL デー タベース
	AF491333	<i>Fusibacter</i> sp. SA1 16S ribosomal RNA gene	92.7	109	南アフリカ 金鉱山	関連性は確認 できず	EMBL デー タベース

Band No.	Access No.	Source	Identity (%)	Overlap (nt)	分離源	腐植物質との関連	引用文献
26	AF522323	<i>Anoxynatronum sibiricum</i> 16S ribosomal RNA gene	94.5	109	ニジネベローエ (トランスバイカル地方) のセルロース分解細菌群に関連	関連性は確認できず	Gamova et al. (2003)
	AJ271456	<i>Clostridium alcaliphilum</i> 16S rRNA gene, isolate B8NS1-A	94.4	108	ケニア Bogoria 湖	関連性は確認できず	Jones et al. (1998)
	Y15626	<i>Tindallia magadii</i> 16S rRNA gene	94.4	108	アルカリ性湖生息嫌気性アンモニア菌に関連	関連性は確認できず	Kevbrin et al. (1998)
27	GU447237	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> strain AS1 16S ribosomal RNA gene	100	131	臨床試料	<i>Pseudomonas</i> 属菌には腐植物質を酸化する種が存在する	EMBL データベース
	GQ284458	<i>Pseudomonas stutzeri</i> strain TSWCW11 16S ribosomal RNA gene	100	131	インドの水試料		EMBL データベース
	EF523547	<i>Pseudomonas otitidis</i> 16S ribosomal RNA gene	100	131	インドの淡水		EMBL データベース
28	X84660	<i>Nitrospira</i> sp. 16S rRNA gene, isolate D11	96.2	131	アンモニア酸化細菌	関連性は確認できず	Utaaker et al. (1995)
	AY635573	<i>Nitrospira</i> sp. REGAU 16S ribosomal RNA gene	96.2	131	活性汚泥のアンモニア酸化細菌に関連	関連性は確認できず	EMBL データベース
	AY123803	<i>Nitrosovibrio tenuis</i> 16S ribosomal RNA	95.4	131	アンモニア酸化細菌	関連性は確認できず	Purkhold et aq. (2003)

Band No.	Access No.	Source	Identity (%)	Overlap (nt)	分離源	腐植物質との関連	引用文献
		gene,					
29	AM406670	<i>Azoarcus</i> sp. BH72	91	67	記載なし	<i>Azoarcus</i> 属菌は腐植物質を酸化する種が存在する	EMBL データベース
30	GU479693	<i>Alcaligenaceae</i> bacterium JMT1957 16S ribosomal RNA gene	91.6	131	土壌微粒子	関連性は確認できず	EMBL データベース
	EF219370	<i>Georgfuchsia toluolica</i> strain G5G6 16S ribosomal RNA gene	90.1	131	嫌気性トルエン分解菌 Fe (III)を電子受容体として利用	トルエン分解菌および金属還元菌には腐植物質を還元する種が存在する	Weelink et al. (2009)
	AB308361	Bacterium TG149 gene for 16S ribosomal RNA	90.1	131	茨城県 淡水堆積物	関連性は確認できず	Tamaki et al. (2009)
31	AY673350	<i>Acidobacteria</i> bacterium Ellin7184 16S ribosomal RNA gene	95	120	土壌	関連性は確認できず	Davis et al. (2005)
	AY234538	Bacterium Ellin5121 16S ribosomal RNA gene	95	120	培養できない土壌細菌 に関連	関連性は確認できず	Joseph et al. (2003)
	HM748719	Bacterium Ellin7509 16S ribosomal RNA gene	92.5	120	土壌	関連性は確認できず	Davis et al. (2011)

表 4.1.2-11 アーキアの相同性解析結果

Band No.	Access No.	Source	Identity (%)	Overlap (nt)	分離源	腐植物質との関連	引用文献
A1	FR773158	Candidatus <i>Nitrososphaera</i> sp. EN123 partial 16S rRNA gene	95.5	88	土壌の集積 培養物	関連性は確認 できず	EMBL デー タベース
	EU281334	Candidatus <i>Nitrososphaera</i> <i>gargensis</i> clone RHGA41c 16S ribosomal RNA gene	94.3	88	ロシア Garga 温泉アンモ ニア酸化菌 集積培養物	関連性は確認 できず	EMBL デー タベース
	GU797786	Candidatus <i>Nitrososphaera</i> <i>gargensis</i> 16S ribosomal RNA gene	94.3	88	ロシア Garga 温泉	関連性は確認 できず	EMBL デー タベース
A2	U20152	<i>Methanlobus</i> <i>oregonensis</i> 16S small subunit rRNA	89.3	84	記載なし	関連性は確認 できず	Keswani et al. 1996
	HM053966	<i>Methanlobus</i> sp. AME1 16S ribosomal RNA gene,	89.3	84	ロシアのア ルカリ性湖 に生息する メタン生成 菌に関連	関連性は確認 できず	EMBL デー タベース
	AB370245	<i>Methanlobus</i> <i>profundi</i> gene for 16S ribosomal RNA	88.1	84	千葉県のカ ス田	関連性は確認 できず	Nakagawa et al. 2005
A3	AF199376	<i>Euryarchaeote</i> DJ3.25-13 16S ribosomal RNA gene	86.9	84	エジプト高 塩性湖の嫌 氣的深水層 (深度 3.25m)	関連性は確認 できず	EMBL デー タベース
	AF199379	<i>Euryarchaeote</i> J4.75-15 16S ribosomal RNA gene,	84.3	83	エジプト高 塩性湖の嫌 氣的深水層	関連性は確認 できず	Fan et al. 2004

Band No.	Access No.	Source	Identity (%)	Overlap (nt)	分離源	腐植物質との関連	引用文献
					(深 度 4.75m)		
	AF199374	<i>Euryarchaeote</i> D4.75-4 16S ribosomal RNA gene	83.1	83	エジプト高塩性湖の嫌氣的深水層 (深 度 4.75m)	関連性は確認できず	Takai et al. 2002
A4	JN227488	Candidatus <i>Nitrosotalea</i> devanaterre isolate Nd1 16S ribosomal RNA gene	100	88	酸性土壌に 関連のある 微生物	関連性は確認できず	Mori et al. 2006
	HQ675737	<i>Crenarchaeote</i> SCGC AAA001-G21 small subunit ribosomal RNA gene,	85.4	89	南大西洋の 亜熱帯海洋 渦 (深 度 800m)	関連性は確認できず	Uchiyama et al. 2010
	HQ675747	<i>Crenarchaeote</i> SCGC AAA003-G11 small subunit ribosomal RNA gene	84.3	89	南大西洋の 亜熱帯海洋 渦 (深 度 800m)	関連性は確認できず	Kessler et al. 1998
A5	AF199376	<i>Euryarchaeote</i> DJ3.25-13 16S ribosomal RNA gene	85.6	90	エジプト高塩性湖の嫌氣的深水層 (深 度 3.25m)	関連性は確認できず	Jung et al. 2011
	AF199379	<i>Euryarchaeote</i> J4.75-15 16S ribosomal RNA gene	84.3	89	エジプト高塩性湖の嫌氣的深水層 (深 度 4.75m)	関連性は確認できず	Margot et al. 2002
	AJ745136	Archaeon LL25A4 16S rRNA gene, clone LL25A4	83.1	89	オランダの 土壌	関連性は確認できず	Swan et al. 2011

引用文献

- Ahmad A., Barry J.P., Nelson D.C. Phylogenetic affinity of a wide, vacuolate, nitrate-accumulating *Beggiatoa* sp. from Monterey Canyon, California, with *Thioploca* spp. Appl. Environ. Microbiol. 65(1):270-277(1999).
- Brinkhoff T., Muyzer G. Increased species diversity and extended habitat range of sulfur-oxidizing *Thiomicrospira* spp. Appl. Environ. Microbiol. 63(10):3789-3796(1997)
- Brinkmeyer R., Knittel K., Jurgens J., Weyland H., Amann R., Helmke E. Diversity and structure of bacterial communities in Arctic versus Antarctic pack ice. Appl. Environ. Microbiol. 69(11):6610-6619(2003).
- Caro-Quintero A., Auchtung J., Deng J., Brettar I., Hofle M., Tiedje J.M., Konstantinidis K.T. Genome Sequencing of Five *Shewanella baltica* Strains Recovered from the Oxidic-Anoxic Interface of the Baltic Sea. J. Bacteriol. 194(5):1236-1236(2012).
- Chin K.J., Hahn D., Hengstmann H., Liesack W., Janssen P.H. Characterization and identification of numerically abundant culturable bacteria from the anoxic bulk soil of rice paddy microcosms. Appl. Environ. Microbiol. 65(11):5042-5049(1999).
- Cytryn E., Minz D., Oremland R.S., Cohen Y. Distribution and diversity of archaea corresponding to the limnological cycle of a hypersaline stratified lake (Solar lake, Sinai, Egypt). Appl. Environ. Microbiol. 66(8):3269-3276(2000).
- Davis K.E., Joseph S.J., Janssen P.H. Effects of growth medium, inoculum size, and incubation time on culturability and isolation of soil bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 71(2):826-834(2005).
- Davis K.E., Sangwan P., Janssen P.H. *Acidobacteria*, *Rubrobacteridae* and *Chloroflexi* are abundant among very slow-growing and mini-colony-forming soil bacteria. Environ. Microbiol. 13(3):798-805(2011).
- Garnova E.S., Zhilina T.N., Tourova T.P., Lysenko A.M. *Anoxyratronum sibiricum* gen.nov., sp.nov. alkaliphilic saccharolytic anaerobe from cellulolytic community of Nizhnee Beloe (Transbaikal region). Extremophiles 7(3):213-220(2003).
- Goffredi S.K., Johnson S.B., Vrijenhoek R.C. Genetic diversity and potential function of microbial symbionts associated with newly discovered species of *Osedax polychaete* worms. Appl. Environ. Microbiol. 73(7):2314-2323(2007).
- Harwati T.U., Kasai Y., Kodama Y., Susilaningih D., Watanabe K. Characterization of Diverse Hydrocarbon-Degrading Bacteria Isolated from Indonesian Seawater. Microbes Environ. 22:412-415(2007).
- Hatzenpichler R., Lebedeva E.V., Spieck E., Stoecker K., Richter A., Daims H., Wagner M. A moderately thermophilic ammonia-oxidizing crenarchaeote from a hot spring. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 105(6):2134-2139(2008).
- Holmes D.E., Nevin K.P., Woodard T.L., Peacock A.D., Lovley D.R. *Prolixibacter bellariivorans* gen. nov., sp. nov., a sugar-fermenting, psychrotolerant anaerobe of the phylum *Bacteroidetes*, isolated from a marine-sediment fuel cell. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 57(Pt 4):701-707(2007).
- Hube A.E., Heyduck-Soeller B., Fischer U. Phylogenetic classification of heterotrophic bacteria associated with filamentous marine cyanobacteria in culture. Syst. Appl. Microbiol. 32(4):256-265(2009).
- Ivanova E.P., Gorshkova N.M., Zhukova N.V., Lysenko A.M., Zelepuga E.A., Prokofeva N.G., Mikhailov V.V., Nicolau D.V., Christen R. Characterization of *Pseudoalteromonas* distincta-like sea-water isolates and description of *Pseudoalteromonas aliena* sp. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 54(Pt 5):1431-1437(2004).
- Jensen S., Frost P., Torsvik V.L. The nonrandom microheterogeneity of 16S rRNA genes in *Vibrio splendidus* may reflect adaptation to versatile lifestyles. FEMS Microbiol. Lett. 294(2):207-215(2009).
- Jones B.E., Grant W.D., Duckworth A.W., Owenson G.G. Microbial diversity of soda lakes. Extremophiles 2(3):191-200(1998).
- Joseph S.J., Hugenholtz P., Sangwan P., Osborne C.A., Janssen P.H. Laboratory cultivation of widespread and previously uncultured soil bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 69(12):7210-7215(2003).
- Kaempfer P., Lodders N., Martin K., Falsen E. Revision of the genus *Massilia* La Scola et al. 2000, with an emended description of the genus and inclusion of all species of the genus *Naxibacter* as new combinations, and proposal of *Massilia consociata* sp. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 61(Pt 7):1528-1533(2011).
- Kemnitz D., Kolb S., Conrad R. Phenotypic characterization of Rice Cluster III archaea without prior isolation by applying quantitative polymerase chain reaction to an enrichment culture. Environ. Microbiol. 7(4):553-565(2005).
- Kevbrin V.V., Zhilina T.N., Rainey F.A., Zavarzin G.A. *Tindallia magadii* gen. nov., sp. nov.: an alkaliphilic anaerobic ammonifier from soda lake deposits. Curr. Microbiol. 37(2):94-100(1998).
- Kim M.S., Roh S.W., Nam Y.D., Chang H.W., Kim K.H., Jung M.J., Choi J.H., Park E.J., Bae J.W. *Alishewanella jeotgali* sp. nov., isolated from traditional fermented food and emended description of the genus *Alishewanella*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 59(Pt 9):2313-2316(2009).
- Knight V.K., Kerkhof L.J., Haggblom M.M. Community analyses of sulfidogenic 2-bromophenol-dehalogenating and phenol-degrading microbial consortia. FEMS Microbiol. Ecol. 29(2):137-147(1999).
- Kobayashi T., Koide O., Mori K., Shimamura S., Matsuura T., Miura T., Takaki Y., Morono Y., Nunoura T., Imachi H., Inagaki F., Takai K., Horikoshi K. Phylogenetic and enzymatic diversity of deep seafloor aerobic microorganisms in organics- and methane-rich sediments off Shimokita Peninsula. Extremophiles 12(4):519-527(2008).
- Koepke B., Wilms R., Engelen B., Cypionka H., Sass H. Microbial diversity in coastal subsurface sediments: a cultivation approach using various electron acceptors and substrate gradients. Appl. Environ. Microbiol. 71(12):7819-7830(2005).
- Le Roux F., Gay M., Lambert C., Nicolas J.L., Gouy M., Berthe F. Phylogenetic study and identification of *Vibrio splendidus*-related strains based on *gyrB* gene sequences. Dis. Aquat. Org. 10(58):143-150(2004).
- Lehtovirta-Morley L.E., Stoecker K., Vilcinskas A., Prosser J.I., Nicol G.W. Cultivation of an obligate acidophilic ammonia oxidizer from a nitrifying acid soil. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 108(38):15892-15897(2011).
- Mochimaru H., Tamaki H., Hanada S., Imachi H., Nakamura K., Sakata S., Kamagata Y. *Methanolobus profundus* sp. nov., a methylotrophic methanogen isolated from deep subsurface sediments in a natural gas field. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 59(Pt 4):714-718(2009).
- Muyzer G., Teske A., Wirsén C.O., Jannasch H.W. Phylogenetic relationships of *Thiomicrospira* species and their identification in deep-sea hydrothermal vent samples by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNA fragments. Arch. Microbiol. 164(3):165-172(1995).
- Peduzzi S., Tonolla M., Hahn D. Isolation and characterization of aggregate-forming sulfate-reducing and purple sulfur bacteria from the chemocline of meromictic Lake Cadagno, Switzerland. FEMS Microbiol. Ecol. 45(1):29-37(2003).
- Purkhold U., Wagner M., Timmermann G., Pommerening-Roser A., Koops H.P. 16S rRNA and *amoA*-based phylogeny of 12 novel betaproteobacterial ammonia-oxidizing isolates: extension of the dataset and proposal of a new lineage within the nitrosomonads. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 53(Pt 5):1485-1494(2003).
- Raymond J.A., Fritsen C., Shen K. An ice-binding protein from an Antarctic sea ice bacterium. FEMS Microbiol. Ecol.

61(2):214-221(2007).

Romanenko L.A., Tanaka N., Frolova G.M., Svetashev V.I., Mikhailov V.V. *Litoreibacter albidus* gen. nov., sp. nov. and *Litoreibacter janthinus* sp. nov., members of the class Alphaproteobacteria isolated from the seashore. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 61(Pt 1):148-154(2011).

Sipkema D., Schippers K., Maalcke W.J., Yang Y., Salim S., Blanch H.W. Multiple approaches to enhance the cultivability of bacteria associated with the marine sponge *Haliclona* (gellius) sp. Appl. Environ. Microbiol. 77(6):2130-2140(2011).

Smith N.H., Holmes E.C., Donovan G.M., Carpenter G.A., Spratt B.G. Networks and groups within the genus *Neisseria*: analysis of argF, recA, rho, and 16S rRNA sequences from human *Neisseria* species. Mol. Biol. Evol. 16(6):773-783(1999).

Spang A., Hatzepichler R., Brochier-Armanet C., Rattei T., Tischler P., Spieck E., Streit W., Stahl D.A., Wagner M., Schleper C. Distinct gene set in two different lineages of ammonia-oxidizing archaea supports the phylum *Thaumarchaeota*. Trends Microbiol. 18(8):331-340(2010).

Srinivas T.N., Nageswara Rao S.S., Vishnu Vardhan Reddy P., Pratibha M.S., Sailaja B., Kavya B., Hara Kishore K., Begum Z., Singh S.M., Shivaji S. Bacterial diversity and bioprospecting for cold-active lipases, amylases and proteases, from culturable bacteria of kongsfjorden and Ny-alesund, Svalbard, Arctic. Curr. Microbiol. 59(5):537-547(2009).

Swan B.K., Martinez-Garcia M., Preston C.M., Sczyrba A., Woyke T., Lamy D., Reinthaler T., Poulton N.J., Masland E.D., Gomez M.L., Sieracki M.E., DeLong E.F., Herndl G.J., Stepanauskas R. Potential for chemolithoautotrophy among ubiquitous bacteria lineages in the dark ocean. Science 333(6047):1296-1300(2011).

Tamaki H., Hanada S., Sekiguchi Y., Tanaka Y., Kamagata Y. Effect of gelling agent on colony formation in solid cultivation of microbial community in lake sediment. Environ. Microbiol. 11(7):1827-1834(2009).

Tourna M., Stieglmeier M., Spang A., Koenneke M., Schintlmeister A., Urich T., Engel M., Schloter M., Wagner M., Richter A., Schleper C. *Nitrososphaera viennensis*, an ammonia oxidizing archaeon from soil. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 0:0-0(2011).

Tsiamis G., Tzagarakis G., Chamalaki A., Xypteras N., Andersen G., Vayenas D., Bourtzis K. Olive-mill wastewater bacterial communities display a cultivar specific profile. Curr. Microbiol. 64(2):197-203(2012).

Utaaker J.B., Bakken L., Jiang Q.Q., Nes I.F. Phylogenetic analysis of seven new isolates of the highly related ammonia-oxidizing bacteria based on 16S rRNA gene sequencing. Syst. Appl. Microbiol. 18:549-559(1995).

Vandamme P., Holmes B., Bercovier H., Coenye T. Classification of Centers for Disease Control Group Eugonic Fermenter (EF)-4a and EF-4b as *Neisseria animaloris* sp. nov. and *Neisseria zoodegmatis* sp. nov., respectively. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 56(Pt 8):1801-1805(2006).

Vandamme P., Segers P., Vancanneyt M., Van Hove K., Muters R., Hommez J., Dewhirst F., Paster B.J., Kersters K., Falsen E., Devriese L.A., Bisgaard M., Hinz K.-H., Mannheim W. *Ornithobacterium rhinotracheale* gen. nov., sp. nov., isolated from the avian respiratory tract. Int. J. Syst. Bacteriol. 44(1):24-37(1994).

Weelink S.A., van Doesburg W., Saia F.T., Rijpstra W.I., Roling W.F., Smidt H., Stams A.J. A strictly anaerobic betaproteobacterium *Georgfuchsia toluolica* gen. nov., sp. nov. degrades aromatic compounds with Fe(III), Mn(IV) or nitrate as an electron acceptor. FEMS Microbiol. Ecol. 70(3):575-585(2009).

Wirsen C.O., Brinkhoff T., Kuever J., Muyzer G., Molyneux S., Jannasch H.W. Comparison of a new *thiomicrospira* strain from the mid-atlantic ridge with known hydrothermal vent isolates. Appl. Environ. Microbiol. 64(10):4057-4059(1998).

Ying J.Y., Wang B.J., Dai X., Yang S.S., Liu S.J., Liu Z.P. *Wenxinia marina* gen. nov., sp. nov., a novel member of the *Roseobacter* clade isolated from oilfield sediments of the South China Sea. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 57(Pt 8):1711-1716(2007).

Zhang J., Zhang E., Scott K., Burgess J.G. Enhanced electricity production by use of reconstituted artificial consortia of estuarine bacteria grown as biofilms. Environ. Sci. Technol. 46(5):2984-2992(2012).

4. 1. 2. 4 まとめ

環境微生物の観点からの製鋼スラグおよび腐植物質との相互作用に関する検討を行い、以下のことが明らかになった。

1) 河川堆積物中の腐植酸鉄が多い地点において、そこに棲息する微生物群の鉄還元活性が高くなっており、腐植酸鉄の形成に棲息する微生物群が深く関与することが示唆された。

2) 鉄還元細菌の活性を高める炭素源としてグルコースおよび樹木腐植物質が有用であった。特に樹木腐植物質は廃材を利用しており、資材の有効利用という観点からも、本腐植物質を利用する意義は大きいものといえる。

3) 腐植物質を添加、微生物接種した系では、添加しない場合よりも約3倍溶出が促進された。その場合、溶液中の鉄の約80%以上が Fe^{2+} と高濃度で2価鉄を維持することが可能であった。これは、腐植物質が存在する場合、長期間鉄還元細菌に有用な炭素源が少しずつ供給されるため、高い鉄還元活性を維持できるものと推定された。

4) 模擬海水による溶出試験を行った結果、淡水と海水の系とを比較すると全溶出量は海水の方が多くなった。これは、海水によりスラグ中の金属が腐食し、溶出しやすくなったことも一つの要因あるが、海水中における微生物群に鉄還元活性の高い微生物が

存在する可能性が考えられた。

5) 製鋼スラグや腐植物質を環境中に供与した場合、微生物との相互作用により図 4.1.3-18 に示すようなメカニズムで鉄イオンが環境中に放出されることが明らかになった。微生物は有機物を消費することにより酢酸や乳酸などの有機酸を生成する。それがスラグ中に含まれる第一鉄を溶出させる（直接機構）。また、同様に溶出してきた第二鉄イオンは周辺に棲息する鉄還元細菌により還元され第一鉄を生成する（間接機構）。

6) 模擬水槽に設置した製鋼スラグと堆肥混合体における微生物分析（DGGE 解析）の結果、模擬水槽中に腐植物質であるバーク堆肥あるいは製鋼スラグとの混合体を設置した場合には、腐植物質を利用する微生物が存在しており、これらの微生物群がエレクトロシヤトリングによって製鋼スラグ中に存在する不溶性 Fe(III)の還元を仲介す可能性が示唆された。また、松川 1 についても同様の微生物群が存在する他、鉄還元細菌が存在しておりそれらの微生物群の働きにより二価鉄への還元速度が促進されるものと推測された。

以上の結果から自然環境における腐植酸鉄形成には棲息する微生物群が深く関与しているものと推測された。したがって、適切な製鋼スラグと腐植物質を環境中に供与することにより、鉄還元細菌などの環境微生物の活性が高まり、鉄溶出がさらに促進され、生態系修復に大きく寄与する可能性が示唆された。

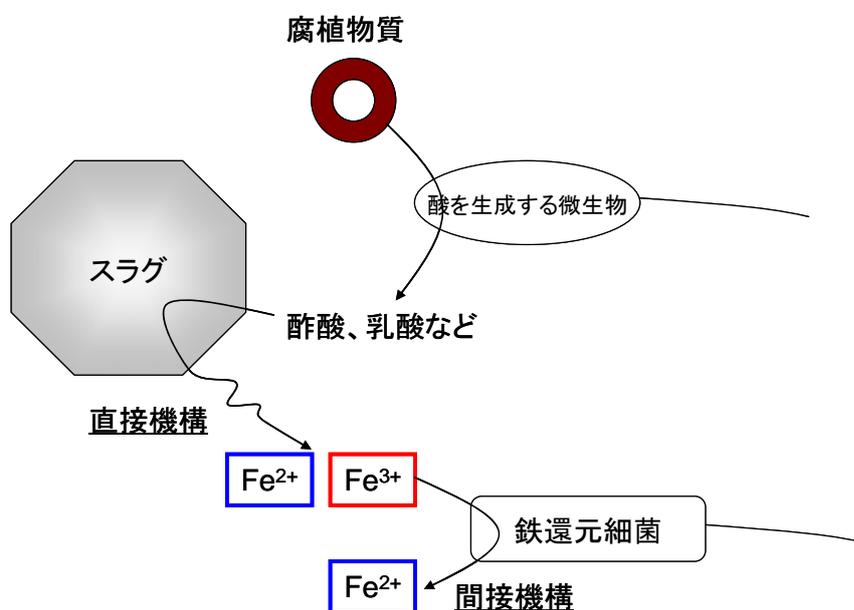


図 4.1.2-18 スラグと環境微生物との相互作用によるスラグからの鉄溶出のメカニズム

4. 1. 3 環境安全品質に関する技術指針の提案

4. 1. 3. 1 目的

製鋼スラグと腐植物質の相互作用においては、人や海洋生態系への影響の観点から、有害重金属をはじめとする他の成分に対する作用についても検討をしておくことが重要である。これまでの結果から、水溶媒、海水溶媒の場合ともに、腐植物質（堆肥）とスラグが相補的に有害物質の溶出を抑制する傾向が確認された。

海域で実際に使用される場合においては、適切な方法によって、有害重金属等による環境影響が十分に低いことを確認することが重要である。このように製鋼スラグなどの副産物や廃棄物（以下では、循環資材という場合がある。すなわち循環資材とは、循環資源のうち、建設資材として利用されるものをいう。）に対する環境安全品質の包括的な基本的考え方を示したものとして、日本工業標準調査会が制定した「コンクリート用スラグ骨材に環境安全品質及びその検査方法を導入するための指針」、「道路用スラグに環境安全品質及びその検査方法を導入するための指針」、および、これらの指針化を具体的に進めた検討会報告書「コンクリート用骨材又は道路用等のスラグ類に化学物質評価方法を導入する指針に関する検討会総合報告書」（以下では、スラグ指針報告書という。）（以上はすべて、文献¹⁾に掲載）が挙げられる。そこで本研究は、これらの資料を参考に、製鋼スラグと腐植物質の混合物の環境安全品質に関する技術指針を提案することを目的とした。

4. 1. 3. 2 結果の概要

製鋼スラグと腐植物質の混合物を海域の藻場再生のために使用するための環境安全品質に関する技術指針について、藻場再生のために使用される海域環境を想定し検討を行い、環境安全品質基準値と試験方法を次のように提案した。

(1) 環境安全品質基準値

溶出量試験に対する基準値は、スラグ指針報告書¹⁾に示される港湾用途溶出量基準とする。含有量試験に対する基準値は、土壤汚染対策法指定基準とする。なお、本提案における含有量基準は直接摂取を想定したものではなく、有害物質を高濃度で含む資材が海域に直接投入されることを防止するために設定するものであり、土壤汚染対策法の目的と合致していないことから、今後の科学的知見に基づき適切に修正することが必要である。

(2) 試験方法

試料調製では、製鋼スラグと腐植物質は実際に使用するものを粒度調整などを行わずにそのまま用いることを基本とする。ただし、腐植物質との相互作用により製鋼スラグから重金属の溶出量が減少するというこれまでの結果に基づき、製鋼スラグのみによって試験を実施しても良いこととする。

溶出量試験は、JIS K0058-1「スラグ類の化学物質試験方法―第1部：溶出量試験方法」の第5項（利用有姿による攪拌試験）による。ただし、本研究における利用環境は海域に限られることから、溶媒は海水又はそれに準ずるもの（人工海水など）を用いる。なお、溶媒は、溶出液と同じ項目について測定を実施する。含有量試験は、JIS K0058-2「スラグ

類の化学物質試験方法—第2部：含有量試験方法」による。

(3) 検査の責任者

環境安全品質の検査の責任者は、製鋼スラグの出荷者とする。

今後の課題として、試験データを蓄積すること、および、施工後の実海域でのモニタリング法を確立することが挙げられる。

4. 1. 3. 3 検討の進め方

スラグ指針報告書は、コンクリート用骨材又は道路用等の非鉄スラグ、鉄鋼スラグ、熔融スラグの日本工業規格（JIS）へ環境安全品質を導入するための指針を示すことを主たる目的としているが（第3章）、第2章で「循環資材の環境安全品質及び検査方法に関する基本的考え方」（以下、基本的考え方という）が示され、さらに第4章では「建設分野のあらゆる循環資材に共通の環境安全品質及びその検査方法の導入に向けて」としてコンクリート用または道路用以外への用途に対する考え方が提案されている。

そこで本研究では、製鋼スラグと腐植物質の混合物を海域の藻場再生のために使用するための製鋼スラグの環境安全品質について、スラグ指針報告書第2章に示された基本的考え方に基づき、同第4章に示された他の用途への適用の考え方を基本として検討を進めることとした。

以下に、スラグ指針報告書が提示する「循環資材の環境安全品質及び検査方法に関する基本的考え方」（表-4.1.3.1）ならびにその設定のための手順の概要（図-4.1.3.1）を示す。

表-4.1.3.1 循環資材の環境安全品質及び検査方法に関する基本的考え方³⁾

項目		内容
(1)	最も配慮すべき曝露環境に基づく評価	環境安全品質の評価は、対象とする循環資材の合理的に想定しうるライフサイクルの中で、環境安全性において最も配慮すべき曝露環境に基づいて行う。
(2)	放出経路に対応した試験項目	溶出量や含有量などの試験項目は、(1)の曝露環境における化学物質の放出経路に対応させる。
(3)	利用形態を模擬した試験方法	個々の試験は、試料調製を含め、(1)の曝露環境における利用形態を模擬した方法で行う。
(4)	環境基準等を遵守できる環境安全品質基準	環境安全品質の基準設定項目と基準値は、周辺環境の環境基準や対策基準等を満足できるように設定する。
(5)	環境安全品質を保証するための合理的な検査体系	試料採取から結果判定までの一連の検査は、環境安全品質基準への適合を確認するための「環境安全形式検査」と、環境安全品質を製造ロット単位で速やかに保証するための「環境安全受渡検査」とで構成し、それぞれ信頼できる主体が実施する。

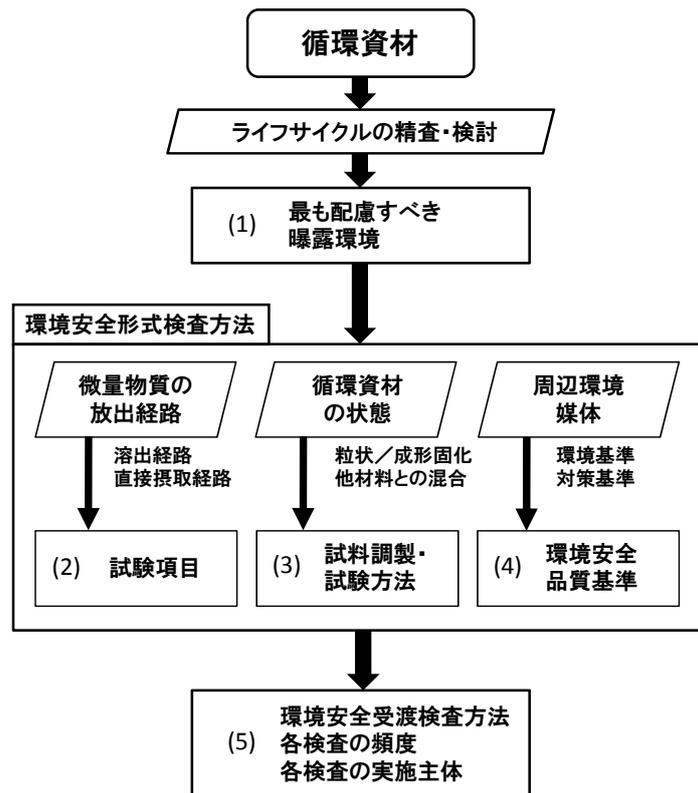


図-4.1.3.1 循環資材に環境安全品質と検査方法を設定するための手順の概要³⁾

スラグ指針報告書によれば、循環資材に環境安全品質と検査方法を設定するための手順の概要（図-3.1.1）は次のとおりである。はじめに循環資材の出荷から施工、供用、廃棄又は再利用に至までのライフサイクルを調べ、その中で（1）「最も配慮すべき曝露環境」を設定する。次に、「最も配慮すべき曝露環境」とそのときの循環資材の状態に基づき、環境安全形式検査の内容、すなわち（2）試験項目、（3）試験方法、ならびに（4）環境安全品質基準を設定する。さらに、（5）環境安全受渡検査方法、ならびに各検査の頻度や実施主体等を設定する。以下に、非鉄スラグの各工種・用途へ環境安全品質を設定する際の考え方を記す。なお、環境安全形式検査と環境安全受渡検査とは、それぞれ、環境安全品質基準を満足するかどうかを判定するために行う検査、および、環境安全品質を迅速に出荷するために行う簡略化した検査である。

4. 1. 3. 4 検討結果

（1）最も配慮すべき曝露環境

循環資材のライフサイクルを検討し、そのライフサイクルの中で最も配慮すべき曝露環境を設定することにより、試験方法や環境安全品質基準を最も安全側で設定できる、というのが、基本的考え方における「最も配慮すべき曝露環境に基づく評価」の主旨である。ここで、ライフサイクルの範囲は、循環資材の出荷、施工、供用、廃棄または再利用のすべてとされている。

製鋼スラグと腐植物質の混合物の場合、海域で利用後に廃棄または再利用は基本的に想定されないこと、また、利用中は混合物が海水に露出していることから、藻場再生のために施工される海域環境を最も配慮すべき曝露環境に設定することが適切と考えられる。

(2) 試験項目

海域で製鋼スラグと腐植物質の混合物が利用される間、その中に含まれる有害物質が海水中に溶出する経路に対して環境安全品質を確保するために、溶出量試験を実施することが必要である。その他の経路としては、人が直接摂取する経路は想定されないことから、含有量試験は不要と思われる。しかしながら、スラグ指針報告書 4.2.3 に述べられているように、有害物質含有量の極めて高い資材が海域へ直接投入され、むやみに使用されることは避けるべきである。そのような資材は、本来、廃棄物埋立地へ搬入するなどして、より万全な管理を行わなければならない。さらに、利用の間は海水に露出していることから、海域の生物への蓄積や濃縮の影響を考慮すべきであるが、本研究では生体影響について知見が得られていないことから、含有量を指標として管理を行うことは極めて重要と考えられる。

以上より、試験項目は溶出量試験ならびに含有量試験とした。

(3) 試験方法

基本的考え方では、溶出量試験と含有量試験に用いる試料は利用形態を模擬して、実際の配合割合で他の材料と混合するなどした状態（利用模擬試料と呼ばれる）を基本とすることとしている。本研究の場合は、製鋼スラグは数 cm 程度の大きさのものが用いられ、また、腐植物質として堆肥などが製鋼スラグと混合されて使用される。そこで溶出量試験では、製鋼スラグは粉碎や粒度調整を行わずに、実際に使用されるものと同じ状態のものをを用いることとする。また、腐植物質との配合割合が決定済みの場合は、その割合に基づき両者を配合したものについて試験を行うこととする。ただし、本研究のこれまでの成果から、製鋼スラグと腐植物質中の有害物質は、海水を用いた溶出試験により、溶出量が減少する傾向にあることが確認されている。このことから、製鋼スラグを単独で試験に用いることも選択可能とするのが良いと思われる。また、含有量試験のための試料調製では、製鋼スラグを単独で 2 mm 以下に粉碎して用いる場合と、さらに腐植物質を混合して用いる場合の結果の違いについて、データを蓄積する必要がある。

溶出量試験方法としては、プロペラ攪拌による JIS K0058-1 の 5. “利用有姿攪拌試験”を基本とすることが良いと思われる。ただし、溶媒が純水の場合と海水の場合とで溶出挙動が明らかに異なるので、実際の海域環境に近い条件で試験を行うために、溶媒は海水を用いることがより適切との判断から、天然海水またはそれに準ずるものを用いることとした。また含有量試験方法は、JIS K0058-2 が利用可能である。ただし、JIS K0058-2 は直接摂取による影響を判定するための方法であることから、有害物質高含有物を海域で使用しない、ならびに、海域の生物に対する影響の未然防止の観点からより適切な試験方法の開発、提案が望まれる。

(4) 環境安全品質基準

環境安全品質基準は、最も配慮すべき曝露環境において環境基準や対策基準が遵守されるように設定することが必要である。

まず、溶出量基準を検討するにあたって、表-4.1.3.2 に、環境基準や土壌汚染対策法の水質または溶出試験の検液に対する基準値等の概要を示す。本研究の対象は海域利用であるので、水質汚濁に係る環境基準（海域）、水底土砂に係る判定基準、および、スラグ指針検討会の港湾用途溶出量基準に関連があると思われる。これらのうち、水底土砂基準は航路の浚渫土を再び海洋に戻すことの適否を判定するための基準であり、また、合格して海洋に戻す場合、水底土砂は海面より投入され分散する。そのため、製鋼スラグと腐植物質の混合物を所定の位置に設置する際の基準としては適当ではないと判断した。港湾用途溶出量基準は水質汚濁に係る環境基準を元としているが、海域利用の場合、混合物から溶出した有害物質は、海水によって希釈され濃度が低下すると考えられることから、何らかの希釈係数を適用することは可能と思われる。ただし、スラグ指針報告書 3-4-3 に記述されているように、海域の生物への蓄積や濃縮に関する知見は十分には得られていないことから、希釈係数の値を大きく見込むべきではない。そこで本研究では、スラグ指針報告書の港湾用途溶出量基準と同じ値とし、具体的には、水質汚濁に係る環境基準（海域）の 3 倍とした（ただし、ふっ素とほう素は海水中の濃度が高く、環境基準（海域）が設定されていないことを勘案し設定している）。

次に含有量基準については、既存の基準値は、土壌汚染対策法指定基準、JIS A5031「一般廃棄物，下水汚泥又はそれらの焼却灰を熔融固化したコンクリート用熔融スラグ骨材」の含有量基準、JIS A5032「一般廃棄物，下水汚泥又はそれらの焼却灰を熔融固化した道路用熔融スラグ」、スラグ指針報告書のすべてが同一の値となっている。これらは直接摂取に対する環境安全性を判定するためのものであるが、本研究は直接摂取ではなく、有害物質を高濃度で含む資材が海域に直接投入されることを防止するために設定するものであり、土壌汚染対策法の目的と合致していない。しかしながら、海水に直接接する環境で利用されることから、生態影響に対する研究成果が十分に得られるまでは、これらと同等の基準とし、今後の科学的知見に基づき修正することが適当ではないかと思われる。

表-4.1.3.2 水質、または溶出試験の検液に対する基準値等の概要

(各基準には注記が多く付されているため、詳細は各法律等の原文を確認すること)

	水試料			溶出試験による検液					
	水質汚濁に係る環境基準 (mg/L)	地下水の水質汚濁に係る環境基準 (mg/L)	排水基準 (mg/L)	土壌の汚染に係る環境基準 (mg/L)	土壌汚染対策法指定基準 (mg/L)	金属等を含む産業廃棄物に係る判定基準 (mg/L)	水底土砂に係る判定基準 (mg/L)	一般用途溶出量基準 (mg/L)	港湾用途溶出量基準 (mg/L)
	河川水、湖沼水、海水	地下水	排水	土壌の検液	土壌の検液	燃え殻、ばいじんなどの検液	水底土砂の検液	スラグ等の検液	
環境基本法	環境基本法	水質汚濁防止法	環境基本法	土壌汚染対策法	廃棄物の処理及び清掃に関する法律	海洋汚染等及び海上災害の防止に関する法律	スラグ指針検討会総合報告書		
カドミウム	0.003	0.003	0.1	0.01 (米 0.4 mg/kg)	0.01	0.3	0.1	0.01	0.03
六価クロム	0.05	0.05	0.5	0.05	0.05	1.5	0.5	0.05	0.15
シアン	不検出	不検出	1	不検出	不検出	1	1	※1	※1
総水銀	0.0005	0.0005	0.005	0.0005	0.0005	0.005	0.005	0.0005	0.0015
アルキル水銀	不検出	不検出	不検出	不検出	不検出	不検出	不検出	-	-
セレン	0.01	0.01	0.1	0.01	0.01	0.3	0.1	0.01	0.03
鉛	0.01	0.01	0.1	0.01	0.01	0.3	0.1	0.01	0.03
砒素	0.01	0.01	0.1	0.01 (田 15 mg/kg)	0.01	0.3	0.1	0.01	0.03
ふっ素	海域以外 0.8	0.8	海域以外 8 海域 15	0.5	0.8	-	15	0.8	15
ほう素	海域以外 1	1	海域以外 10 海域 230	1	1	-	-	1	20
銅	-	-	-	田 125mg/kg	-	-	3	※1	※1
亜鉛	-	-	-	-	-	-	2		
ベリリウム	-	-	-	-	-	-	2.5		
クロム	-	-	-	-	-	-	2		
ニッケル	-	-	-	-	-	-	1.2		
バナジウム	-	-	-	-	-	-	1.5		
有機塩素化合物	-	-	-	-	-	-	塩素で 40		
四塩化炭素	0.002	0.002	0.02	0.002	0.002	0.02	0.02		
1,2-ジクロロエタン	0.004	0.004	0.04	0.004	0.004	0.04	0.04		
1,1-ジクロロエチレン	0.1	0.1	1	0.02	0.02	0.2	0.2		
シス-1,2-ジクロロエチレン	0.04	-	0.4	0.04	0.04	0.4	0.4		
1,2-ジクロロエチレン	-	0.04	-	-	-	-	-		
1,3-ジクロロプロペン	0.002	0.002	0.02	0.002	0.002	0.02	0.02		
ジクロロメタン	0.02	0.02	0.2	0.02	0.02	0.2	0.2		
テトラクロロエチレン	0.01	0.01	0.1	0.01	0.01	0.1	0.1		
1,1,1-トリクロロエタン	1	1	3	1	1	3	3		
1,1,2-トリクロロエタン	0.006	0.006	0.06	0.006	0.006	0.06	0.06		
トリクロロエチレン	0.03	0.03	0.3	0.03	0.03	0.3	0.3		
ベンゼン	0.01	0.01	0.1	0.01	0.01	0.1	0.1		
シマジン	0.003	0.003	0.03	0.003	0.003	0.03	0.03		
チオベンカルブ	0.02	0.02	0.2	0.02	0.02	0.2	0.2		
チウラム	0.006	0.006	0.06	0.006	0.006	0.06	0.06		
PCB	不検出	不検出	0.003	不検出	不検出	0.003	0.003		
1,4-ジオキサン	0.05	0.05	-	-	-	-	-		
硝酸性及び亜硝酸性窒素	10	10	-	-	-	-	-		
アンモニア、アンモニウム化合物、亜硝酸化合物及び硝酸化合物	-	-	100	-	-	-	-		
有機りん化合物	-	-	1	不検出	不検出	1	1		

※1 スラグ類については、VOCや農薬・PCB等はスラグの製造工程で熱分解し、重金属等のうちのシアンは分解・揮発してガス側に移行するため基準設定項目から省略されている。JIS A5031、JIS A5032も同様となっている。

以上より、製鋼スラグと腐植物質の混合物に対する環境安全品質基準の案を表-4.1.3.3に示す。ここでカドミウムの基準値はスラグ指針の制定後に水質環境基準が 0.01 mg/L から 0.003 mg/L へ強化されたため、その 3 倍の値として 0.009 mg/L とした。

なお、環境安全品質基準の設定項目は、スラグ指針報告書では使用原料や製造工程等、ならびに十分な試験データの蓄積に基づき基準値を超過する可能性がないと判断できる項目については省略することとしており、製鋼スラグを含むスラグ類については、VOC や農薬・PCB 等はスラグの製造工程で熱分解し、重金属等のうちのシアンは分解・揮発してガス側に移行するため、基準設定項目とせず、重金属等のうちのカドミウム、鉛、六価クロム、ひ素、水銀、セレン、ふっ素及びほう素の 8 項目を規定していることから、本研究ではこれら 8 項目を規定した。ただし製鋼スラグと混合される腐植物質についてはこのような熟履歴を受けないことから、自然由来の物質であるとはいえ、VOC や農薬等の有害物質の検出の可能性について、今後確認を行うとともに、基準設定項目から省略したことの妥当性を検討することが望まれる。

表-4.1.3.3 製鋼スラグと腐植物質の混合物の環境安全品質基準（案）

項目	溶出量基準 (mg/L)	含有量基準 (mg/L)
カドミウム	0.009 以下	150 以下
鉛	0.03 以下	150 以下
六価クロム	0.15 以下	250 以下
ひ素	0.03 以下	150 以下
水銀	0.0015 以下	15 以下
セレン	0.03 以下	150 以下
フッ素	15 以下	4000 以下
ほう素	20 以下	4000 以下

(5) その他の項目について

スラグ指針報告書に基づけば、上記(2)～(4)の一連の試験を「環境安全形式検査」とし、これをある製造ロットに対して行い、これと同じ製造条件のスラグについてはより迅速に実施可能な「環境安全受渡検査」を適切な頻度で適用することとされている。本研究の場合、実際の施工規模が不明であるため、小規模な工事の場合はその都度、環境安全形式検査を実施することとし、大規模な工事では導入が必要と思われる環境安全受渡検査方法とその頻度は今後の課題とすることとした。検査の実施主体については、スラグ指針報告書に述べられているように、製鋼スラグの製造業者の責任とするのが適当と思われる。

4. 1. 3. 5 まとめ

本章では海域への施工に際して、製鋼スラグと腐植物質の混合物が備えるべき環境安全品質について提案を行った。その内容と残された課題を表-4.1.3.4に示す。さらに、供用中の環境影響に対するモニタリング法を提示することが今後の課題として挙げられる。

表-4.1.3.4 製鋼スラグと腐植物質の混合物が備えるべき環境安全品質(案)の概要と課題

項目	内容	課題
(1) 最も配慮すべき曝露環境	藻場再生のために混合物が施工される海域環境	特になし
(2) 試験項目	溶出量試験および含有量試験。ただし、含有量試験は有害物質を高濃度で含有する資材の投入を抑制することを目的に援用	直接摂取の無い環境における有害物質高含有資材の利用に対する考え方の確立
(3) 試験方法	試料調製：製鋼スラグ単体、または、製鋼スラグと腐植物質の混合物 溶出量試験：JIS K0058-1 の 5. ただし溶媒は海水またはそれに準ずるもの 含有量試験：JIS K0058-2	海域に対する含有量試験方法の提案
(4) 環境安全品質基準	港湾用途溶出量基準、含有量基準	腐植物質に対する VOC、農薬等の省略の妥当性、海域に対する含有量基準の設定
(5) その他	試験の実施主体：製鋼スラグの製造業者	環境安全受渡検査と試験頻度の設定

引用文献

- 1) 日本工業標準調査会、スラグ類に化学物質評価方法を導入する指針について－総合報告書を策定－、http://www.jisc.go.jp/newsttopics/2012/201203slag_hokokusho.htm

4. 2 腐植物質の構造解析に基づく共存金属の環境挙動

海水は pH が約 8.1 の弱塩基性であり、NaCl や MgSO₄ のような無機化合物が含まれておりイオン強度は約 0.7 となる。さらに、コンブの生息域の磯焼けの沿岸域では溶存酸素が存在する。コンブなどの海藻類が微量必須元素である鉄(II)イオンを摂取し生育するには、鉄(II)が溶存態すなわちイオン形として存在しなくてはならない。しかし、このような海水の条件では、鉄(II)はすぐに鉄(III)へと酸化され生物利用性の低い水酸化物コロイドになる(図 4.2-1)。海水のような条件下で鉄(II)が安定に溶存するには、鉄(II)が有機物と錯形成することが必要である。有機物として錯体を形成すれば、酸化還元電位が下がるため鉄(II)が鉄(III)へと酸化されにくくなり安定に溶存する。

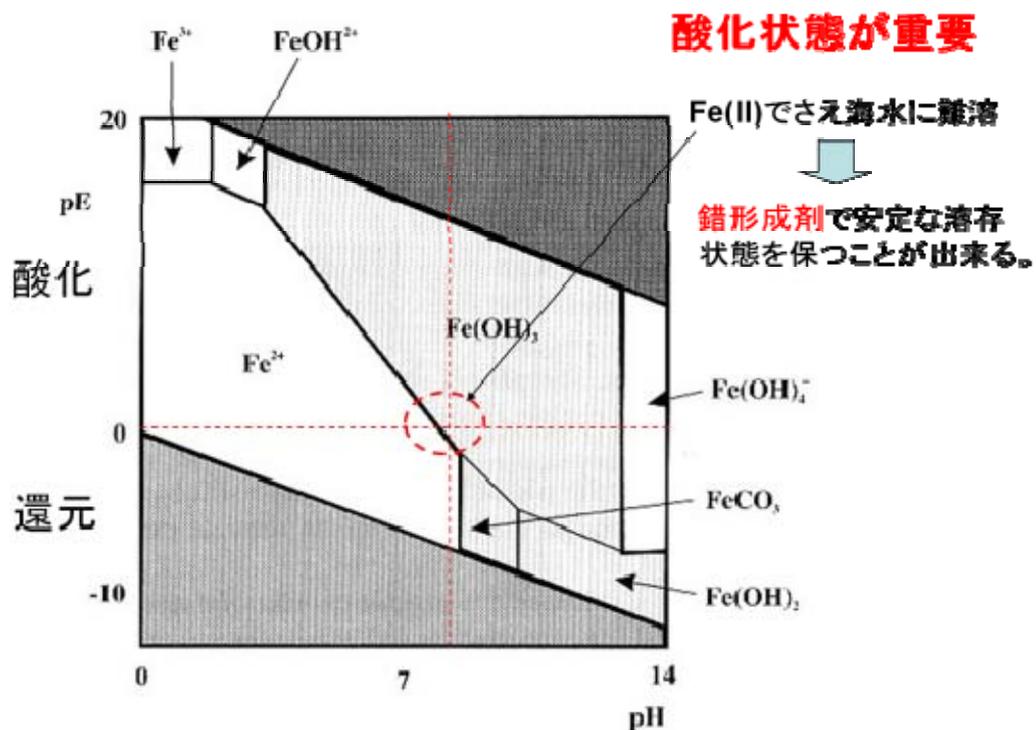


Fig. 5.4 A pE-pH diagram for iron incorporating carbonate species.

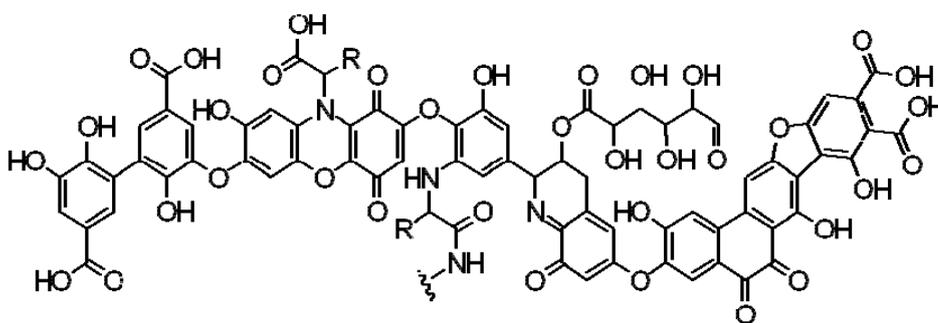
図 4.2-1 様々な pH と酸化還元電位(pH)における鉄イオンの存在状態

参考 : Fe(II), Fe(III)の溶解度積から見積もった溶存濃度限界

Fe(II): $2.8 \times 10^{-3} \text{ g L}^{-1}$ 比較的溶ける。

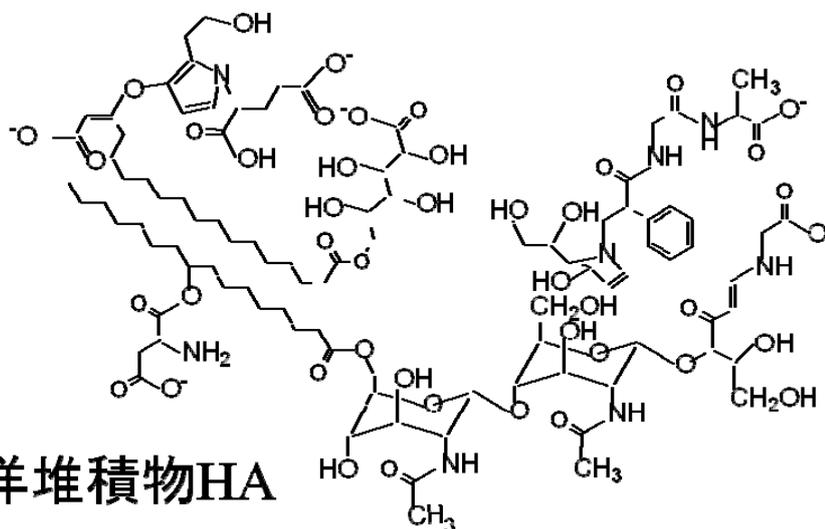
Fe(III): $1.7 \times 10^{-18} \text{ g L}^{-1}$ 溶存は極めて困難

ゆえに、このような海水条件下で製鋼スラグ／堆肥施肥ユニットから鉄(II)を溶出し、溶存態鉄(II)イオンとして磯焼け海域に供給するには、鉄(II)が堆肥からの溶存有機成分(DOM)と錯体を形成する必要がある。堆肥中の溶存有機成分として、フミン酸(HA)およびフルボ酸(FA)のような腐植物質が考えられる。HA や FA は、図 4.2-2 に示されているように、フェノール性水酸基やカルボキシル基のような酸性官能基を豊富に含む高分子弱酸であり、鉄(II)をはじめとして銅、カルシウム、マグネシウムなど二価の金属イオンと安定な錯体を形成することが知られている。



森林土壌FA

G.R.Aiken et al. Eds.: *Humic substances in soil, sediment and water-geochemistry, isolation and characterization*, Wiley, New York: 1985, p. 4.



海洋堆積物HA

R.B.Gagosian et al., *Marine Chemistry*, Vol 5, p.605 (1977).

図 4.2-2 腐植物質の平均構造モデル

腐植物質は高分子弱酸であるから、弱アルカリ条件下においては酸性官能基の解離が促進されるので溶存し易くなると考えられる。しかし、高分子弱酸の場合、電荷をもつ親水的な部分と電荷を持たない疎水的な部分双方が存在し、イオン強度が大きくなると巨大な負の電荷が対陽イオンにより中和され、凝集・沈殿する塩析のような現象が起こる。堆肥から抽出した HA と FA を人工海水に入れその様子を観察すると、これらは凝集沈殿した(図 4.2-3)。このような結果は、様々な研究者によって報告されてきた。したがって、海水環境下で施肥ユニットの堆肥中の HA や FA は鉄(II)のキャリアーとして作用しないと考えられる。

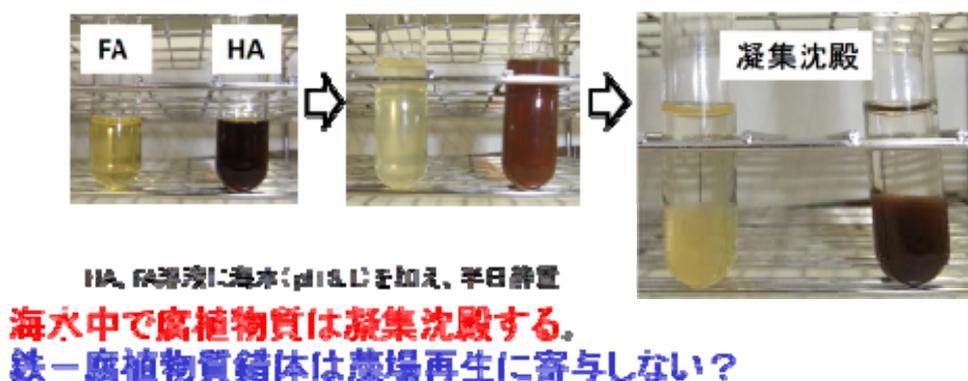


図 4.2-3 人工海水による施肥ユニット堆肥由来の HA と FA の凝集・沈殿

そこで本研究では、海水で抽出される堆肥中の有機成分、すなわち海水抽出溶存有機物(SWEOM)、に着目した。まず、SWEOM の構造解析および鉄(II)に対する錯形成能を評価するに当たり、堆肥の海水抽出液から SWEOM を分離・精製する方法に関する検討を行った。そして、元素分析、酸性官能基分析そして NMR など各種分光学的手法によりその構造解析をおこない、鉄(II)に対する錯形成能の評価を行った。さらに、SWEOM と鉄(II)との錯体種が、コンブの生育に対して有用か否かを確かめるため、コンブの配偶体の生育試験を行った。

一方、本技術では鉄-有機物の溶出ユニットを長期にわたり海中や汀線に埋設する。埋設期間中、スラグ中の無機成分との化学反応や土着あるいは海水由来の微生物によりユニット中の有機物の化学構造は大きく変化し、鉄に対する錯形成能にも大きく影響すると考えられる。そこで、埋設期間におけるユニット中の有機成分の変遷を追跡するこ

とを目的として、増毛の実証海域沿岸に設置した水槽へユニットを最大6ヶ月間埋設し、2ヶ月ごとに試料を採取し有機物の中で最も多量に存在するHAを抽出した。そして、堆肥の一有機分画であるHAの構造解析について、元素分析、分子量分析、FTIRスペクトル、熱分解ガスクロマトグラフィー／質量分析(py-GC/MS)による検討を行った。

4. 2. 1 溶存有機物(SWEOM)の構造と鉄(II)に対する錯形成能

(1) はじめに

堆肥から海水中に溶出する有機物分画(SWEOM)は、HA及びFAとは異なるものであり、ユニット埋設による磯焼け海域の溶存鉄濃度の増加と植生復元のメカニズムの解明にはSWEOMに着目した研究が必要であると考えられる。そこで、磯焼け海域の植生復元技術における溶存鉄の供給と植生復元のメカニズムの解明のため、Fe(II)化学種とSWEOMに着目した研究を行った。堆肥等から海水で有機物を抽出した例はないため、SWEOMを抽出し、その構造的特色を明らかにした。同時に、SWEOMのFe(II)との錯形成能についても検討した。比較対象として、HA及びFAを用い、SWEOMの機能について考察した。

(2)方法

(2)-1 SWEOMの抽出・精製方法

200 mLのポリ三角フラスコに堆肥試料を10 g入れ、次にpHを8.1程度に合わせた人工海水を全体で100 gになるまで加え、窒素ガス雰囲気、常温(20 ~ 23 °C)、暗所で3日間振盪した。振盪終了後、懸濁液は10000 rpmで15 min遠心分離を行い、固形物と溶液を分離した。遠心分離後の上澄み液は、5Aの濾紙を用いて吸引濾過を行い、浮遊物を取り除いた。さらにこの濾液を、500 Daの濾過膜で限外濾過を行うことで、500 Da以上の分画を膜上に濃縮し、脱塩を行った。濃縮後はさらに超純水を加え、濾液が無色透明になるまで限外濾過を行った。濾過膜上に濃縮した分画は、さらに500 Daの透析膜を用い、超純水を用いて透析を行うことでさらに精製した。透析は、1 ~ 2日毎に超純水を交換しながら2週間程度行った。水交換日とその翌日の電気伝導度の変化がなくなった時点、若しくは水交換日翌日の電気伝導度が1 µS未満になった時点をもって終了し、膜内残留物を凍結乾燥することで粉末状のSWEOMを得た。なお、堆肥に対するSWEOMの収率は、乾燥重量比で0.12%であった。

(2)-2 HA と FA の抽出精製

HA 及び FA の抽出精製は、国際腐植物質学会 (IHSS) が推奨する手法に従った。200 mL のポリ三角フラスコに堆肥 10 g をとり、0.05 M NaOH 水溶液を加え 100 g に定容した。これを振盪機にセットし、窒素ガス雰囲気、常温 (20 ~ 23 °C)、暗所で 24 時間振盪した。振盪終了後、懸濁液は 10000 rpm で 15 min 遠心分離を行い、固形物と溶液を分離した。遠心分離後の上澄み液は、5A の濾紙を用いて吸引濾過を行い、浮遊物を取り除いた。この濾液は、HA、FA 及び非腐植物質の混合液である。濾液に濃塩酸を加え、pH 1 以下の酸性状態にし、常温暗所で 24 時間攪拌した。攪拌後の懸濁液は、再び 10000 rpm で 15 min 遠心分離を行い、沈殿物と上澄み液に分離した。ここで得られた沈殿物には HA、濾液には FA と非腐植物質が含まれている。

沈殿物は少量の超純水を加えながらポリビーカーに移した。そこに微量の 1 M NaOH 水溶液を加え再溶解し、そこに濃塩酸とフッ化水素酸を各々 2 ~ 3 % となるよう加え、一晚常温暗所にて攪拌した。この操作は、塩酸にてアルミ等の無機成分を溶解し、フッ化水素酸にてシリカ成分を溶解させるものである。攪拌終了後の懸濁液は 10000 rpm で 15 min 遠心分離を行い、HA を沈殿させた。濾過膜上に濃縮した画分は、さらに 1000 Da の透析膜を用い、超純水を用いて透析を行うことでさらに精製した。透析は、1 ~ 2 日毎に超純水を交換しながら 2 週間程度行った。水交換日とその翌日の電気伝導度の変化がなくなった時点、若しくは水交換日翌日の電気伝導度が 1 μ S 未満になった時点をもって終了し、膜内残留物を凍結乾燥することで粉末状の HA を得た。なお、堆肥に対する HA の収率は、乾燥重量比で 5.8 % であった。

遠心分離後の上澄み液は、グラスフィルターを用いて吸引濾過を行い、浮遊物を取り除いた。濾過後の上澄み液 B は、DAX-8 樹脂を充填したカラムに通し、樹脂に FA を吸着させた。B をカラム通過後、超純水で排出液が無色透明になるまで樹脂を洗浄し、樹脂間隙に残った非腐植物質を除いた。次に、樹脂に吸着した FA を 0.1 M NaOH 水溶液によって溶離させた。NaOH 水溶液は、溶離液が無色透明になるまで流し、その間の溶離液を採取した。この溶離液は陽イオン交換樹脂カラムに通し、H⁺型とした FA 水溶液を得た。溶離液の後には超純水を通し、カラム排出液の pH が超純水と同程度の 7 程度になるまでを FA 水溶液として採取した。H⁺型とした FA 水溶液を凍結乾燥し、粉末状の FA を得た。なお、堆肥に対する FA の収率は、乾燥重量比で 0.19 % であった。

(2)-3 有機構造解析

・元素分析

精製したサンプルについて、C、H、N、S 及び灰分(ash)の元素分析を北海道大学機器分析センターに委託し、測定した。なお、O 含有量は分析値から算出した。測定するサンプルは、事前に真空乾燥し水分を取り除いたものを使用した。

・酸性官能基分析

SWEOM 等に含まれる酸性官能基として、カルボキシル基とフェノール性水酸基を測定した。測定には、AUT-501 型自動滴定システム及びガラス複合電極（東亜ディー・ケー・ケー）を用いて測定をした。

全酸度として、カルボキシル基及びフェノール性水酸基の含有量を滴定試験によって測定した。滴定時に用いる溶媒としての水は、超純水を沸騰することで脱炭酸させ、N₂ 雰囲気下で冷却したものを使用した。使用時以外は、ソーダライム管を容器口につけ保存した。対照試料は、0.025 M Ba(OH)₂ 水溶液を使用した。滴定には 0.1 M HCl 水溶液を使用した。ここで用いる HCl は、0.05 M NaOH 水溶液を 1 次標準として正確な濃度を求めた。測定の操作は、50 mL 三角フラスコに各試料を 10 mg 秤量し、0.05 M Ba(OH)₂ 水溶液を 20 mL 加える。ソーダライム管でフラスコに蓋をし、常温暗所にて一晩振盪した。その後、脱炭酸水で洗浄した 0.5 μm のガラス繊維濾紙で濾過し、固形物を取り除いた。この濾液について、N₂ 雰囲気下で終点は pH 8.4 として滴定した。ブランクは 0.025 M Ba(OH)₂ 水溶液のみで計測した。測定は各試料 2 回行い、平均値をデータとして使用した。

カルボキシル基含量の測定は、酢酸カルシウム法により行った。溶媒には、全酸度の測定と同様に、脱炭酸水を使用した。対照試料には 0.2 M (CH₃COO)₂Ca 水溶液を使用した。滴定には、0.04 M NaOH 水溶液を使用した。ここで用いる NaOH 水溶液は、まず飽和 NaOH 水溶液（約 18 M）を調整し、これを滴定前に脱炭酸水で希釈することで調整した。正確な濃度は、全酸度測定時に使用した 0.1 M HCl 水溶液を 2 次標準として、滴定により求めた。測定の操作は、100 mL 三角フラスコに各試料を 10 mg 秤量し、0.2 M (CH₃COO)₂Ca 水溶液を 10 mL 加える。そこに 40 mL の脱炭酸水を加え、ソーダライム管でフラスコに蓋をし、常温暗所にて一晩振盪した。その後、脱炭酸水で洗浄した 0.5 μm

のガラス繊維濾紙で濾過し、固形物を取り除いた。この濾液について、N₂ 雰囲気下で終点は pH 9.8 として滴定した。ブランクは 0.2 M (CH₃COO)₂Ca 水溶液のみで計測した。測定は各試料 2 回行い、平均値をデータとして使用した。

フェノール性水酸基含量は、先の操作で求めた全酸度含量からカルボキシル基含量を差し引くことで算出した。

・分子量の測定

サイズ排除クロマトグラフィー (HPSEC) は、高速液体クロマトグラフィーシステム (日本分光) と TSK-Gel α-M カラム (東ソー) を用いて測定を行った。標準物質は、ポリスチレンスルホン酸ナトリウム (PSAS Fulka) を用い、分子量は 2,600,000、990,000、350,000、150,000、77,000、49,000、32,000、17,000、13,000、6,800、4,300、1,400、208 Da を用いた。排除堆積は 2,600,000 Da 標準物質の保持時間より計算した 6.3 mL とし、検量線を作成した。検量線は、表計算ソフト (Origin Pro 8.1J) によるフィッティングによって求めた。溶離液は pH を 7.0 に調整した 75 %リン酸緩衝液と 25 %アセトニトリルの混合溶液を用い、分子量標準を約 1 mg を溶離液に溶かし測定に用いた。

サンプルの測定は、DOC (HA 又は FA) 水溶液 (1000 mg L⁻¹) 300 μL に溶離液 900 μL を加え約 250 mg L⁻¹ の溶液を作成し、流速 0.75 mL/min、カラムオープン温度 40 °C、検出波長 260 nm にて測定した。サンプルはそれぞれ 3 本測定し、分子量の値にはその平均値を使用した。

分子量は、測定したクロマトグラムとフィッティングにより求めた検量線から、重量平均分子量 (M_w) と数平均分子量 (M_n) を以下の式より各々計算した。

$$M_w = \frac{\sum(M_i \times h_i)}{\sum h_i}$$
$$M_n = \frac{\sum h_i}{\sum (h_i / M_i)}$$

ここで、M_i は保持時間に相当する分子量の重さ、h_i はピーク強度を表す。なお、件稜線は、各標準物質分子量とそれの最も高いピーク強度の保持時間で検量線を作成した。

・ 固体 CP-MAS ^{13}C NMR の測定

固体 CP-MAS ^{13}C NMR は、75.6 MHz Chemagnetics CMX-300 型を用い測定した。試料は真空乾燥したものを使用した。測定試料は、5 mm ロータ試料管 (ZrO 製) に約 50 ~ 60 mg 充填する。これを NMR 装置にセットし、試料管を 10 kHz で回転させた。測定パラメータを接触時間 1 ms、遅延時間 4 s、積算回数 16000 回で測定を行った。ピーク位置は、ヘキサメチルベンゼンを外部標準として測定した。

スペクトルの帰属は、

0 ~ 45 ppm を Alkyl-C、

45 ~ 60 ppm を N,O-alkyl-C、

60 ~ 110 ppm を Polysaccharide-C、

110 ~ 140 ppm を Aromatic-(C-H,C-C)、

140 ~ 160 ppm を Aromatic-(C-O)、

160 ~ 220 ppm を Carbonyl-C とした。

各領域が占める割合は、各領域のスペクトルの積分値を全体に対する面積割合として算出することで求めた

(2)-4 錯形成能の評価

・ 安定度定数と錯化容量

Fe^{2+} と SWEOM (HA 又は FA) の錯体濃度は、*o*-フェナントロリン(OP)を用いて錯形成をしていない $[\text{Fe}^{2+}]$ を測定し、全濃度から差し引くことで求められる。蓋付試験管に 1000 mg L^{-1} の SWEOM (HA 又は FA) 溶液 (0.05 M NaOH 水溶液溶媒) を $100 \mu\text{L}$ 分取し、pH を 3.6 に調整した 0.1 M 酢酸/酢酸ナトリウム緩衝液を $4700 \sim 4800 \mu\text{L}$ 加えた。そこに $500 \mu\text{M}$ 硫酸第一鉄溶液 (0.02 M HCl 溶媒) を $0 \sim 100 \mu\text{L}$ 加え攪拌した後、常温暗所で 24 時間振盪し錯体形成させた。次に、各試験管に 5 mM OP 水溶液を $100 \mu\text{L}$ 加え攪拌し 30 分程反応させた後、遊離の Fe^{2+} を UV-vis 吸光度計 (510 nm) によって測定した。溶液は、吸光度測定直前に攪拌してから測定した。

・ 錯体の解離速度

濃度に対し十分量の OP 共存化では、時間経過とともに SWEOM (HA 及び FA) Fe(II) 錯体中の Fe(II) は解離し、より親和性の高い OP へと移動する。この性質を利用し

て、SWEOM (HA 及び FA) の Fe(II) の解離速度を検討した。実験方法を以下に示す。蓋付試験管に SWEOM (HA 又は FA) 水溶液 (1000 mg L^{-1}) を $100 \mu\text{L}$ 分取し、pH を 3.6 に調整した 0.1 M 酢酸/酢酸ナトリウム緩衝液を $4700 \mu\text{L}$ 加えた。そこに $500 \mu\text{M}$ 硫酸第一鉄溶液を $100 \mu\text{L}$ 加え攪拌した後、10、20、30 または 40°C 暗所で 24 時間振盪し錯体形成させた。次に、各試験管に 5 mM OP 水溶液を $100 \mu\text{L}$ 加え攪拌し 30 分程反応させた後、遊離の Fe^{2+} を UV-vis 吸光度計 (510 nm) によって測定した。その後、再び 10、20、30 または 40°C 暗所にて 1~3 日間反応させた。その間、数時間おきに 510 nm の吸光度を測定し、吸光度の増加を SWEOM (HA 及び FA) -Fe(II) 錯体の Fe(II) の解離として考え変化を追った。また、いずれの測定も、溶液を測定直前に攪拌して行った。

(3) 研究の成果

(3)-1 元素組成

元素分析の結果を表 4.2.1-1 に示す。IHSS 標準試料の元素組成は、土壌由来の HA で C(58 %)、H (4 %)、O(34 %)、N(4 %)、S(0.4 %)、土壌由来の FA で C(50 %)、H (4 %)、O(43 %)、N(2~3 %) S(0.5~1 %) 程度である (IHSS data 1)。他の堆肥や土壌由来のデータでは、HA でそれぞれ C(50~59 %)、H(5 %)、O(35~40 %)、N(2~4 %)、S(0.3 %) 程度、FA でそれぞれ C(47 %)、H(4~5 %)、O(43 %)、N(0.8~1.5 %)、S(2.2 %) 程度である。一方、本研究で用いた HA は N(6.3 %) 及び S(1.1 %) を、FA は N(4 %) を多く含んでいることがわかった。なお、バーク堆肥由来の HA では、他の研究でも S 含有率が高くなっている。また、Ash% は HA が 0.0 %、FA が 1.2 % と十分低く、精製できていることが分かった。

一方、SWEOM は、堆肥を海水で抽出し、500 Da 以上に分画した成分であり、HA や FA のような腐植成分でなく、水溶性成分の中で多糖類やタンパクなど非腐植成分も含む分画と位置付けられる。SWEOM は HA 及び FA と比較して、H を多く含み、H/C モル比が最も大きいことから、飽和結合を多く含む構造であると考えられる。N% や N/C モル比が大きい値であることから、非腐植物質やタンパク質成分も多く含まれていると考えられる (Allard, 2006; Fuentes et al., 2007)。O も比較的多く含まれており、O/C モル比は FA と同程度に高い値であった。これより、カルボキシル基やフェノール性水酸基の様な酸性官能基、ケトン、エーテル及びアルコールなどの酸素含有基が多く含まれていると考えられる。また、Ash % は 2.5 % と低く、限外濾過等の操作で脱塩が行えていることが分かった。

表 4.2.1-1 SWEOM, HA, FA の収率と有機元素組成

	SWEOM	HA	FA
Yields (w %)	0.12	5.80	0.19
Elemental compositions (w %)			
C	45.7 ± 0.5	51.9 ± 0.9	45.3 ± 0.4
H	6.27 ± 0.16	5.26 ± 0.64	4.50 ± 0.45
N	6.41 ± 0.12	5.11 ± 1.75	3.85 ± 0.27
O	38.1 ± 0.3	28.8 ± 3.2	41.6 ± 2.0
S	0.84 ± 0.04	8.54 ± 4.28	1.69 ± 1.71
Ash	2.74 ± 0.20	0.41 ± 0.28	3.06 ± 1.71
Atomic ratio			
H/C	1.64 ± 0.06	1.21 ± 0.16	1.18 ± 0.11
N/C	0.12 ± 0.00	0.08 ± 0.03	0.07 ± 0.01
O/C	0.63 ± 0.01	0.42 ± 0.04	0.69 ± 0.04

(3)-2 酸性官能基組成

酸性度滴定試験による酸性官能基量分析の結果を表 4.2.1-2 に示す。腐植物質中に含まれる官能基のうち、カルボキシル基やフェノール性水酸基のような酸性官能基は、金属との錯形成に対して重要な役割をもつと考えられている。土壌由来の IHSS 標準試料では、HA で COOH (8 mmol g⁻¹ C)、Phenolic-OH (2 mmol g⁻¹ C)程度であり、FA で COOH (13 mmol g⁻¹ C)、Phenolic-OH (2 mmol g⁻¹ C)程度である。しかし、本研究で用いた HA は、フェノール性水酸基を多く含んでいた。FA は多くの酸性官能基を有し、そのほとんどがカルボキシル基であることがわかった。HA 及び FA でみられるこれらの傾向は、他の土壌又は堆肥でなされた研究でも報告されている。HA に多く含まれているフェノール性水酸基は、使用した堆肥の原材料であるバーク由来のリグニンフェノールによるものと思われる。SWEOM は、酸性官能基量が最も少なかった。HA と比較すると、カルボン酸

は HA が若干多く、フェノール酸では HA が SWEOM の 1.6 倍も多く含んでいることが分かる。FA と比較すると、FA にはカルボン酸が SWEOM の 4 倍も含まれていることが分かった。一方、フェノール酸は FA と SWEOM は同程度であった。SWEOM は、O/C モル比が FA と同程度であるにもかかわらず酸性官能基量が少ないことから、アルコールやエステル、ケトン等を多く含むと考えられる。

表 4.2.1-2 SWEOM, HA, FA の酸性官能基組成

Sample	Acidity (mmol g ⁻¹ C)		
	COOH	Phenolic-OH	Total
	3.8 ±0.8	3.7 ±0.0	7.5 ±0.8
HA	4.8 ±1.4	5.9 ±0.1	10.7 ±1.5
FA	16 ±0.8	3.6 ±0.3	19.6 ±1.1

(3)-3 分子量分布

HA や FA のような腐植物質は、様々な高分子化合物の混合物であると考えられており、SEC による分子量分布の測定はこれらの特性を評価する上で重要である。HPSEC のクロマトグラムより求めた分子量の結果を表 4.2.1-3 に示す。HA 及び FA は他の土壌や堆肥期限のもので報告されているデータ (M_w HA = 0.8 ~ 35 kDa; M_w FA = 1.5 ~ 3.5 kDa) より若干低い値であった。SWEOM の重量平均分子量は約 30 kDa であり、HA と比較しても非常に大きい分画であることが分かった。 M_w / M_n は HA が約 7.0、FA が約 1.6 であるのに対し、SWEOM は約 18 と大きいことから、SWEOM は様々な構造を有す 1 つの巨大な縮合体というよりはむしろ、様々な分子量分画のもの集合体であると考えられる。

表 4.2.1-3 SWEOM, HA, FA の分子量測定結果

Sample	Molecular weight	
	Mw	Mw/Mn
	28700 ±500	17.7
HA	10900 ±200	7.0
FA	1250 ±20	1.6

(3)-4 固体 CP-MAS ¹³C NMR による構造解析

固体 CP-MAS ¹³C NMR スペクトルと各帰属部位の占める割合を、それぞれ図 4.2.1-1 と図 4.2.1-2 に示す。本研究においては 0–60 ppm を Alkyl C、105–160 ppm を Aromatic C としてまとめて考察した。HA は芳香族に富んでいることが分かった。これはリグニン由来のフェノール酸類を多く含むためと思われる。FA は HA に比べ芳香族のピークが弱い、カルボキシル基の 160–180 ppm のピークエリアが大きい。これは、FA に多く含まれているカルボン酸によるものと思われる。これらの特徴は他の研究でも見られている。SWEOM はアルキル鎖を豊富に含み、芳香族は少ないことが分かった。SWEOM は元素分析の結果より O/C モル比が FA と同程度であるのに対し、160–220 ppm に現れるカルボキシル基含量については、FA よりも低く HA と同程度又は若干高くでた。これは元素分析結果や酸性官能基試験の結果と併せて考えると、主にエステルやケトン、アルデヒドによるものと考えられる。一方、脂肪族のアルコールやエーテルは HA や FA と比べ SWEOM では、豊富に含まれていることが分かった。これらから、SWEOM はアルキル鎖や脂肪族のアルコール、エーテルが中心の構造であると考えられる。以上より、SWEOM では多糖類やタンパク等、非 HS による寄与があると考えられる。

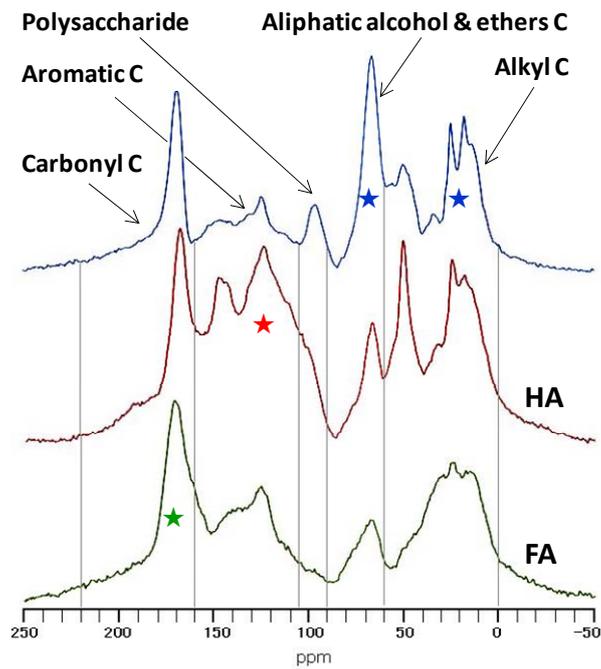


図 4.2.1-1 SWEOM, HA, FA の固体 CP-MAS ^{13}C NMR スペクトル

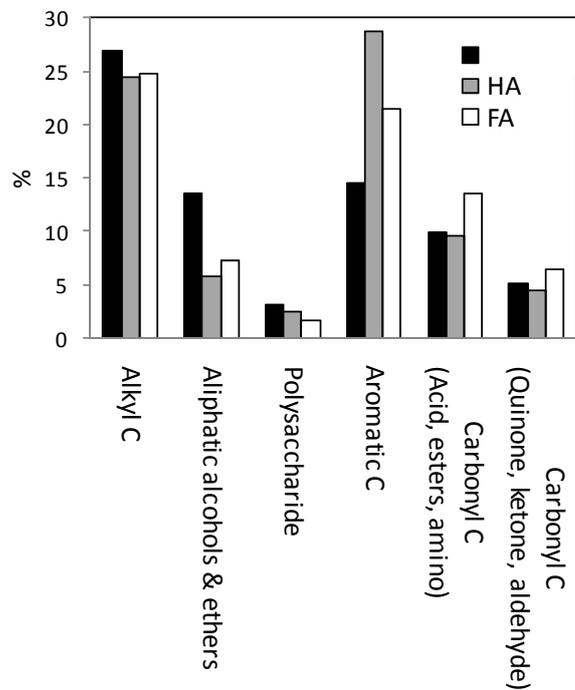


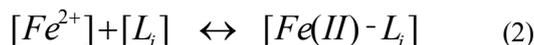
図 4.2.1-2 ^{13}C NMR スペクトルから計算した各炭素種の割合

(3)-5 鉄錯体の熱化学的・速度論的安定性

Fe²⁺を含む SWEOM 等の腐植物質 (HS) 水溶液中での、Fe(II)-HS 錯体の錯形成反応モデルは以下のような単純なモデルで考えた。



HS と Fe²⁺の錯形成平衡状態は、HS 分子中のリガンドを L_iと表すと、式(1)より



と表せられる。すると式(2)より、この錯形成反応の生成定数 K_bは以下のように書ける。

$$K_b = \frac{[Fe(II) - L_i]}{[Fe^{2+}][L_i]} \quad (3)$$

HS 中に含まれる Fe(II)は、Σ[Fe(II)-L_i]と表せられる。これは、以下の様に考えられる。

$$[Fe(II) - L_i] = [Fe(II)]_{total} - [Fe^{2+}] \quad (4)$$

ここで、[Fe(II)]_{total} 及び [Fe²⁺]はそれぞれ全 Fe(II)濃度とフリーの Fe(II)イオンの濃度を表す。さらに、全リガンド濃度を C_Lとにおいて考えると、これは HS 中の任意の結合サイトの濃度を使って以下の様に表せられる。

$$C_L = \sum C_{L_i} = \sum ([L_i] + [Fe(II) - L_i]) \quad (5)$$

式(3)、(5)より錯形成した Fe(II)の全濃度とフリーの Fe(II)イオンの濃度の関係は

$$\sum [Fe(II) - L_i] = \frac{C_L K_b [Fe^{2+}]}{1 + K_b [Fe^{2+}]} \quad (6)$$

と表せられる。各 Fe²⁺濃度と錯形成した Fe(II)の全濃度は比色法によって求められる。このプロットに式(6)をフィッティングすることで全リガンド濃度 C_Lと錯生成定数 K_bが求められる。さらに、HS 中のリガンドと錯形成した Fe(II)のモル数を比較するため、以下の式によって錯化容量 N を求めた。

$$N = \frac{C_L}{[HS] \times \%C / 100} \quad (7)$$

なお、フィッティングは Origin Pro 8.1 によって行った。測定は各試料 3 回行い、その各点の平均値をプロットしたものをフィッティングに用いた。

図 4.2.1-3 と表 4.2.1-4 に SWEOM、HA 及び FA の比色検定結果とフィッティング曲線、錯体安定定数を示す。SWEOM、HA 及び FA のプロットは式(6)でよくフィッティングできた (r² = 0.97 for SWEOM, r² = 0.97 for HA, r² = 0.99 for FA)。

SWEOM は錯化容量がもっとも小さいが、錯生成定数は高いことから、HA や FA と比較して錯体としての溶存安定性が高いといえる。逆に、HA では錯化容量が最も大きく、錯生成定数は小さい値となった。FA は、リガンドとして働くと思われる酸性官能基量が最も多かったが、錯化容量は比較的小さな値であり、錯生成定数は SWEOM と同様高い値を示した。

FA は SWEOM と比べてカルボン酸量が非常に多かったにもかかわらず、錯化容量は SWEOM より若干大きい程度で、カルボン酸量が中程度であった HA が最も錯化容量が大きくなった。これより、錯化容量には酸性官能基量だけでなく、構造的な要因が深くかかわっていると考えられる。SWEOM 等の構造的な特徴を考えると、TMAH-py-GCMS の結果等から、HA は最もフェノール酸類を含むと考えられる。リグニン由来のフェノール酸類のようにオルト位にカルボキシル基又はフェノール性水酸基をもつような構造が錯形成により有利に働くため、含有酸性官能基量だけでなく芳香族部位の豊富な構造をとる HA が金属と錯形成しやすくなると考えられている。そのため、芳香族に富み、フェノール酸類が多く検出された HA は図 4.2.1-3 で表したようなフェノール酸類がリガンドとなる錯体を形成しており、構造上錯形成に有利であるため錯化容量が最も大きくなったと考えた。一方、FA ではカルボン酸量は多いが、フェノール性水酸基量は SWEOM と同程度であった。さらに TMAH py-GC/MS ではリグニン由来と思われるフェノール酸類がほとんど検出されなかった。これより、FA では構造中の脂肪酸部位がリガンドとして働いていると考えられる。SWEOM は、脂肪酸中心の構造であるがフェノール酸類も若干検出されており、どちらもリガンドとして働いていると考えられる。以上より、脂肪酸がリガンドとして働く場合は Fe(II)と錯形成しやすく、フェノール酸類では安定定数は低い構造上錯形成に有利であるため、錯化容量が増加すると考えた。

海水中での溶存安定性、すなわち熱力学的安定性という観点からは錯生成定数は重要なパラメータであるが、Fe(II)-SWEOM 錯体から Fe が植物に取り込まれる場合、シデロフォアなど植物からの分泌物との錯体を介して、或いは直接膜タンパクにより Fe を取り込むメカニズムが一般的に知られている。これら植物への輸送物質との配位子交換がスムーズに行われなければ、Fe が溶存していても植物に対する有用性は低いと考えられる。ゆえに、錯体は生成定数が高く溶存安定で、すぐに解離することが必要である。すなわち、生物利用性を検討するためには Fe-SWEOM 錯体の熱力学的安定性だけでなく、速度論的不安定性についての検討もすることが必要である。そこで、速度論的不安定性についても検討した。

本研究で使用した SWEOM、HA 及び FA は、比色試薬として用いた OP ($\log\beta_{3\text{ of Fe(II)-OP}} = 21$) と比較すると、Fe(II)との親和性は弱い。そのため、OP 共存化では、時間経過に伴い式(8)の様に Fe(II)-HS 錯体から Fe(II)が解離し OP と錯体を形成する。



この性質を用いて SWEOM、HA 及び FA の Fe(II)錯体の解離速度を比較した。その結果を図 4.2.1-4 に示す。錯体濃度の速度式は、擬一次解離速度定数 k_{obs} を用いて式(9)のように表せられる。

$$[Fe(II) - L]_t = [Fe(II) - L]_0 \exp(-k_{\text{obs}}t) \quad (9)$$

実験値のプロットに対し、Origin Pro 8.1 にて式(9)のフィッティングを行ったところ、表 4.2.1-4 に示されているように高精度でフィッティングすることができた ($r^2 = 0.99$ for SWEOM, $r^2 = 0.87$ for HA, $r^2 = 0.87$ for FA)。

求めた k_{obs} から、SWEOM 及び FA は錯形成した Fe(II)を解離しやすいことが分かった。一方、錯化容量が最も大きかった HA は、SWEOM や FA と比較して Fe(II)を解離しにくいことが分かった。HA はフェノール酸類がリガンドとなると考えられるが、このような錯体は解離しにくく、比較的強い結合となると考えられる。SWEOM や FA のように脂肪酸をリガンドとする場合は、解離しやすい錯体を形成すると考えられる。

EDTA (エチレンジアミン三酢酸) や乳酸は、錯配子のモデル化合物として知られており、Fe-EDTA 錯体を用いた鉄有機物錯体と植物の鉄摂取との関係が検討されてきた。そこで、本研究において SWEOM 等の解離速度の比較対象として、これらのモデル化合物の *o*-フェナントロリン共存下での Fe(II)の解離速度についても同実験を行い、検討した。その結果、Fe(II)-EDTA 錯体からの Fe(II)の解離は確認されなかった (図 4.2.1-4)。一方、Fe(II)-乳酸錯体は速度論的に非常に不安定であり、*o*-フェナントロリン共存下では即座に解離することが確認された ($k_{\text{obs}} = 2.9 \text{ s}^{-1}$)。ここで、海藻への鉄の摂取量と EDTA 濃度の関係を見た研究において、EDTA 濃度の上昇とともに海藻の鉄摂取量が減る傾向にあることが確かめられており、Fe-EDTA 錯体は海藻の鉄摂取において生物の利用性に欠けると考えられる報告もなされている。しかし、海水中に自然に溶存している低分子有機物分画 (< 1kDa) の鉄錯体が海藻類の鉄摂取に貢献するという報告もなされている。これらより、海藻類の鉄の摂取メカニズムにおいて有機物が鉄との錯形成及び溶存に寄与していると考えられるが、Fe-EDTA 錯体のように速度論的に安定な錯体の場合、海藻からのシデロフォアなどの分泌物が鉄と錯形成でき

ず、その結果海藻の鉄の摂取を妨げてしまうと考えられる。ゆえに、乳酸やSWEOMのように速度論的に不安定であれば、錯形成して溶存鉄濃度を上昇させると同時に、シデロフォア等に鉄を渡すキャリアーとして海藻類の鉄の摂取を促すことができると考えられる。

表 4.2.1-4 SWEOM, HA, FA の鉄(II)錯形成能と錯体の解離速度定数

Sample	Binding abilities			Dissociation rate	
	$\log K_b$	N ($\mu\text{mol g}^{-1}\text{C}$)	r^2	($\text{s}^{-1} \times 10^{-5}$)	r^2
	5.53	82.89	0.97	6.85	0.99
HA	4.92	272.19	0.97	2.30	0.87
FA	5.30	119.48	0.99	5.79	0.87

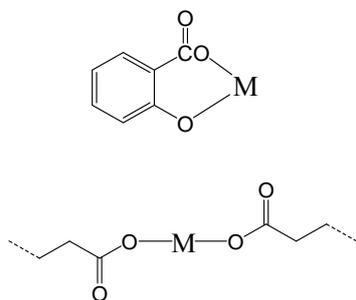
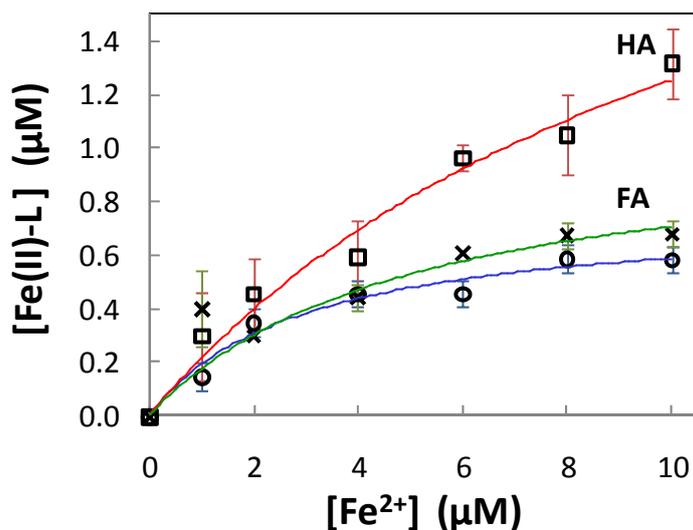


図 4.2.1-3 遊離の鉄濃度と錯体濃度との関係および錯形成部位の推定構造

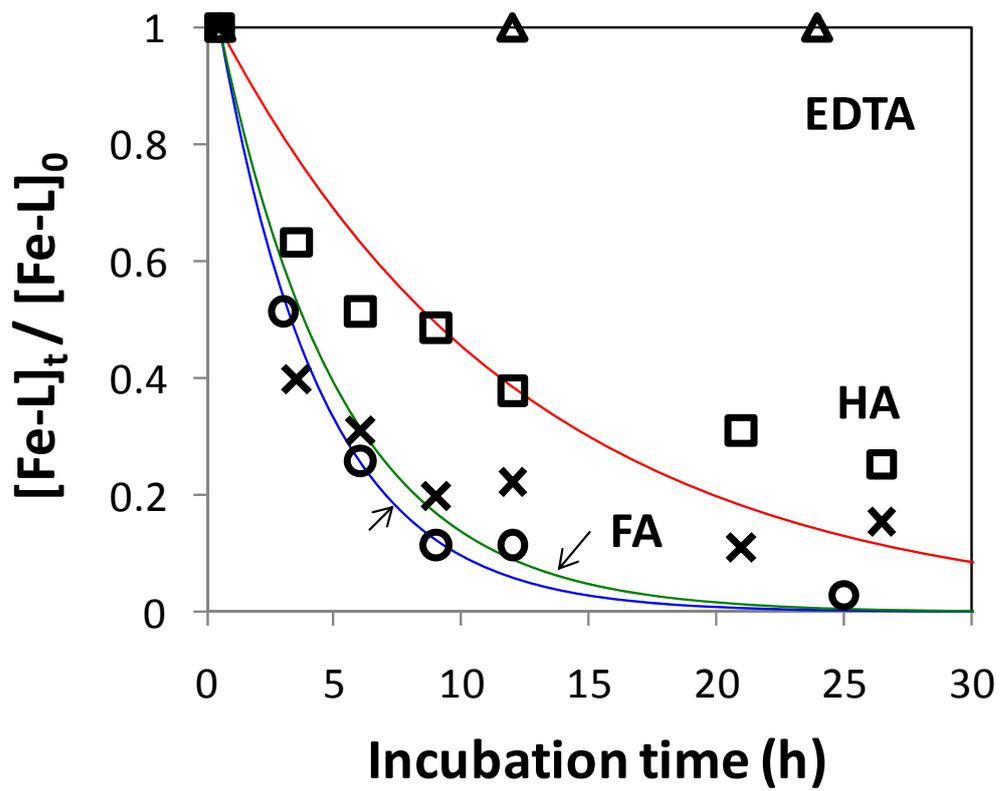


図 4.2.1-4 Fe(II)-SWEOM, HA, FA 錯体の解離速度曲線

(3)-6 鉄(II)-HA, FA, SWEOM 錯体の解離速度に対する活性化パラメータの評価

一般に、溶存有機物と錯形成している鉄(II)は、生体膜に於ける金属受容タンパクと配位子交換することにより、海藻中に取り込まれることが知られている。したがって、鉄(II)-溶存有機物錯体の解離速度が速いほど生物利用性も大きくなると考えられる。前節では、OP を金属受容タンパクのモデルとして、配位子交換速度を評価する手法の開発を行い、HA、FA、そして SWEOM に対する解離速度定数を求めることができた。確かに Fe(II)-SWEOM 錯体の解離速度定数は、HA および FA のものに比べ小さかったが、オーダーによる大きな変化ではなかった。錯体の速度論的な解離安定性を評価するためには、動力学的パラメータである活性化自由エネルギー(ΔG^\ddagger)、活性化エンタルピー(ΔH^\ddagger)、活性化エントロピー(ΔS^\ddagger)を求める必要がある。したがって、活性化パラメータに関する評価を行った。

鉄(II)-溶存有機物錯体(Fe(II)-DOM)は、OP のような強い配位子共存下では配位子交換により解離する。OP 共存下での Fe(II)-DOM 錯体の解離は、以下の式に示すように活性錯合体である三元錯体[OP-Fe(II)-DOM] ‡ を経て Fe(II)-OP を形成すると考えられる。



Fe(II)-DOM 錯体の解離は、反応(10)で示したように発色する Fe(II)-OP の生成を吸光光度法でモニターすることにより計測することが可能である。しかし、擬一次速度定数(k_{obs})は Fe(II)-DOM 錯体の濃度($\Sigma[\text{Fe(II)-DOM}_i]$)の減少速度として、以下の式に従い評価した。

$$-\frac{d\Sigma[\text{Fe(II)-DOM}_i]}{dt} = k_{\text{obs}} \times \Sigma[\text{Fe(II)-DOM}_i] \quad (11)$$

式(11)の積分型は以下のように書ける。

$$\ln \frac{\Sigma[\text{Fe(II)-DOM}_i]_{t=t}}{\Sigma[\text{Fe(II)-DOM}_i]_{t=0}} = -k_{\text{obs}} \times t \quad (12)$$

ここで、 t は OP を加えてからの反応時間を示している。反応(10)において、一時的な化学種[OP-Fe(II)-DOM] ‡ は、配位子交換で Fe(II)-DOM から Fe(II)-OP を生成する活性錯合体と見なすことができる。反応(1)に対する活性化パラメータを評価するため、 k_{obs} の温度依存性を 10 – 40°Cの間で検討した。活性化自由エネルギーは以下のように書くことができる。

$$k_{\text{obs}} = \frac{k_{\text{B}}T}{h} \exp\left(-\frac{\Delta G^{\ddagger}}{RT}\right) \quad (13)$$

ここで、 h , k_{B} , T そして R は、それぞれ、プランク定数、ボルツマン定数、絶対温度、そして気体定数を示している。式(4)から、 ΔG^{\ddagger} がある温度での k_{obs} を用いることにより計算できる。 $\Delta G^{\ddagger} = \Delta H^{\ddagger} - T\Delta S^{\ddagger}$ より、式(4)は活性化エンタルピー(ΔH^{\ddagger})と活性化エントロピー(ΔS^{\ddagger})を用いることにより、以下のように書ける。

$$\ln \frac{k_{\text{obs}}}{T} = \ln \frac{k_{\text{B}}}{h} + \frac{\Delta S^{\ddagger}}{R} - \frac{\Delta H^{\ddagger}}{R} \times \frac{1}{T} \quad (14)$$

式(14)は、 $\ln k_{\text{obs}}/T$ と $1/T$ との直線的な相関関係を示しており、アイリングプロットと呼ばれている。Fe(II)-SWEOM, Fe(II)-HA そして Fe(II)-FA 錯体に対するアイリングプロットを図 4.2.1-5 に示す。

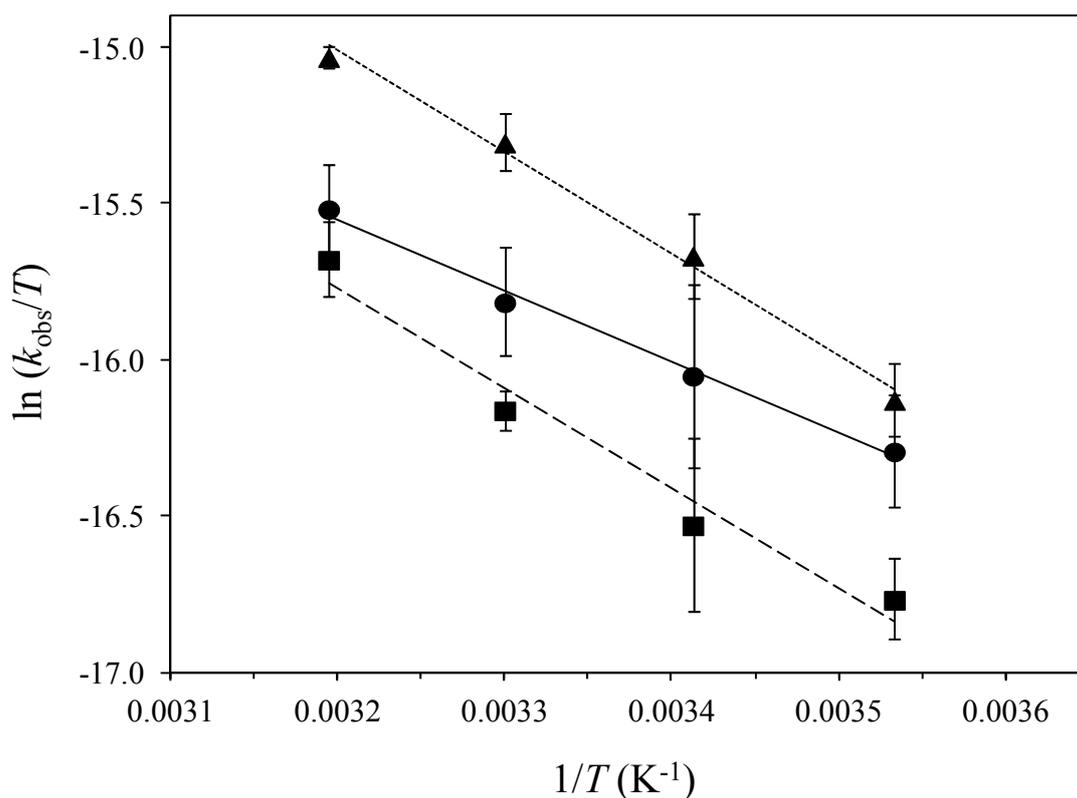


図 4.2.1-5 Fe(II)-SWEOM 錯体(●), Fe(II)-HA 錯体(■)そして Fe(II)-FA 錯体(▲)に対するアイリングプロット

ΔS^\ddagger と ΔH^\ddagger は、それぞれ、y-切片と直線の傾きから評価することができた。また、 ΔG^\ddagger は283 Kの条件で計算した。それらの結果を表4.2.1-5に示す。

表 4.2.1-5 各錯体に対する錯形成能と活性化パラメータ。

Sample	Binding abilities		Activation parameters		
	$\log K'$	N (mmol g ⁻¹ C)	ΔH^\ddagger (kJ mol ⁻¹)	ΔS^\ddagger (J K ⁻¹ mol ⁻¹)	ΔG^\ddagger ^a (kJ mol ⁻¹)
SWEOM	5.63±0.15	80.0±7.9	18.8±1.1	-267±4	94.3±2.2
HA	5.01±0.26	235±62	26.6±3.4	-243±11	95.5±6.6
FA	5.39±0.10	112±10	27.0±1.6	-236±5	93.8±3.1

^a ΔG^\ddagger values were evaluated at 283 K.

ΔS^\ddagger は、活性錯合体の安定性に関わる情報を与える。しかし、 ΔG^\ddagger および ΔS^\ddagger は、いずれの錯体でも大きな違いは見られなかった。この結果は、Fe(II)-DOM 錯体の解離反応における反応中間体、すなわち活性錯合体の安定性は大きく変わらず、反応(1)で示した三元錯体であることを示唆している。一方、表 4.2.1-5 に示したように、Fe(II)-SWEOM の ΔH^\ddagger は、Fe(II)-HA や Fe(II)-FA に比べ明らかに低くなった。 ΔH^\ddagger は、活性錯合体の解離エネルギーであり、錯体の解離安定性が低いほど低くなる。ゆえに、Fe(II)-SWEOM 錯体は Fe(II)-HA 錯体や Fe(II)-FA 錯体に比べ解離しやすく生物利用性も高いことが示唆された。

(4) まとめ

従来、腐植物質、特に溶存性の観点から FA が海水中で鉄と錯形成し、溶存鉄濃度の上昇に寄与していると考えられていたが、HA や FA は海水の様な高塩濃度では凝集沈殿し溶存が困難であるので、鉄のキャリアーとして作用するか否かが甚だ疑問である。海水という特殊な環境下で溶出する SWEOM は HA 及び FA とは異なる構造的特色をもつことが明らかとなった。SWEOM は、HA 及び FA と比較して、脂肪酸に富み、分子量の大きい分画であることが分かった。FA と同程度の O/C モル比にも関わらず酸性官能基量は少なく、エーテルやアルデヒド、アルコール、ケトンを多く含んでいることが分かった。ステロイド等の脂質も溶出しており、SWEOM 中に多く含まれていることが分かった。多糖類やタンパク等、非 HS も溶出していると考えられ、N 含有量やアミノ酸含有量が高かった。

Fe^{2+} との錯形成能を検討した結果、SWEOM は鉄との錯化容量が最も小さいことが分かった。錯化容量については、HA はフェノール酸類を豊富に含むため構造的に有利で、SWEOM は脂肪酸中心の構造であるために錯化容量が小さくなったと考えた。また、Fe(II)-SWEOM 錯体の解離に関わる活性化パラメータを、OP との配位子交換に基づき測定し Fe(II)-HA、Fe(II)-FA と比較した。Fe(II)-SWEOM 錯体の活性化エンタルピーは、Fe(II)-HA 錯体および Fe(II)-FA 錯体の値に比べて大きく低くなり、解離しやすく生物利用性が高い錯体であることが示唆された。

4. 2. 2 海水抽出溶存有機物の分子量分画とそれらの鉄(II)錯形成能

(1) はじめに

H22 年度には、SWEOM の構造的特色に関する検討を行ってきた。その結果、HA や FA に比べ SWEOM は広い分子量分布を有し、バークに由来するフェノール部位のみだけでなく微生物に起因するアミノ酸や脂質部位など多様な成分からなることがわかった。水圏中の溶存有機物は、微量金属の生物利用性に深く関与しており、分子量サイズによってその有効性が大きく異なることが知られている。そこで、限外濾過法により SWEOM を分子量分画し、各分子量サイズの含有量分布と主要分画に対する構造的特色を検討した。一方、H22 には SWEOM と HA や FA のような腐植物質との鉄(II)に対する錯形成能を OP 発色法により評価し比較検討したが、OP の発色条件が弱酸性であったため、海水の条件(pH 8.1)とは大きく異なった。しかし、SWEOM は、HA や FA と比べ錯化容量が小さいけれど解離しやすく生物利用性が高いことが示唆された。本実験では、OP より発色の pH 反応が広いフェロジン発色試薬を用い海水条件(イオン強度 0.7, pH 8.1)で、SWEOM の各分画に対する鉄(II)錯形成能を評価する手法に関しても検討を行った。実際の海水条件の場合、試薬の発色 pH だけではなく Fe(II)も酸化されて水酸化物となる問題点がある。そこで、系内にアスコルビン酸を抗酸化剤として添加して酸化を防ぐ試みを行った。

(2)方法

(2)-1 SWEOM 試料の分子量分画

市販の完熟バーク堆肥を凍結乾燥し、2mm の篩通過分を抽出に用いた。堆肥粉末と人工海水 (pH 8.1) を 1:10 (w/w) で混合したものを N₂ 雰囲気下で 3 日間振盪抽出後、遠心分離し上澄み液を濾過することで固形物を分離した。先の濾液から限外濾過によって分子量 100 kDa 以上、100 - 30 kDa、30 - 10 kDa、10 - 5 kDa、5 - 0.5 kDa、0.5 kDa 以下の分画を濃縮、超純水で洗浄し脱塩を行った。各分画の有機炭素量は、全有機炭素(TOC)分析計にて測定した。0.5 kDa の限外濾過膜でのみ濃縮精製した分画を SWEOM-N 分画(N)、100 kDa の限外濾過膜上に濃縮された分画を SWEOM-L 分画(L)とし、凍結乾燥によって粉末状の試料として得た。0.5 kDa 未満の分画は、塩酸によって pH 1.0 未満にした後、DAX-8 樹脂に吸着させ純水で洗浄し脱塩を行った。吸着分画は NaOH (0.01 M)で溶出し陽イオン交換樹脂によって H⁺型とした後、凍結乾燥を経て粉末試料を得た。これを

SWEOM-S 分画(S)として用いた。各分画の収量は N, L, S それぞれ 0.12, 0.11, 0.13 % (w/w of compost sample)であり、全 SWEOM の約 80%を精製、回収することができた。

(2)-2 各分画のキャラクタリゼーション

以下の項目に関して、4.2.1 節の方法に従い分析した。

- ・ 元素分析
- ・ 酸性官能基分析
- ・ 分子量分布
- ・ 固体 CP-MAS ^{13}C NMR

・ フーリエ変換赤外吸収(FT-IR)スペクトル

KBr 粉末 100 mg に対して各 SWEOM 分画粉末を 1 mg 添加し、瑪瑙乳鉢上で乳棒を用いて粉砕・混合した。これを一晩真空乾燥した後にペレットとして、FT/IR 600 型フーリエ変換赤外分光光度計(日本分光)により FT-IR スペクトルを測定した。測定におけるピーク分解能は 4 cm^{-1} とした。

(2)-3 Fe(II)に対する錯形成能の評価

pH 8.1 に調整した Tris 海水緩衝液を表 4.2.2-1 のような組成で調製した。この緩衝液にアスコルビン酸が 0.01 M となるように添加し、10~30 μL の 5 mM Fe^{2+} 標準液を加えた後、50 mg L^{-1} の濃度になるように SWEOM の各分画を添加した。25°C で 10 min 静置後、250 μL の 50 mM フェロジン(FZ)水溶液を添加し 562 nm の吸光度の時間変化を測定した。実験操作のプロチャートを図 4.2.2-1 に示す。

表 4.2.2-1 Tris 海水緩衝液の組成

Composition of Tris-Seawater in 1000 mL	
NaCl	28.0 g
KCl	0.7 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	7.0 g
MgCl ₂ · 6H ₂ O	4.0 g
CaCl ₂	1.11 g
Tris	1.0 g

0.8 × Tris-Seawater

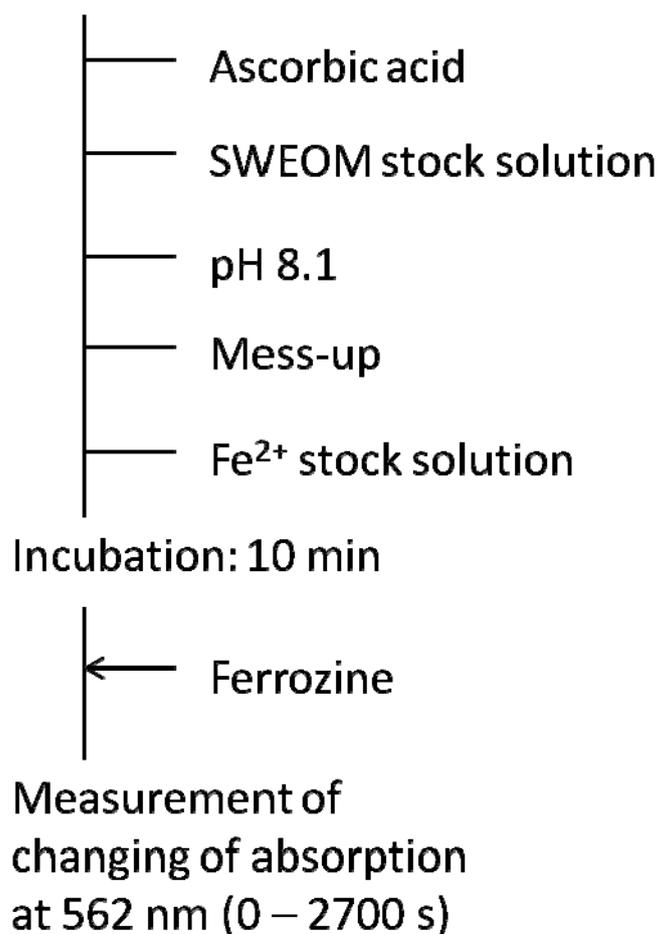


図 4.2.2-1 海水条件下での鉄(II)錯形成能評価方法の標準操作

(3) 研究の成果

(3)-1 SWEOM 分子量分画の分布

HA、FA と SWEOM(N 分画)のサイズ排除クロマトグラムと数平均(Mn)および重量平均(Mw)分子量の計算値を、それぞれ、図 4.2.2-2 および表 4.2.2-2 に示す。

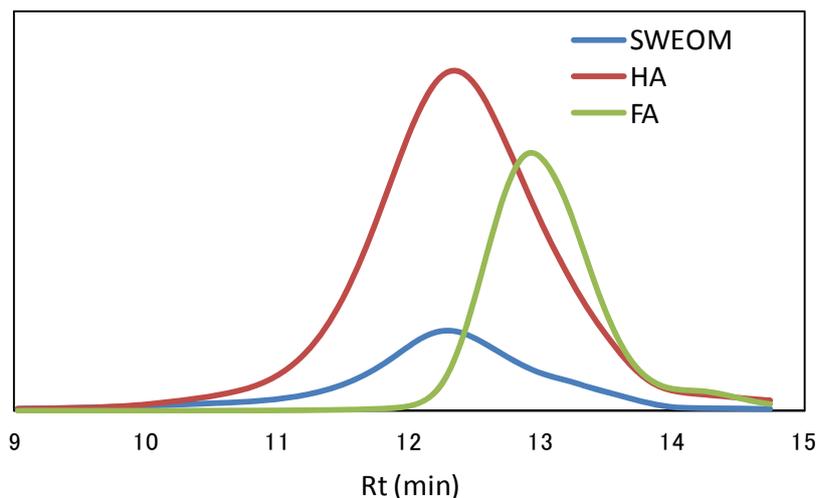


図 4.2.2-2 HA, FA, SWEOM(N 分画相当)のサイズ排除クロマトグラム

表 4.2.2-2 HA, FA, SWEOM(N 分画相当)の分子量

Sample	Molecular weight	
	Mw	Mw/Mn
SWEOM	28700 ±500	17.7
HA	10900 ±200	7.02
FA	1250 ±20	1.62

表 4.2.2-2 に示されているように、分子量分布の大きさを示す Mw/Mn 比は SWEOM の方が HA や FA に比べ大きく、様々な分子量分画を含む混合物であることが示唆された。したがって、これら分子量分画を詳細に分画し、各分画の分布と構造的特色を明らかにすることが必要である。

堆肥からの SWEOM 画分に関して、限外濾過を用いて分子量分画した。0.5 kDa 以上の分画は、各限外濾過膜上の残留分を回収し、超純水で 100 mL に定容した溶液の TOC 値で比較した。図 4.2.2-3 に分子量分画の含有量分布を示す。0.5 kDa 未満の分画 S は、以下の式に示すように、N 分画の収量に対する S 分画の収量の比を 0.5kDa 以上の合計 TOC 値に掛けた値を用いた。

$$TOC_s = TOC_L \times \frac{\text{yield of } S}{\text{yield of } L} \quad (15)$$

これより、SWEOM は 100 kDa 以上の高分子量分画 (L) と 0.5 kDa 未満の低分子量分画 (S) で占められていることが明らかになった。そこで、中心的な L、S と 100 - 0.5 kDa を含めた 0.5 kDa 以上の N の 3 分画について検討した。

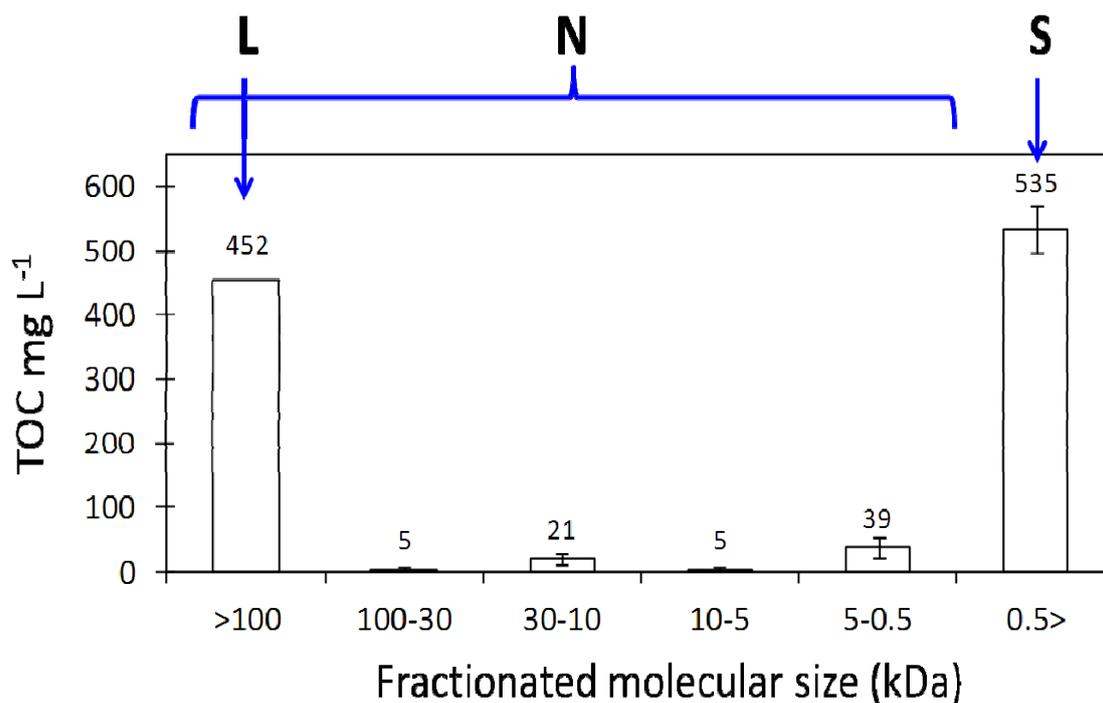


図 4.2.2-3 SWEOM 分子量分画の分布

(3)-2 N, S, L 分画の構造的的特色

・有機元素組成

表 4.2.2-3 に N, S, L 分画の有機元素組成(C, H, N, S, O 含有率)を示す。SWEOM(N 分画に相当)は、HA や FA に比較して飽和炭化水素と窒素含有化合物に富む分画であることが明らかとされた。表 4.2.2-2 から N 分画と L 分画の元素組成は、ほぼ同様であった。しかし、S 分画については N および L 分画に比べ H/C 原子数比が小さく、N/C 原子数比が小さかった。S 分画における低い H/C 原子数比および N/C 原子数比は、N および L 分画に比べ飽和炭化水素の割合が小さく、アミノ酸やタンパクなど窒素含有化合物の割合が小さいことを示唆している。一方、O/C 原子数比に関しては N および L 分画とほぼ同等の値となった。SWEOM は HA や FA に比べて O/C 原子数比が高いけれど、これら酸素含有化合物は鉄との錯形成に関与するカルボキシル基やフェノール性水酸基のような酸性官能基ではなく、エーテルやエステルに由来する酸素であることが明らかとなっている。各分画に関して酸素含有化合物の種類を明らかにするため、酸性官能基含有量や分光スペクトルによる構造解析を行う必要がある。

表 4.2.2-3 N, L, S 分画の有機元素組成

Sample	%C	%H	%N	%S	%O	%ash	H/C	N/C	O/C
N	46.17	6.11	6.53	0.87	37.78	2.54	1.58	0.12	0.61
L	43.49	6.19	5.93	1.11	36.91	6.38	1.70	0.12	0.64
S	45.32	4.74	4.07	1.34	37.38	7.16	1.25	0.08	0.62

・酸性官能基組成

N, L, S 分画に関する酸性官能基分析の結果を表 4.2.2-4 に示す。元素組成が類似していた N と L について、カルボキシル基(COOH)含有量は N の方が高く、フェノール性水酸基(Phenol-OH)含有量は L の方が高かった。この結果は、N 分画における 0.5 kDa~100 kDa の分画の寄与を示唆している。したがって、100 kDa 以上の高分子の分画は、カルボキシル基が少なくフェノール性水酸基を多く含むと考えられる。また、S 分画は N と L に比べ、カルボキシル基とフェノール性水酸基の含有量がともに高く、これらの合計値である全酸度(すなわち全酸性官能基含有量)は、3 分画の内最も大きな値となった(N 7.60 mmol g⁻¹ C; L 10.2 mmol

$\text{g}^{-1} \text{C}$; S 16.8 $\text{mmol g}^{-1} \text{C}$)。この結果は、S 分画が他の分画に比べ鉄(II)との錯形成に關与する酸性官能基を多く含むと共に親水性に富むことを示している。

表 4.2.2-4 N, L, S 分画の酸性官能基含有量 (単位 : $\text{mmol g}^{-1} \text{C}$)

Sample	COOH	Phenolic-OH
N	3.85	3.75
L	0.47	9.73
S	5.87	10.9

・ ^{13}C NMR スペクトル

図 4.2.2-4 に固体 CP-MAS ^{13}C NMR スペクトルを、表 4.2.2-5 にピーク帰属を示す。N と L に関しては 60 – 90 ppm に見られる脂肪族エーテル、脂肪族アルコールの酸素に結合した炭素のピークが強く表れている。また、L に関しては、0 – 50 ppm のメチルおよびメチレン炭素のピークが強く表れた。したがって、これらの分画は脂肪族性が高いものと考えられる。一方、S に関しては N や L で表れた脂肪族炭素のピークは弱く、105 – 160 ppm の芳香族炭素のピークが強く出た。しかし、N や L 分画では芳香族炭素のピークは強く表れなかった。これらの結果は、S 分画が N および L 分画に比べ芳香属性に富むことを示している。また、160 ppm 以上に表れるカルボニル炭素のピークが、L および S で強く表れた。S についてはカルボキシル基含有量が大きかったため、このピークはカルボン酸のカルボニル基に起因すると考えられる。しかし、L の場合カルボキシル基含有量は 3 つの分画の中で最も低かった。したがって、 ^{13}C NMR スペクトルで見られた強いカルボニル炭素のピークは、アミドやエステルおよびアルデヒドやケトンに起因すると推測できる。

N と L 分画では、脂肪族炭素のピークが S 分画では芳香族炭素のピークが強く表れた結果は、N と L 分画は脂肪族のような飽和炭化水素に富み、S 分画は芳香族のような不飽和炭化水素分に富むことを示しており、これらの結果は H/C 原子数比で見られた傾向と良く一致した。

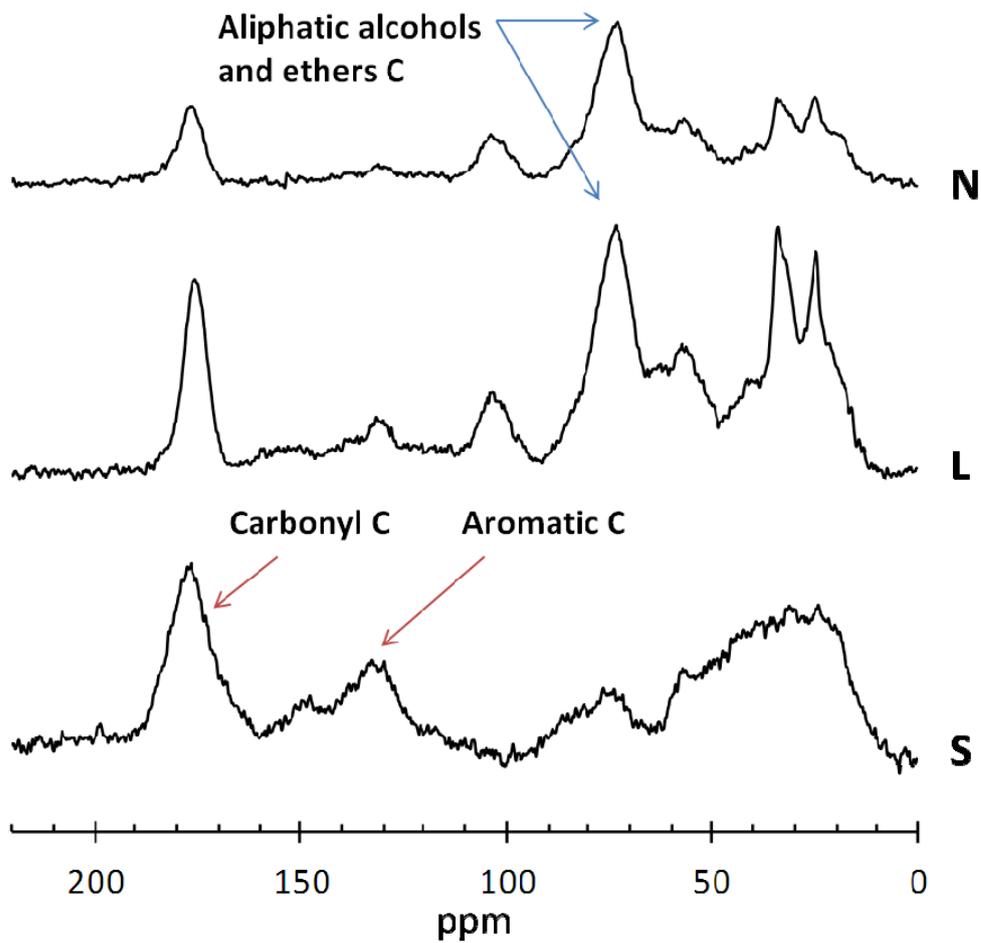


図 4.2.2-4 N, L, S 分画に対する固体 CP-MAS ^{13}C NMR スペクトル

表 4.2.2-5 SWEOM 分画に対する ^{13}C NMR のピーク帰属

ppm	Carbon species
0-60	Alkyl C
60-90	Aliphatic alcohols & ethers C
90-105	Polysaccharide C
105-160	Aromatic C
160-180	Carbonyl C (acid, esters, amino)
180-220	Carbonyl C (quinone, ketone, aldehyde)

・ FT-IR スペクトル

図 4.2.2-5 に各分画の FT-IR スペクトルを示す。N 分画と L 分画では、 2900 cm^{-1} 付近にアルキル鎖のメチルおよびメチレンに由来する C-H 伸縮振動のピークが強く表れたが、S 分画に関してこのピークは弱かった。この傾向は、 ^{13}C NMR スペクトルおよび H/C 原子数比の傾向と良く一致し、N および L 分画が脂肪族性に富み、S 分画が芳香属性に富むことを示している。また、S 分画ではカルボキシル基のカルボニルに由来する 1760 cm^{-1} 付近の C=O 伸縮振動のピークが強く表れ、カルボキシル基含有量の結果とも良い一致を示した。また、S 分画では表れなかったが、N と L 分画では 1550 cm^{-1} に強いアミド II バンドが見られた。 ^{13}C NMR スペクトルにおいて、N および L 分画ではカルボキシル基含有量が少ない割には強いカルボニル炭素のピークを観測した。これは、FT-IR スペクトルの結果からアミドのカルボニルに由来するものと考えられる。

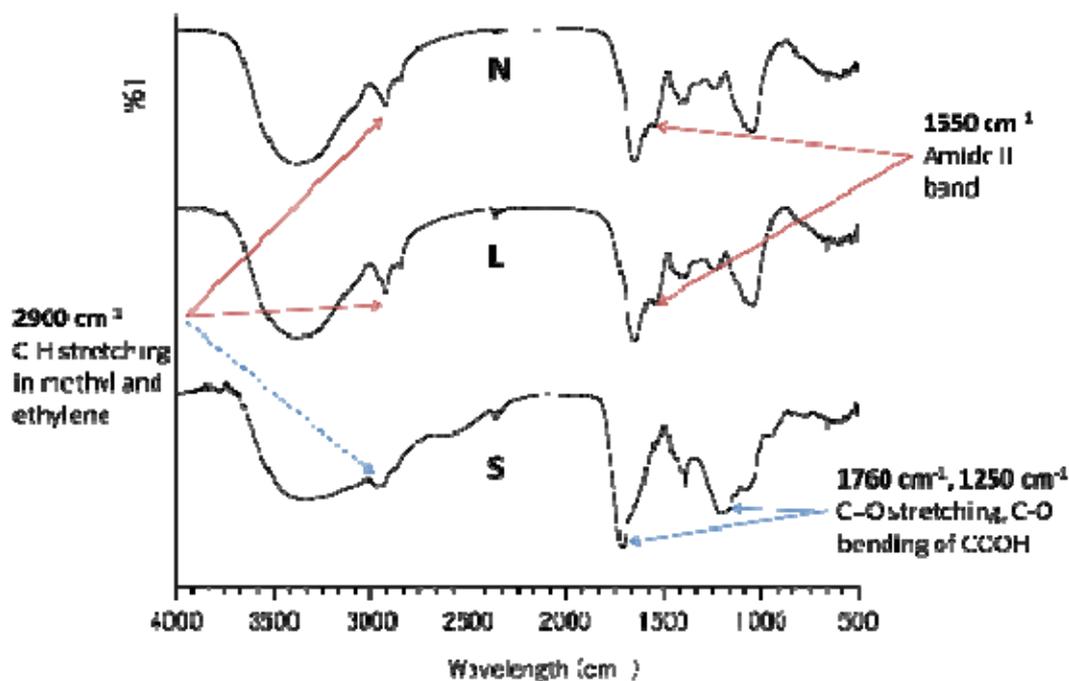


図 4.2.2-5 N, L, S 分画の FT-IR スペクトル

以上の結果から N, L, S 分画の構造的特色を以下のように纏めた。

- ① 高分子量である L 分画は脂肪族性に富み、低分子量の S 分画は芳香属性に富む。
- ② S 分画は、鉄(II)との錯形成に関与する酸性官能基を多量に含む。

(3)-3 海水条件下での鉄(II)錯形成能の評価

鉄(II)との錯形成能を評価する場合、遊離の Fe(II)と錯体化学種としての Fe(II)を形態別に分析する必要がある。OP 同様、FZ も遊離の Fe(II)に対して選択的に錯形成し、SWEOM との錯体に対しては不活性であることが知られている。しかし、FZ の Fe(II)に対する錯形成能は OP に匹敵するほど大きい。したがって、Fe(II)-SWEOM の溶液に FZ を加えると反応(1)と同様な配位子交換反応が起こり、Fe(II)-SWEOM 錯体は解離すると考えられる。



ここで、Fe(II)-SWEOM_{labile} は、錯体化学種の中でも FZ により交換可能な錯体を示している。実際の溶液中には Fe²⁺、FeOH⁺のような Fe(II)の非錯形成化学種が存在しており、これらは反応(16)に従い FZ と錯形成し発色する。しかし、溶存酸素を含み pH が 8.1 と高い条件では、Fe(II)化学種は容易に酸化され、Fe(III)の水酸化物コロイドを形成し測定が困難になる。実際に、Tris 海水緩衝液に Fe(II)のみを入れ、FZ で発色を行ってみると、入れた瞬間は十分に発色しているが(図 4.2.2-6c)、時間が経つと脱色していく傾向が見られた(図 4.2.2-6a)。これを防ぐために、抗酸化剤としてアスコルビン酸の添加を試みた結果、発色は時間が経っても安定していた(図 4.2.2-6b)。したがって、アスコルビン酸の添加が有効であると考えた。

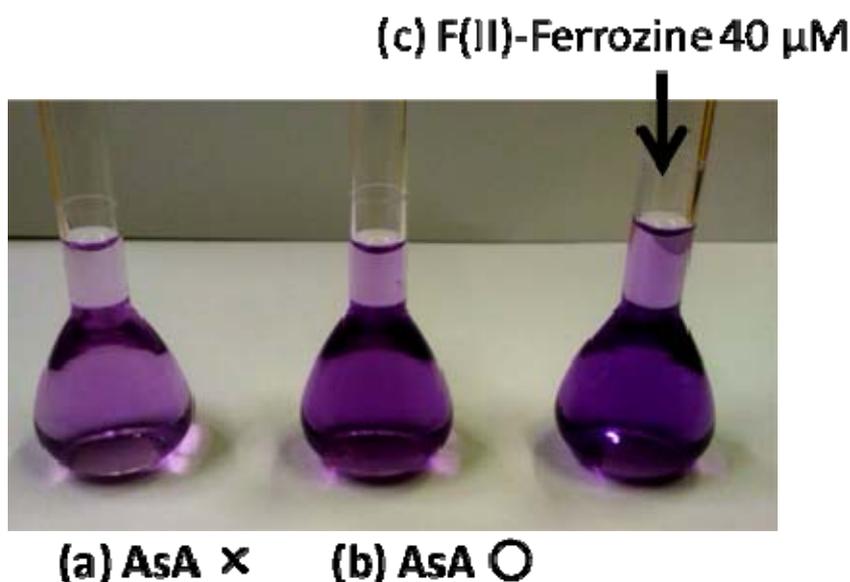


図 4.2.2-6 Fe(II)-FZ 錯体の発色に及ぼすアスコルビン酸(AsA)の影響

アスコルビン酸を加えた場合、危惧されることは Fe(II)とアスコルビン酸が錯形成し、反応(16)および(17)の速度に大きな影響を及ぼすことである。しかし、アスコルビン酸と Fe(II)との錯体の生成定数($\log K_b$)は-1.16 ~ -2.11 と、Fe(II)-SWEOM の値(5.5)に比べたら遙かに低いため、反応(16)および(17)に及ぼす影響は無視されうるほど小さいと考えられる。

反応(16)は非常に速く、反応(17)は比較的遅いことが知られている。これらの反応速度差を図示すると図 4.2.2-7 のようになる。

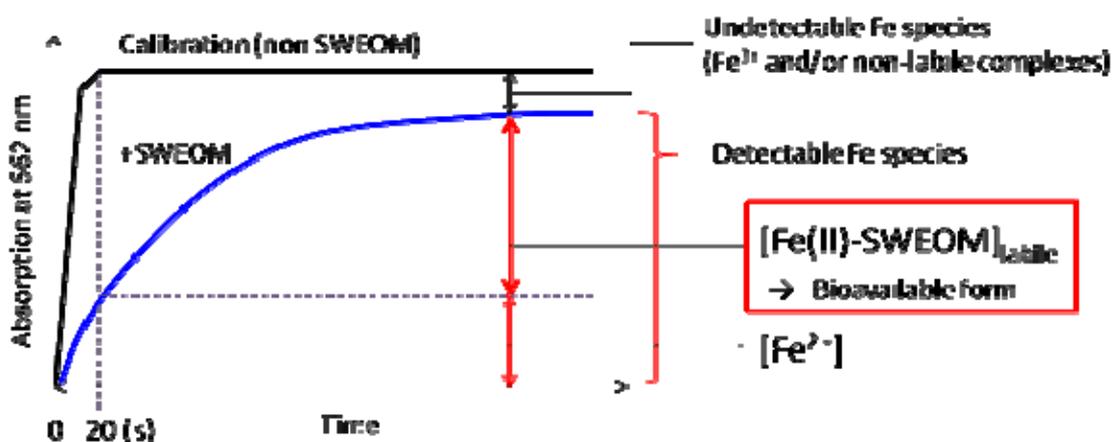


図 4.2.2-7 SWEOM の共存下、非共存下に於ける Fe(II)-FZ 錯体の生成量の時間変化

SWEOM が共存しない場合、Fe(II)-FZ 錯体の生成(562 nm における吸光度がその量に相当)は、20 s で一定になる。したがって、FZ を加えてから反応(16)が平衡に達するには 20 s かかると言える。一方、SWEOM と Fe(II)の混合している溶液系では、Fe(II)-SWEOM 錯体と非錯形成の Fe(II)が溶存している。ここで、反応(16)が平衡に達する 20 s までは、遊離の Fe(II)と FZ の錯形成による発色が観測され、それ以降、吸光度が一定になるまで FZ と交換可能な Fe(II)-SWEOM_{labile} 化学種の解離に伴う Fe(II)-FZ による発色が、反応(17)のように観測されると考えた。反応(16)による吸光度の最大値は、全 Fe(II)の濃度に相当する。しかし、SWEOM が共存する場合、吸光度は必ずしも SWEOM が共存しない場合と一致することではなく、それより低い値で一定となった。この差分は、主として解離不活性な Fe(II)-SWEOM 錯体の濃度に相当すると考えた。

任意の Fe(II)濃度で SWEOM が共存するとき、遊離の Fe(II)は 20 s 後の吸光度で測定することができ、図 4.2.2-7 で一定になる吸光度と 20 s の吸光度の差が解離活性の錯体化学種 Fe(II)-SWEOM_{labile} の濃度に相当する。したがって、溶液中の全 Fe(II)濃度を種々変化させ、

各々について遊離の Fe(II) 濃度([Fe²⁺])と Fe(II)-SWEOM_{labile} の濃度([Fe(II)-SWEOM]_{labile})を測定すると図 4.2.2-8 に示したような関係が得られる。

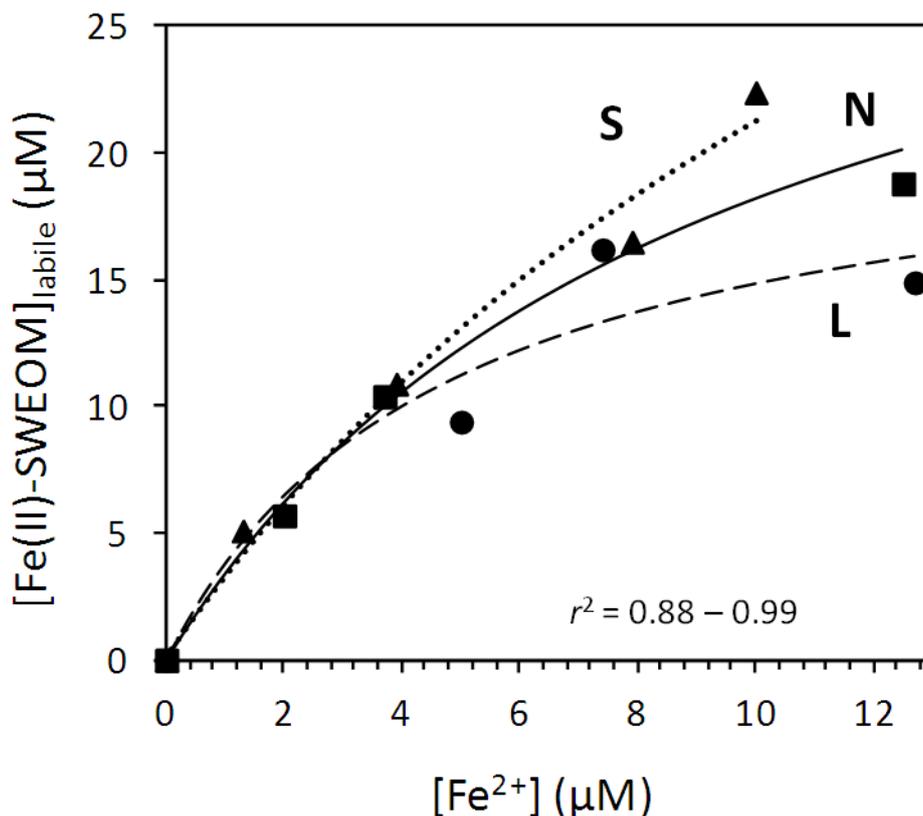


図 4.2.2-8 [Fe²⁺]と[Fe(II)-SWEOM]_{labile}の関係

この関係は、従来のラングミュア型錯形成の理論に基づき以下のような式で解析できる。

$$\Sigma [Fe(II) - L_i] = \frac{C_L K_b [Fe^{2+}]}{1 + K_b [Fe^{2+}]} \quad (18)$$

$$N = \frac{C_L}{[HS] \times \%C / 100} \quad (19)$$

ここで、 C_L , K_b , N は、それぞれ、配位子の総濃度、解離活性錯体の条件生成定数、そして解離活性錯体の生成に対する錯化容量を示している。式(18)の図 4.2.2-8 に示したプロットへの非線形最小二乗近似により、 C_L および K_b を求めることができた(フィッティングカーブが図 4.2.2-8 に示されている)。得られた C_L を式(19)へ代入することにより、 N の値を計算した。得

られた K_b および N の値を表 4.2.2-6 に示す。

表 4.2.2-6 海水条件における N, L, S 分画の K_b および N

SWEOM	Complexation	
	$\log K_b$	N ($\mu \text{ mol g}^{-1}$ of C)
N	5.11	282
L	5.33	202
S	4.77	520

海水条件において、N および L の錯生成定数は S の場合に比べ若干高いが、錯化容量は S 分画の方が N や L 分画に比べ明らかに大きい値となった。この結果は、SWEOM の中でも分子量の低い S 分画の方が、分子量の高い N や L 分画に比べ解離活性な錯体を生成しやすく、生物利用性が高くなることを示唆している。

(4) まとめ

海水抽出性有機物 (SWEOM) は、高分子サイズ (> 100 kDa) の分画と低分子サイズ (< 0.5 kDa) の 2 分画で占められており、その間の分子量の存在量は極めて低かった。元素分析および FT-IT や ^{13}C NMR のような分光学的測定結果から、高分子分画は脂肪族性に富み低分子分画は芳香属性に富むことが分かった。さらに、低分子量分画の酸性官能基含有量は、高分子分画に比べ遙かに高く親水性に富むことが分かった。また、抗酸化剤としてアスコルビン酸を添加することにより、フェロジン発色試薬との配位子交換反応速度差を利用することにより、海水条件下における解離可能な Fe(II)-SWEOM 錯体の濃度 ($[\text{Fe(II)-SWEOM}]_{\text{labile}}$) の測定を可能にした。この測定により、Fe(II)-SWEOM_{labile} の錯形成能を評価し、低分子量分画の錯化容量が大きいことを明らかにした。ゆえに、低分子量分画と鉄との錯体の生物利用性が高く、コンブの生長に影響するキレートとして貢献すると予測できる。

4. 2. 3 海水溶存有機物と鉄(II)との錯体の生物利用性

(1) はじめに

前節において、SWEOM の低分子分画の鉄(II)錯体は解離活性であるため、生物利用性が高いことが示唆された。図 4.2.3-1 にコンブ(*Laminaria Japonica*)の生活環を示す。このサイクルの中で、雌雄配偶体の成熟に鉄(II)が関与していることが知られている。配偶体の生育は通常顕微鏡により観察できるが、雌性配偶体の場合、成熟すると卵原細胞を形成するので判別しやすい。これまで、鉄(II)の配偶体成熟に及ぼす影響は、鉄(II)を EDTA キレートとして添加し行われてきた。本実験では、鉄(II)を SWEOM との錯体として添加し、雌性配偶体の成熟に及ぼす影響を顕微鏡観察により評価した。

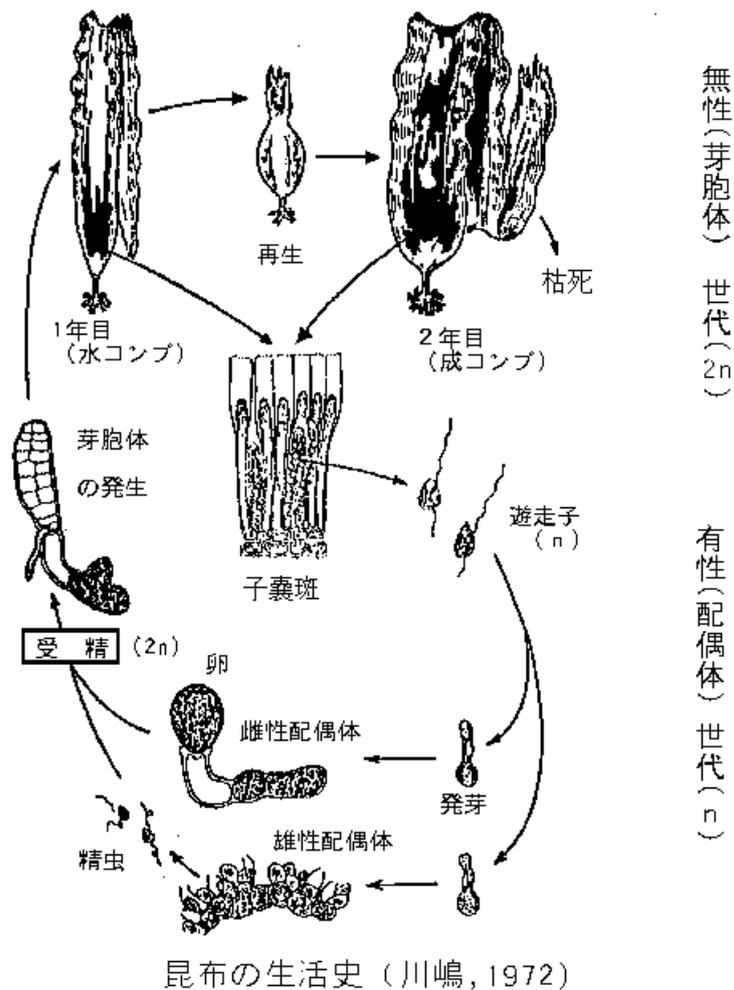


図 4.2.3-1 コンブの生活環

(2) 方法

雌性配偶体の培養は、10 °C、光量 20 $\mu\text{E m}^{-1} \text{s}^{-1}$ 、明 14 h / 暗 10 h の条件で 14 日間培養した。培養にはオートクレーブで滅菌した ASP₁₂ 培地を用いた。ASP₁₂ 培地の組成を表 4.2.3-1 に示す。表中の黄色でマークした EDTA と鉄(II)については、加えた場合と加えない場合について検討を行った。鉄(II)を添加したときには、その濃度が 1 μM になるよう添加した。14 日間インキュベータで培養後、雌性配偶体の卵原細胞の有無を倒立顕微鏡で観察することにより配偶体の成熟の有無を評価した。

表 4.2.3-1 ASP₁₂ 培地の組成

ASP ₁₂ 培地人工海水			PII 金属混液			S2 金属混液		
添加剤	量	単位	添加剤	量	単位	添加剤	量	単位
蒸留水	1	L	蒸留水	1	L	蒸留水	1	L
NaCl	28	g	Na ₂ -EDTA	1	g	Na ₂ MoO ₄	50	mg
MgSO ₄ ·7H ₂ O	7	g	FeCl ₂	10	mg	KBr	1	g
MgCl ₂ ·6H ₂ O	4	g	H ₃ BO ₃	200	mg	SrCl ₂	200	mg
KCl	0.7	g	MnCl ₂	40	mg	RbCl	20	mg
CaCl ₂	400	mg	ZnCl ₂	5	mg	LiCl	20	mg
Na ₂ SiO ₃ ·9H ₂ O	150	mg	CoCl ₂	1	mg	I	1	mg
ビタミン B12	0.2	μg						
ビオチン	1	μg						
チアミン	100	μg						
PII 金属混液	10	mL						
S2 金属混液	10	mL						
Tris	1	g						

(3) 研究の成果

(3)-1 EDTA キレートによる雌性配偶体の観察結果

図 4.2.3-2 上段に EDTA をキレート剤として 28 μM 添加して、Fe(II)を 1 μM 共存させた場合とさせない場合における雌性配偶体の顕微鏡写真を示す。EDTA 共存下でも Fe(II)が共存しなければ卵原細胞は見られなかった。しかし、EDTA 鉄を共存させると明らかに卵原細胞を確認することができた。一方、下段にキレート剤無しで鉄(II)を添加した場合としない場合の雌性配偶体の顕微鏡写真を示す。キレート剤が共存しないと鉄(II)が含まれていても配偶体は成熟しないことが明らかとなった。また、鉄(II)が共存するときにはコロイドのような沈殿が配偶体に付着しているのが確認され、これら水酸化コロイドの生物利用性の低さが示唆された。以上の結果から、鉄(II)はキレート剤により溶存状態に保たれていなければコンブの生育に対して利用され得ないことがわかった。

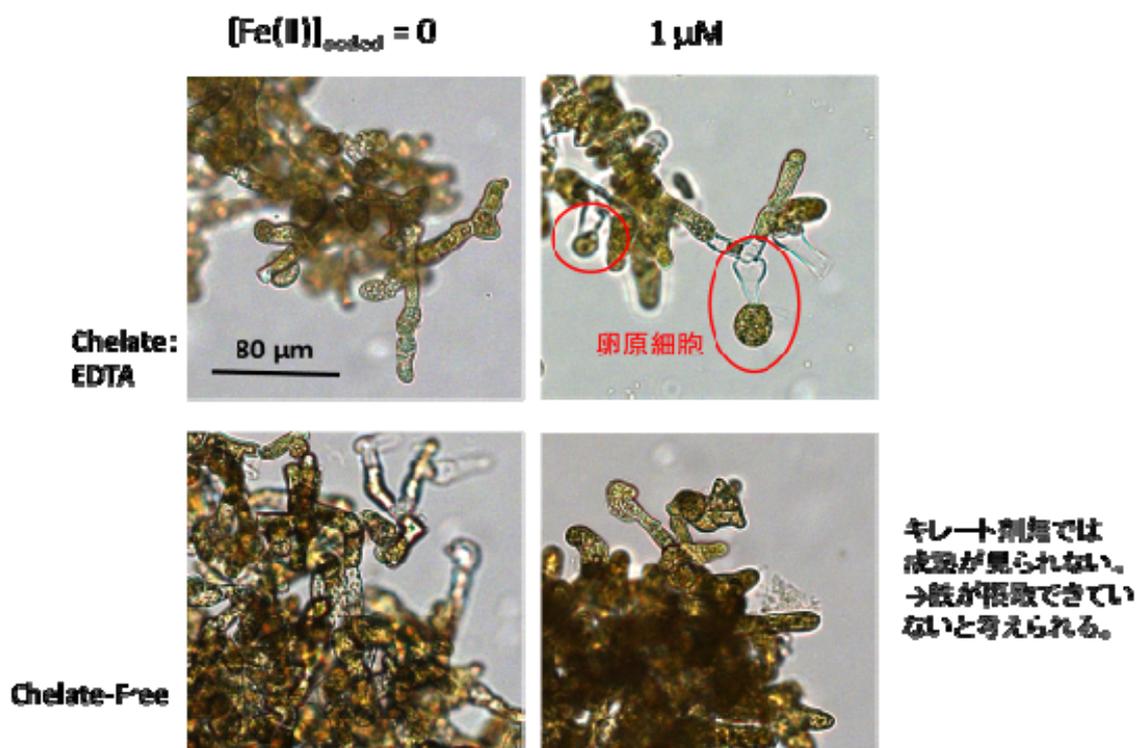


図 4.2.3-2 鉄(II)-EDTA 錯体共存下および非共存下で二週間培養した雌性配偶体の顕微鏡観察

(3)-2 キレート剤として SWEOM 分子量分画を用いた培養試験

図 4.2.3-3 に SWEOM の N 分画と S 分画を EDTA に替わるキレート剤として添加し、鉄(II)を添加した場合としない場合に対して培養した配偶体の顕微鏡観察結果を示す。いずれも場合も、鉄(II)が共存しない場合には配偶体の成熟が観測されなかった。N 分画を添加した場合、鉄を共存させると卵原細胞らしきものが見られるが判別が困難であった(図 4.2.3-3, 赤色点線)。しかし、S 分画をキレート剤として用い鉄(II)を添加すると明らかな卵原細胞の出現を観測することができた(図 4.2.3-3, 赤色実線)。

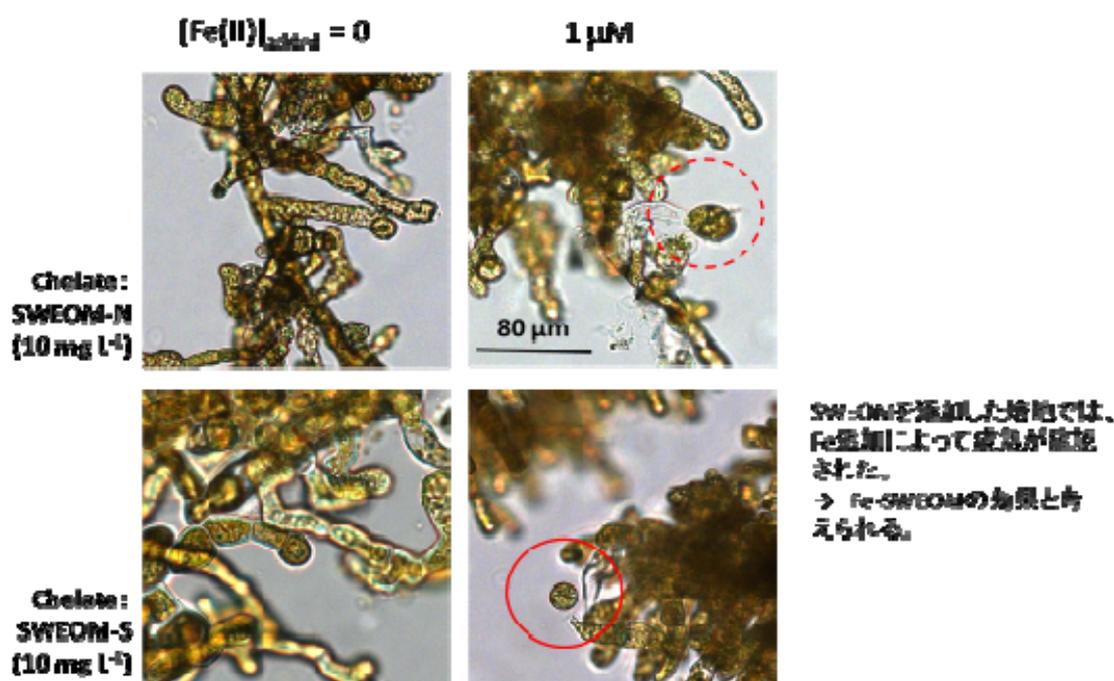


図 4.2.3-3 鉄(II)共存下でキレート剤として SWEOM の N 分画(上段)あるいは S 分画(下段)を添加し二週間培養した雌性配偶体の顕微鏡観察

(4) まとめ

SWEOM の S 分画と鉄(II) を添加したとき、コンブの雌性配偶体の成熟が確認された。この結果は、コンブの生育に利用される鉄(II)のキレート剤として S 分画 (すなわち SWEOM における分子量 500 Da 以下の分画) が有用であることを示している。以上の結果から、SWEOM と鉄(II)との錯体はコンブの生育に対する利用性があることが実証され、この結果は 4.2.2 節で検討した labile な錯体の錯化容量の傾向とよく一致した。

4. 2. 4 埋設ユニットにおける腐植酸の構造変化

(1) はじめに

本研究では、磯焼け海域(北海道増毛町)の植生復元を目的として、鉄(FeO 、 Fe_2O_3)を含む転炉系製鋼スラグと DOM を含む堆肥の混合物をヤシ繊維の袋に詰めた「施肥ユニット」を海中に埋設し、磯焼け沿岸海域への溶存鉄(Fe - DOM 錯体)の供給を図る技術の開発を目指している。我々が行ってきたこれまでの実証海域に於ける試験から、ユニット埋設後の海域において溶存鉄濃度は増加し藻場の再生も確認できた。しかしながら、溶存鉄濃度の増加と藻場再生との因果関係および溶存鉄が長期に渡り供給され続けるメカニズムは明らかにされていない。ユニットによる施肥期間中に、製鋼スラグ、海水および微生物などとの相互作用により、堆肥中の DOM の化学組成が変化・変質すると考えられる。このような、DOM の構造変化は Fe に対する親和性も大きな影響を及ぼすと考えられる。よって、施肥期間における DOM の構造変化を知ることは、長期的・安定的に Fe 磯焼け海域に供給されるメカニズムを解明する上で重要であるが、これに関する検討例は報告されていない。

また、沿岸域の DOM の研究については HA に関する研究がされてきた。FA はいずれの pH に対しても易溶であるため、ユニット中からすぐに流出してしまうと考えられ堆肥効果の持続性に寄与するとは言い難い。また、HA は FA や小さな有機酸の前駆体と考えられ、施肥期間中に微生物作用や加水分解を受け、そのような小さな分子へ変遷していくと考えられる(Tan, 2003)。さらに、FA に比べれば HA は収量が多いため(HA/FA、0.32.6)、実験研究における構造解析が行いやすい利点を有する。そこで、本年度は施肥期間におけるユニット中の HA の化学組成変化に及ぼすスラグの影響について検討した。本研究では、磯焼け海域である舎熊海岸(北海道増毛町)に設置した試験水槽に混合比を変化させた転炉系製鋼スラグ堆肥施肥ユニットを6ヶ月間埋設し、ユニット中の HA の量的変化を収量測定および TOC 測定、構造変化を元素分析、分子量測定、および熱分解 GC/MS(Py-GC/MS)により追跡した。

(2)方法

(2)-1 水槽試験

屋外水槽は増毛漁協協同組合、(株)北海道オーシャングリーン開発および新日本製鐵(株)の協力のもと、磯焼け海域である北海道増毛町に設置した(図 4.2.4-1)。水槽寸法は上部寸法：700 × 900 mm、下部寸法：600 × 800 mm、高さ：550 mm、水槽容量：300 L であり、海水容量は 200 L とした。海水は、海からポンプで導入された海水をタンク上部から海水流入量 4.1

$L \text{ min}^{-1}$ でかけ流した。また、流出口はタンク下部に装着されており、垂れ流しの状態とした。

スラガー堆肥施肥ユニットは水槽に投入する直前に作製した。スラグと堆肥を表 4.2.4-1 に示す体積比で混合し、3 個の木綿袋に入れた。なお、体積はスラグ 1.5kg を基準体積 V とした。 V における堆肥重量は約 430 g である。同一混合比の施肥ユニット 3 個を 1 つの水槽に埋設した。試験期間は 2009 年 10 月～2010 年 3 月の計 6 ヶ月間である。



図 4.2.4-1 試験水槽

表 4.2.4-1 堆肥とスラグの混合割合

堆肥 : 製鋼スラグ = 1 : 0	(C1/S0)
堆肥 : 製鋼スラグ = 0.75 : 0.25	(C3/S1)
堆肥 : 製鋼スラグ = 0.5 : 0.5	(C1/S1)

(2)-2 HA の抽出・精製法

施肥ユニットは、北海道オーシャングリーン開発(株)が任意期間(2、4、6 ヶ月) 毎に、各水槽から 1 個ずつ回収した。回収したユニットは研究室に送られ実験室内で冷凍保存(-35°C)した。これらの試料を凍結乾燥機(EYELAFDU-1200 型、東京理化) にて完全脱水し、2 mm フルイを通過させ、乾燥土壌試料を得た。

300 mL ポリエチレン三角フラスコに乾燥試料 10 g を秤量し、超純水約 50 g および 1M NaOH 5 mL を加えた後、超純水で 100 g に定容した。よって、本実験における HS は 0.05M NaOH 溶液で抽出されたこととなる。窒素雰囲気下で旋回型振盪機(MMS-51 型、東京理化) に設置し、24 時間振盪した(160 rpm、室温、暗所)。24 時間後、マイクロ冷却遠心機(3740 型、KUBOTA)で遠心分離(1000 0rpm、15 min、5°C)し、その上澄み液を定量分析濾紙(5A、ADVANTEC)により吸引濾過した。この濾液は HS と non-HS を含む溶液である。次に、HS から HA と(FA + non-HS)を分離する作業を行なった。濾液(HS + non-HS)に濃塩酸を加えて pH 調整(pH<1)した後、24 時間攪拌した(室温、暗所)。24 時間後、スラリーを遠心分離(10000 rpm、15 min、5°C)し、上澄み液をガラスフィルター(0.5 µm、ADVANTEC)により吸引濾過した。遠心分離による沈殿物は HA であり、濾液は FA と non-HS を含んだ溶液である。次に HA の精製を行った。沈殿した HA を超純水により回収した後、鉍物類を脱塩するためにフッ化水素酸(6%、v/v)および濃塩酸(4%、v/v)を加え、24 時間攪拌した(室温、暗所)。24 時間後、遠心分離(10000 rpm、15 min、5°C)により再び沈殿物として HA を分離した。沈殿した HA を超純水により回収し、透析膜(nominal molecular weight cut-off 1000 Da、SpectraPore)に入れ、蒸留水入りの 3 L ビーカーに吊るした。ビーカー内の蒸留水の導電率は毎日測定し、蒸留水を新しく交換した。ビーカー内の蒸留水の導電率(約 1.2 µS) が変化しなくなった時(約 6 日後)、超純水に切り替えた。透析は超純水の導電率(約 0.8 µS)が変化しなくなった時終了した。透析終了後、凍結乾燥機にて凍結乾燥させ、HA 粉末試料を得た。HA 粉末試料は試料の代表性による誤差を低減するため、瑪瑙乳鉢を用いて粉碎・混合した。HA 粉末試料は、室温・暗室のもと保存した。

一方、乾燥土壌試料(約 10 g)に含まれる HA 量(以下、収量) を測定した。収量を測定することで、HA の分解過程を半定量的に観察することができるとされる。本研究では、HA を凍結乾燥する前に透析膜の中身を移す容器の空重量を秤量・記録し、凍結乾燥後 HA 入りの容器を秤量した。凍結乾燥前後の重量を差し引きすることで、HA の収量を測定した。

(2)-3 HA の分析

元素組成および分子量は、4.2.1 節の方法に従い分析した。

熱分解ガスクロマトグラフィー/質量分析(Pyrolysis Gas Chromatography Mass Spectrometry, py-GC/MS)は、有機分子に関する詳細な構造情報を得る上で有用であることが知られている。この方法は、有機化合物を構成する各種構造部位を熱分解によって断片化し、ガスクロマトグラフィーで分離して、質量分析で検出・同定する方法である。しかしながら、HA はフェノール水酸基やカルボン酸などの揮発性が乏しい極性化合物を多く含むため、それらを検出するのが難しい。この問題を克服するため、熱分解により生成した極性構造断片を揮発性のあるメチル化合物に変換する目的でオンラインメチル化剤である水酸化テトラメチルアンモニウム(Tetramethylammonium Hydroxide, TMAH)が使用される。メチル化誘導剤のさらなる利点は、HA ポリマーを形成するエーテル結合やエステル結合をオンラインで熱加水分解後 GC/MS へ導入することであり、検出された構造断片から元の構造を推定することができる。特に、HA の腐植化・堆肥化などの続成変化を追跡するのに有用である。よって、本研究では TMAH-Py-GC/MS の分析手法を用いた。

TMAH 溶液は、TMHA 粉末 400 mg を 10 mL メスフラスコを用いてメタノール(ダイオキシン分析用試薬、ナカライ)で定容した。内部標準液のノナデカン酸溶液は、ノナデカン酸粉末 3 mg を 50 mL メスフラスコを用いて、アセトン/メタノール混合溶液(30/20, v/v)で定容した。HA 約 0.5 mg を試料カップ(50 μ L)に秤量し、TMAH 溶液 25 μ L とノナデカン酸溶液 10 μ L をマイクロピペットで加え、デシゲータ内で 1 時間減圧乾燥させた。測定は、熱分解装置(PY-2020D 型、FRONTIER LAB)と GC/MS システム(GCMS-QP5050A 型、島津製作所)の複合機により測定した。

GC/MS の測定条件は、注入口温度：280 $^{\circ}$ C、検出器温度：280 $^{\circ}$ C、カラム：QUADREX 100% methyl siloxane capillary column 0.25 mm ϕ 25 m、膜厚 0.25 μ m)、温度勾配：50 $^{\circ}$ C (1 min) \rightarrow 5($^{\circ}$ C min $^{-1}$) \rightarrow 300 $^{\circ}$ C(5 min)、測定時間：55 min、キャリアガス：高純度ヘリウムガス、である。熱分解装置の測定条件は、測定モード：シングルショットモード、熱分解温度：550 $^{\circ}$ C、熱分解時間：0.4 min、である。測定後は、質量スペクトルデータベース(National Institute of Standard and Technology、NIST)を用いて質量分析によるピークの帰属を行なった。

(3) 研究の成果

(3)-1 HA の収量変化

各ユニットから抽出された HA の収量の変化を図 4.2.4-2 に示す。0 ヶ月から 2 ヶ月の期間に各ユニット中の HA 収量は著しく低下した。この結果は、ユニットを弱アルカリ性 (pH8.1) および移動性が高いといった性質を持つ海水環境に投入したため、ユニット中の堆肥由来の HA など腐植成分が早く溶出および溶脱したと考えられる。また、海水に投与したことで HA が加水分解を受けたため、HA の収量が低下したとも推察できる。

また、0~2 ヶ月間でスラグ入りユニット(C1/S1、C3/S1)とスラグ無しユニット(C1/S0)の HA 収量を比較すると、スラグ入りユニットは 8 倍程収量が低いことがわかった。さらに、C1/S1 および C3/S1 の場合は収量低下が 2 ヶ月目で終了しているのに対して、C1/S0 の場合は収量の低下が 4 ヶ月目まで続いていた。海水 (pH8.3) に堆肥および混合物(スラグ+堆肥)を入れた時、その溶出水の pH はそれぞれ約 7.5、8.5-9.0 になることが報告されている。よって、投入初期はスラグ入りユニットの内部はスラグ無しユニットと比較して pH が高いため HA の溶出が促進しやすい環境にあり、HA の収量が低下したと推察できる。つまり、投入初期期間(0-2 ヶ月)では、海水の影響によりユニット内の堆肥由来 HA は溶出・溶脱され、さらにスラグが混入することで溶出が促進されると考えられる。

一方、2~6 ヶ月間では各ユニットともに収量の増加が観察された。特に、4 ヶ月目では C1/S1 および C3/S1 は C1/S0 と比較して収量が増加した。一般的に腐植化が進行すると HA の収量は減少する傾向を示すが、HA の腐植化が初期段階であるならば動植物遺骸等の化合物の縮重合により収量は増加すると考えられる。よって、ユニット内では新しい HA の生成が進行し、さらにスラグが混入していることで早期に HA の生成が生じることが示唆された。しかし、現段階では HA の腐植化に起因する成分が堆肥由来や水生微生物由来であるかはわからない。以上のことから、投入初期期間(0-2 ヶ月間)では HA 収量の著しい低下から、ユニット中の堆肥由来 HA が海水による溶出・溶脱が進行し、さらにスラグが混入することで溶出が促進されることが考えられた。溶出後は、各ユニットで HA の収量増加が観察できたことから、ユニット内で HA の生成が進行していると示唆された。

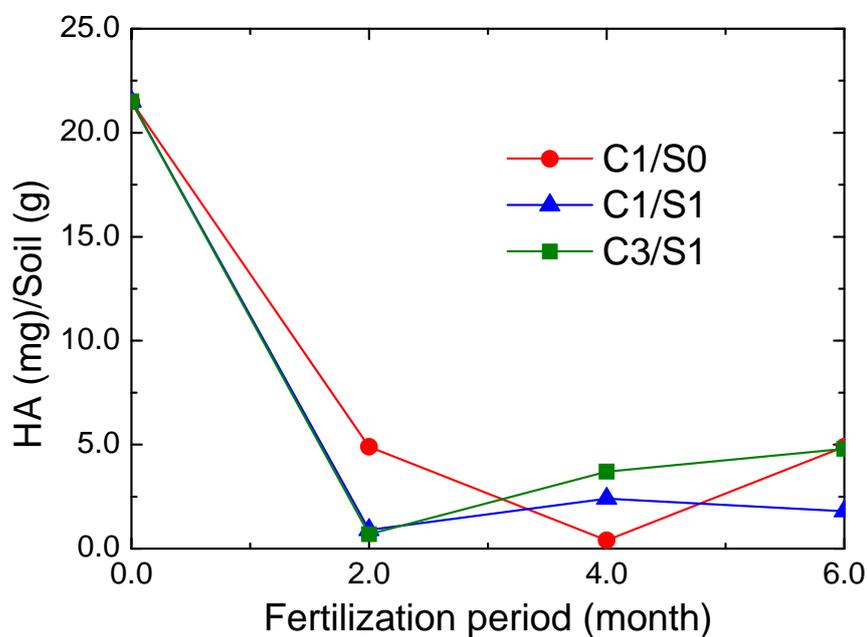


図 4.2.4-1 各ユニットに於ける HA の収量変化

(3)-2 HA の元素組成変化

各ユニットから抽出された HA の有機元素組成を表 4.2.4-2 に示す。また、元素組成は重量%よりもモル比として表現し比較したほうが、顕著に差が現れることが多いとされる。モル比は、例えば、H/C モル比を算出する際には $(\%H/1.01) / (\%C/12.01)$ で算出される。しかしながら、これらのモル比は一種のサポートデータであるため、モル比のみで HA の構造の変化や違いを表す指標とはならないことに注意する。

表 4.2.4-2 各 HA 試料の元素組成

HA samples	Fertilization period (month)	Elemental composition (wt%)						Molar ratio			
		%C	%H	%N	%S	%O	%Ash	H/C	N/C	O/C	S/C
C1/S0	0	49.23	4.66	3.38	1.08	41.41	0.25	1.13	0.06	0.63	0.008
	2	44.11	3.68	2.80	1.10	48.16	0.15	1.00	0.05	0.82	0.009
	4	45.81	5.61	5.82	1.81	40.95	n.d.	1.47	0.11	0.67	0.015
	6	50.11	4.78	4.00	1.14	39.25	0.72	1.14	0.07	0.59	0.009
C1/S1	0	49.23	4.66	3.38	1.08	41.41	0.25	1.13	0.06	0.63	0.008
	2	36.78	3.24	3.75	0.97	55.26	n.d.	1.06	0.09	1.13	0.010
	4	50.77	5.45	4.27	3.98	34.81	0.72	1.29	0.07	0.51	0.029
	6	21.50	2.67	3.47	39.79	32.57	n.d.	1.49	0.14	1.14	0.693
C3/S1	0	49.23	4.66	3.38	1.08	41.41	0.25	1.13	0.06	0.63	0.008
	2	38.33	4.01	3.80	5.99	47.87	n.d.	1.25	0.08	0.94	0.059
	4	49.89	5.25	4.41	3.15	37.18	0.12	1.26	0.08	0.56	0.024
	6	48.67	5.59	4.14	6.52	35.08	n.d.	1.38	0.07	0.54	0.050

施肥期間における HA の H/C を図 4.2.4-2 に示す。各 HA の H/C は投入初期(0~2 ヶ月)において一時減少するが、全体的に施肥期間の増加に伴い H/C が増加する傾向が見られた。これらの傾向は %H のみでも確認できる。また、スラグ有無による顕著な差異は見られなかったが、6 ヶ月目の C1/S0 で H/C の大きな減少が見られた。一般的に、腐植化の進行に伴い H/C は増加するとされる。例えば、植物残渣に含まれるフルクトースなどの糖類が脱水縮合反応で芳香族化した場合に水素が減り、不飽和炭素の割合が増加するため H/C が減少するとされる。また、リグニンフェノール由来のメトキシル基および脂肪族成分の分解に伴って脱メチル化や脱メタン化により、相対的に H が減少するので H/C は減少するとされる。対して、H/C の増加は脂肪族成分の蓄積が起因するという報告があり、特に海洋堆積物は藻類の脂肪族成分が見られる。今回の結果では、H/C が施肥期間に伴って増加したことから、HA に堆肥由来や水生微生物由来の脂肪族成分が蓄積されていることが示唆される。

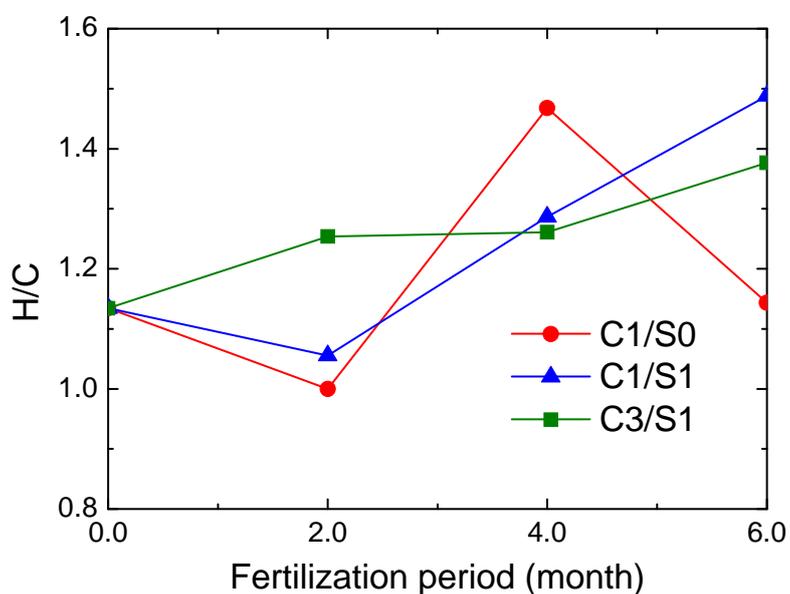


図 4.2.4-2 H/C モル比の経時変化

施肥期間における HA の O/C を図 4.2.4-3 に示す。全体的に各 HA の O/C は 2 ヶ月目で著しく増加し、4 ヶ月目で急激に減少するという傾向を示した。特に、C1/S1 および C3/S1 は O/C の増減が大きい。このことは、%O のみでも同様な結果である。これはスラグが混入したことによる効果だと推察される。しかし、C1/S1 のみ 6 ヶ月目で著しい増加が見られた。この O/C の急激な増加は %C が著しく低下したため、相対的に O/C が増加したのだと考えられる。一般的に、腐植化の増加に伴い O/C は増加するとされる。例えば、酸化反応ではカルボキシル基などの酸素含有官能基量の増加するため O/C は増加するとされる。また、O/C の増加は植物残渣に含まれる糖類を多く含有するためだともいわれている。反対に、嫌気的環境ではタンパク質由来アミノ酸の脱アミノ化に伴う脱炭酸および多糖類の脱炭酸によって O/C の減少が減少するとされる。そして、海水堆積環境における HA は嫌気的環境のため O/C が小さいという報告がある。このようなことから、投入初期(0-2 ヶ月間)における O/C の増加は酸性官能基や植物由来多糖類の増加であり、2-6 ヶ月間における O/C の減少は嫌気的寄与によるものと考えられる。しかしながら、O/C はカルボキシル基、アルコール水酸基、メトキシル基およびフェノール性水酸基といった多様な成分に影響されるため、現段階では O/C がなにに起因しているかは明確でない。

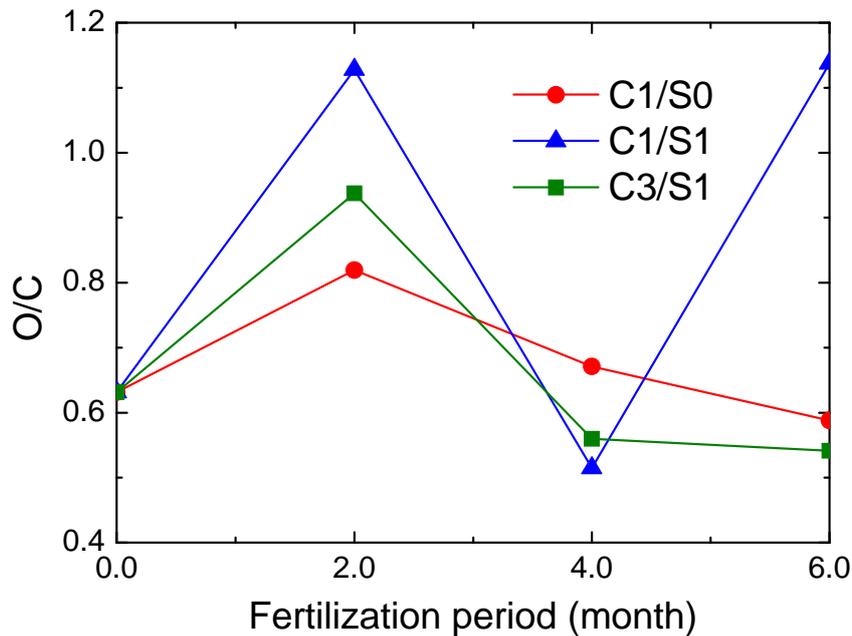


図 4.2.4-3 O/C モル比の経時変化

施肥期間における HA の N/C を図 4.2.4-4 に示す。C1/S1 および C3/S1 の N/C は投入初期 (0 ~ 2 ヶ月) に増加し 4 ヶ月目では低下しており、C1/S0 の N/C の増減サイクルと異なっていることがわかった。このことは、%N のみでも確認される。また、6 ヶ月目における C1/S0 の N/C が急激に増加していることがわかった。この N/C の急激な増加は %C が著しく低下したため、相対的に N/C が増加したのだと考えられる。腐植化の初期段階では動植物由来アミノ酸が HA に取り込まれるため窒素含有量は多いが、腐植化の進行と共に脱窒素反応により減少するとされる。植物残渣という点で推察すると、C1/S1 および C3/S1 の O/C と N/C は 0-2 ヶ月目で両者ともに増加した。よって、堆肥由来の植物残渣であるセルロース、リグニンおよびそれらに付随するタンパク質が HA に取り込まれたことが推察される。

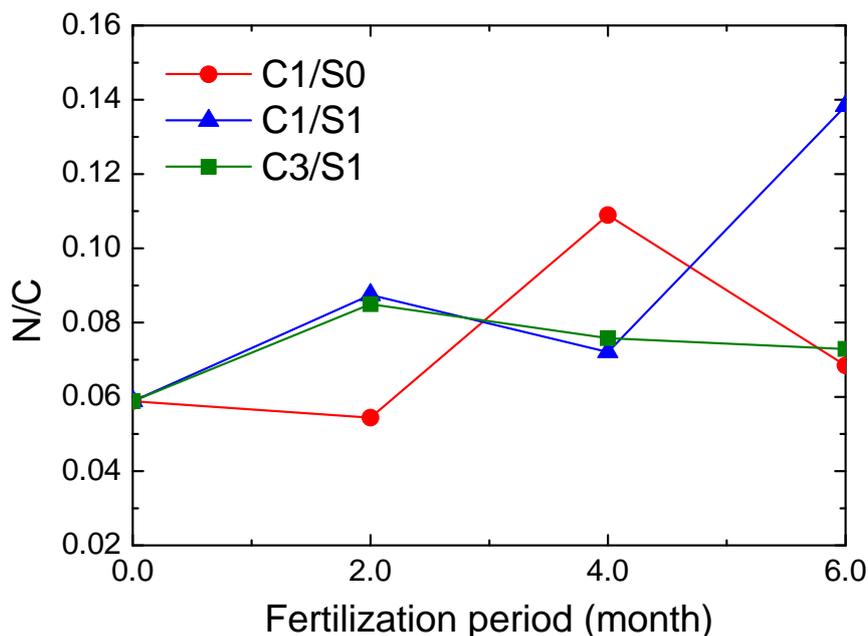


図 4.2.4-4 N/C モル比の経時変化

施肥期間における HA の S/C を図 4.2.4-5 に示す。C1/S1 および C3/S1 は C1/S0 と比較して、全体的に S/C が大きいことがわかった。特に、6 ヶ月目における C1/S0 の %S は 39% であり、とても大きな数値を示すことがわかった。また、C3/S1 の %S は 6.% 程であった。このことから、スラグが混入したことで S 含有量が増加する結果が得られた。通常、HA の %S は約 1-2% であり堆積環境でも約 8% ほどである。主に、S が多い理由としては、嫌気的環境において硫酸イオン (SO_4^{2-}) が硫酸還元菌によって還元され、それによって生じた硫黄化合物(有機硫黄、硫化水素、元素硫黄およびポリスルフィド) が HA に取り込まれるからだとされる。一方、硫酸還元菌が生成する硫化水素は海水中の Fe(II) と反応して黒色の硫化鉄 (FeS) を生じる。今回使用したスラグには約 20wt% の鉄分が含まれているため、通常よりも硫化鉄または二硫化鉄 (FeS₂、パイライト) が形成しやすい環境と考えられる。この一連の反応過程で生成される硫化水素、硫化鉄およびパイライトが還元剤として機能し、還元環境に貢献していると考えられる。実際に、本実験でもスラグを使用した C1/S1 および C3/S1 のユニット内部は黒色であったことは目視している。さらに、硫酸還元菌は硫酸イオンを多く含む海水や pH6-8 の環境を好み、堆積物表面(5 mm - 数 cm)でも生息している。このことは、本実験で試験水槽に施肥ユニットが投入された環境と類似しているため、硫酸還元菌が生息している可能性は高い。よって、スラグ入りユニットの HA の S 含有量が多いのは硫酸還元菌による寄与だと考えられる。

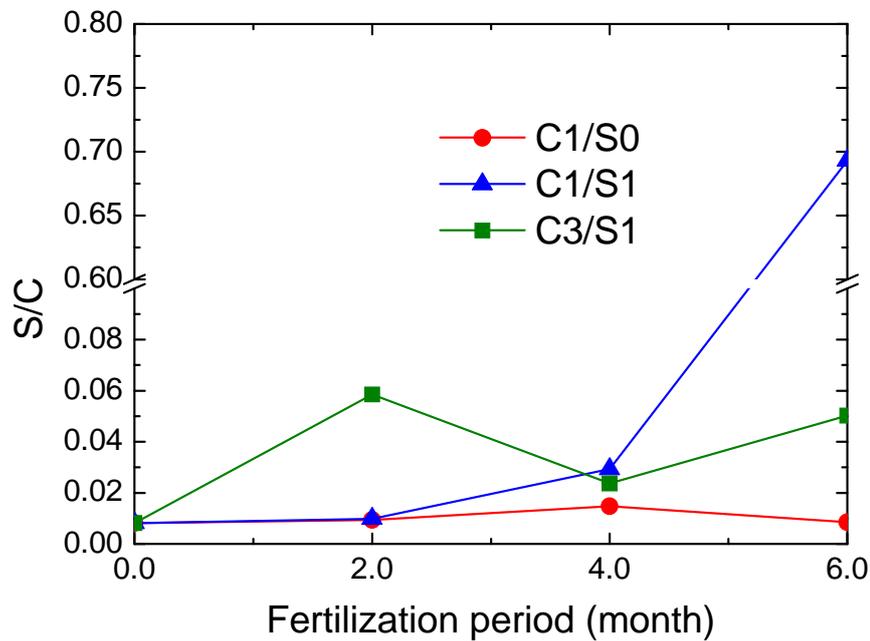


図 4.2.4-5 N/C モル比の経時変化

(3)-3 HA の分子量変化

施肥期間における各ユニットの HA の HPSEC クロマトグラムを図 4.2.4-6 に示す。各 HA のクロマトグラムは施肥期間の変化に伴って、大きく変化することがわかった。一般に、サイズ排除クロマトグラフィーでは保持時間が短いほど分子量は大きくなり、長いほど小さくなる。全体的に各 HA のクロマトグラムは 12.3 min 付近を中心とした 1 つのピークを示すが、13 min 付近にブロードやピークを示すものも存在した。特に、6 ヶ月目での C1/S1 は 12 min ピークより 13 min 付近に大きなピークを示したため、低分子量物質が多く存在していることがわかった。HA のクロマトグラムが多数のピークを示すということは、その HA は多種多様な分子量物質を持っていることを意味する。よって、13 min 付近でピークやブロードが生じる HA は、その腐植化過程で低分子量物質を取り込んでいることが示唆される。これらの結果は、ユニット内で HA が生成および分解が起きていることを意味している。

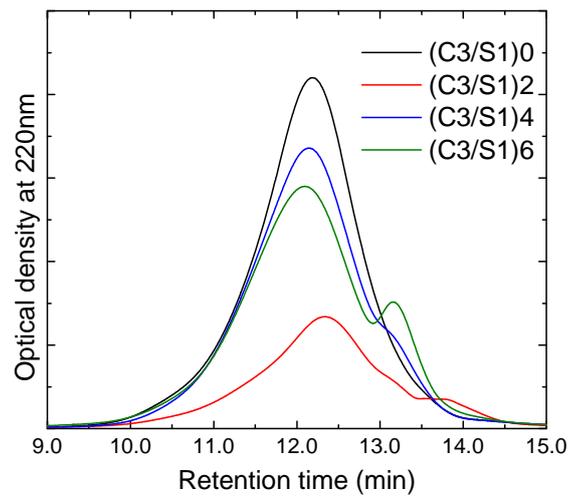
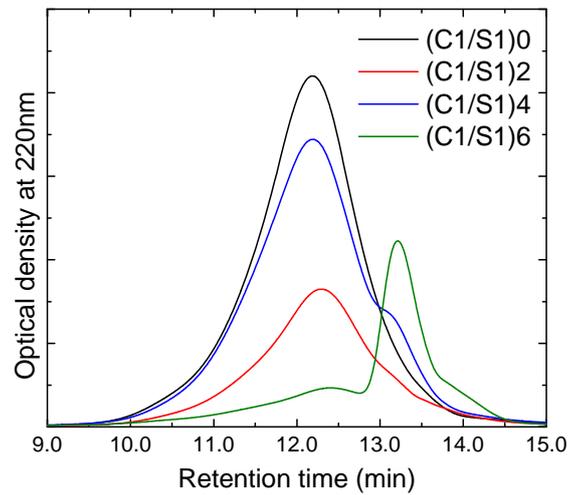
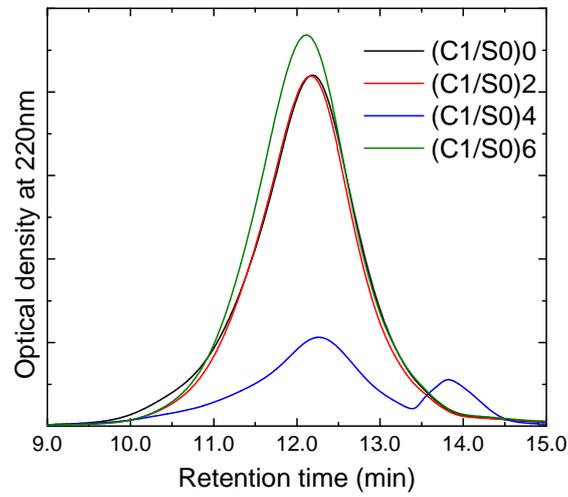


図 4.2.4-6 各堆肥／スラグ混合比に於ける HA の分子量の経時変化

施肥期間における各ユニットの HA の M_n 、 M_w および M_w/M_n を表 4.2.4-3 および図 4.2.4-7 に示す。全体的に、 M_n は増減の変化が大きく、 M_w は変化が小さいことがわかった。しかし、6 ヶ月目の C1/S1 においては、 M_n および M_w は急激に減少した。一般に、 M_n は高分子化合物に含まれる低分子量物質の寄与を敏感にうけ、 M_w は高分子量物質の寄与を受ける。よって、 M_n の増減の大きな変化は HA の低分子量物質の増減の影響を敏感に受けており、 M_w の急激な低下は高分子量物質の消失を意味している。また、 M_n においてスラグ無し HA(C1/S0) が増減する際にはスラグ入り HA(C1/S1、C3/S1) が減増するという傾向を示した。よって、スラグは HA の分子量にも寄与することが考えられる。UV-vis 測定の E_{280} は、堆肥由来リグニンが起因しており、HA の芳香族性、分子量および腐植化の指標となることを前述した。このことから、 E_{280} と M_n の相関関係を調べた結果、強い正の相関性($r^2=0.916$)があることがわかった。リグニンは HA の腐植化生成する上での基本骨格となるため、HA の分子量の増減は堆肥由来リグニンフェノールの縮合・分解による寄与が大きいことが示唆された。

一方、N/C モル比と M_n の相関性を調べた結果、強い負の相関性($r^2=0.901$)を示した。また、微生物由来 FA は N/C が高く、分子量が低いことが報告されている。これは、動植物由来タンパク質の大きな寄与は(N/C が増加する)、 M_n を減少させると推察することができる。よって、HA の分子量を減少させる要因としては、HA の基本骨格であるリグニンの分解だけではなく、微生物による寄与も考えられる。

表 4.2.4-3 各 HA 試料の分子量測定結果

HA samples	Fertilization period (month)	Molecular weight		
		M_n	M_w	M_w/M_n
C1/S0	0	2242 ± 20	10661 ± 41	4.75
	2	2325 ± 26	9863 ± 139	4.24
	4	1036 ± 2	9739 ± 10	9.40
	6	2378 ± 23	10104 ± 132	4.25
C1/S1	0	2242 ± 20	10661 ± 41	4.75
	2	1660 ± 4	9526 ± 2	5.74
	4	1923 ± 9	10563 ± 8	5.49
	6	614 ± 2	4110 ± 19	6.69
C3/S1	0	2242 ± 20	10661 ± 41	4.75
	2	1326 ± 1	9118 ± 11	6.88
	4	2121 ± 3	11049 ± 8	5.21
	6	1778 ± 1	11170 ± 3	6.28

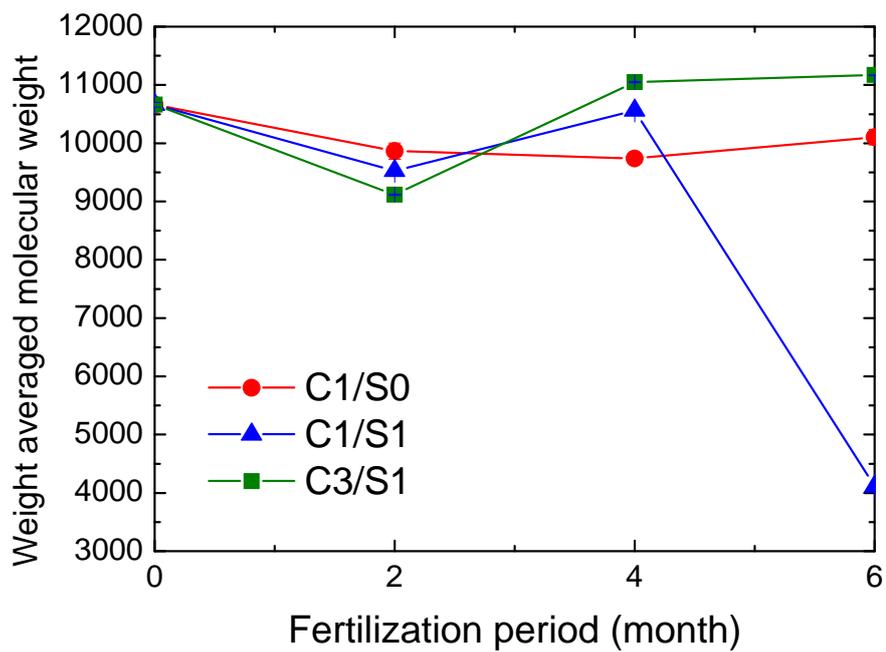
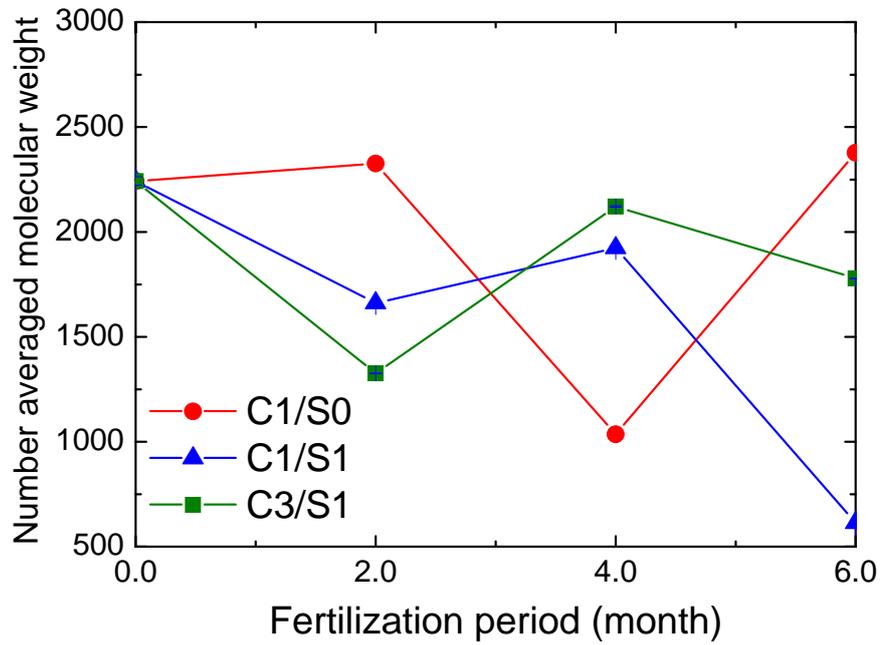


図 4.2.4-7 各 HA 試料の数平均 (M_n)および重量平均 (M_w)分子量の経時変化

(3)-4 py-GC/MS による構造解析

施肥期間における各ユニットのHAのTMHA-py-GC/MSクロマトグラムを示す(図4.2.4-8a~c)。各クロマトグラムに記載している「ISTD」とは内部標準物質(\bar{n} ノナデカン酸、 $\bar{n}C_{19:0}$)のことである。クロマトグラムの結果から、NIST質量スペクトルデータベースを用いてピークの同定を行い、そのピーク面積と内部標準物質のピーク面積との比(各ピーク/内部標準物質、ピーク比)を算出した。その後、図4.2.4-9に示すグループに従い、ピーク比を合計した(表4.2.4-4)。図4.2.4-9は、各HAに共通する代表的な物質とその保持時間を記載している。主に、タンパク質やアミノ酸の熱分解生成物であるピロールやインドールに由来する窒素化合物(A)、植物の芳香族成分を由来とする(B)・(C)・(D)、植物および微生物の細胞脂質に由来する飽和脂肪酸(E)と飽和脂肪酸(F)、ステロール系化合物(G)、硫黄化合物(H)、シクロ系炭化水素化合物(I)、アルコール化合物(K)のグループ分け(計11個)を行なった。各HAのクロマトグラムを比較すると、フェノール酸(D)と飽和・不飽和脂肪酸の(E・F)ピークが、各期間で著しく変化していることがわかった。特に6ヶ月目におけるC1/S1は、飽和・不飽和脂肪酸(E・F)のピークが非常に多く、フェノール酸(D)のピークが消失した。フェノール酸と脂肪酸の関係性を調べるために、施肥期間におけるフェノール酸(D)と脂肪酸(E+F)のピーク比の比率(D/(E+F))を算出した(図4.2.4-10)。さらに、HA中に含まれるフェノール酸(D)と脂肪酸(E+F)の割合を算出し相関性を調べたところ、負の相関性が得られた($r^2=0.66$)。つまり、HA中に含まれるフェノール酸および脂肪酸の存在割合の変化が、HAの構造変化を支配している因子であることが結論付けられた。フェノール酸は、バニリン酸、*p*-クマル酸およびシリンジ酸が多く含まれていることから、HA中の芳香族成分はリグニンフェノール酸が支配的であることが明らかとなった。これらの化合物は、植物細胞壁中に含まれるリグニンを構成する化合物であることが知られており、実際に堆肥中に存在している木片をTMAH-Py-GC/分析した結果、リグニンフェノール酸が検出された。リグニンフェノール酸は、土圏のHAおよび堆肥由来のHAに多く含まれているが、海水および河口水は植物残渣の供給が少ないためリグニンフェノール酸の存在量は少ない。よって、本研究でHA中に含まれるリグニンフェノール酸は、使用した堆肥が供給源であることが明らかとなった。

脂肪酸は、パルミチン酸(C_{16:0})、ミリスチン酸(C_{14:0})およびステアリン酸(C_{18:0})の飽和脂肪酸(E)と、パルミトレイン酸(C_{16:1}ω7)の不飽和脂肪酸(F)が顕著に現れた。なお、()内は(炭素数：二重結合数)を示している。特に、HA中にはC_{16:0}とC_{16:1}の多く含まれていた。C₁₆およびC₁₈の飽和・不飽和脂肪酸は、微生物の細胞膜を形成するリン脂質、および、植物細胞壁の表面保護成分(クチン)とコルク組織(スベリン)に存在していることから、自然界に多く分布しているため、HAに蓄積される。特に、微生物と植物が多く存在する土壌由来HAは多くのC₁₆およびC₁₈を含むが、C₁₆およびC₁₈が微生物由来か植物由来なのかは研究者によって意見が分かっている。本研究におけるHAも、堆肥由来の植物脂肪酸および微生物由来の動物脂肪酸の両者の寄与が考えられる。よって、両者の寄与を検討するために、6ヶ月

目におけるスラグ単体(C0/S1)粉末の TMAH-py-GC/MS 分析を行った。その結果、図 4.2.4-11 に示すように、C_{16:0} および C_{16:1} の飽和・不飽和脂肪酸が顕著に出現した。つまり、スラグ単体(無機物)にもかかわらず脂肪酸が存在したことは、この脂肪酸が微生物由来の動物脂肪酸であることを示唆している。さらに、6ヶ月目における C1/S1 は微生物由来脂肪酸とともに硫黄化合物(H)が顕著に現れている。これらの結果は、ユニット内部で硫酸還元菌の微生物活動を行なっていることを支持する結果である。つまり、硫酸還元菌が海水中の硫酸イオンを還元して生じる硫化物および硫酸還元菌の死骸に起因する脂肪酸が、HA に取り込まれていることが明らかとなった。

以上の結果から、HA 中に含まれる堆肥由来リグニンフェノール酸と硫酸還元菌由来飽和・不飽和脂肪酸の存在割合の変化が、HA の構造変化を支配していることがわかった。特に、6ヶ月目において、スラグ入り(C1/S1・C3/S1)とスラグ無し(C1/S1)を比較すると顕著な差が現れた。スラグ無しユニットでは、硫酸還元菌が還元状態の生息場(FeS₂)を作る上でのスラグ(鉄分)が少ないため生息が困難なのか、HA 中に脂肪酸が多く含まれていない。よって、堆肥リグニンフェノール酸を主体とした「芳香族性 HA」が生成されている。一方、スラグ入りは、硫酸還元菌が還元状態の生息場(FeS₂)を作る上で適したスラグ(鉄分)があるためか、ユニット内部で微生物活動を行い、その活動で生じた硫化物および死骸(脂肪酸)が HA に取り込まれると思われる。よって、硫酸還元菌由来脂肪酸を主体とした「脂肪性 HA」が生成されていると考えた。

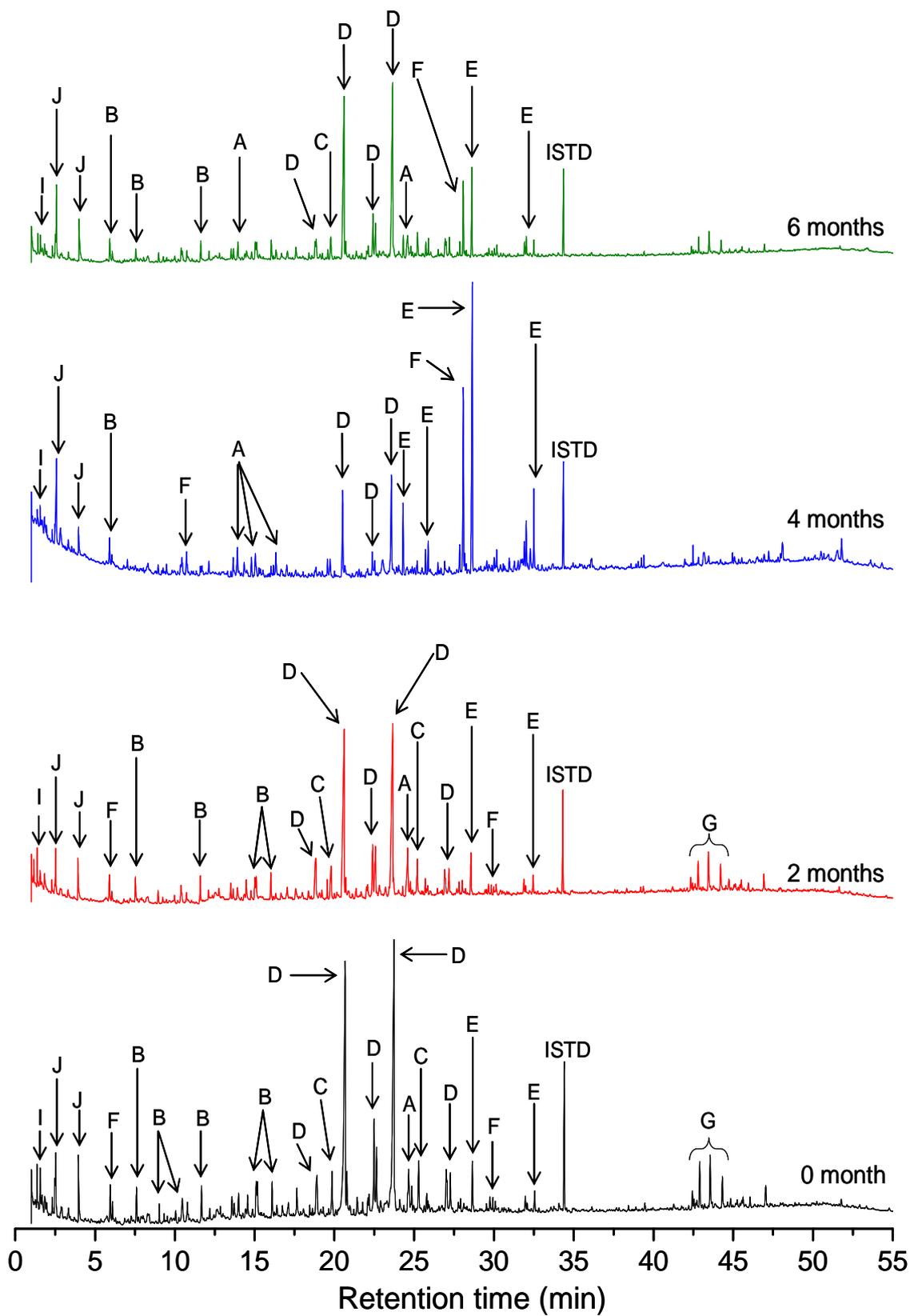


図 4.2.4-8a HA のパイログラムの経時変化(C1/S0)

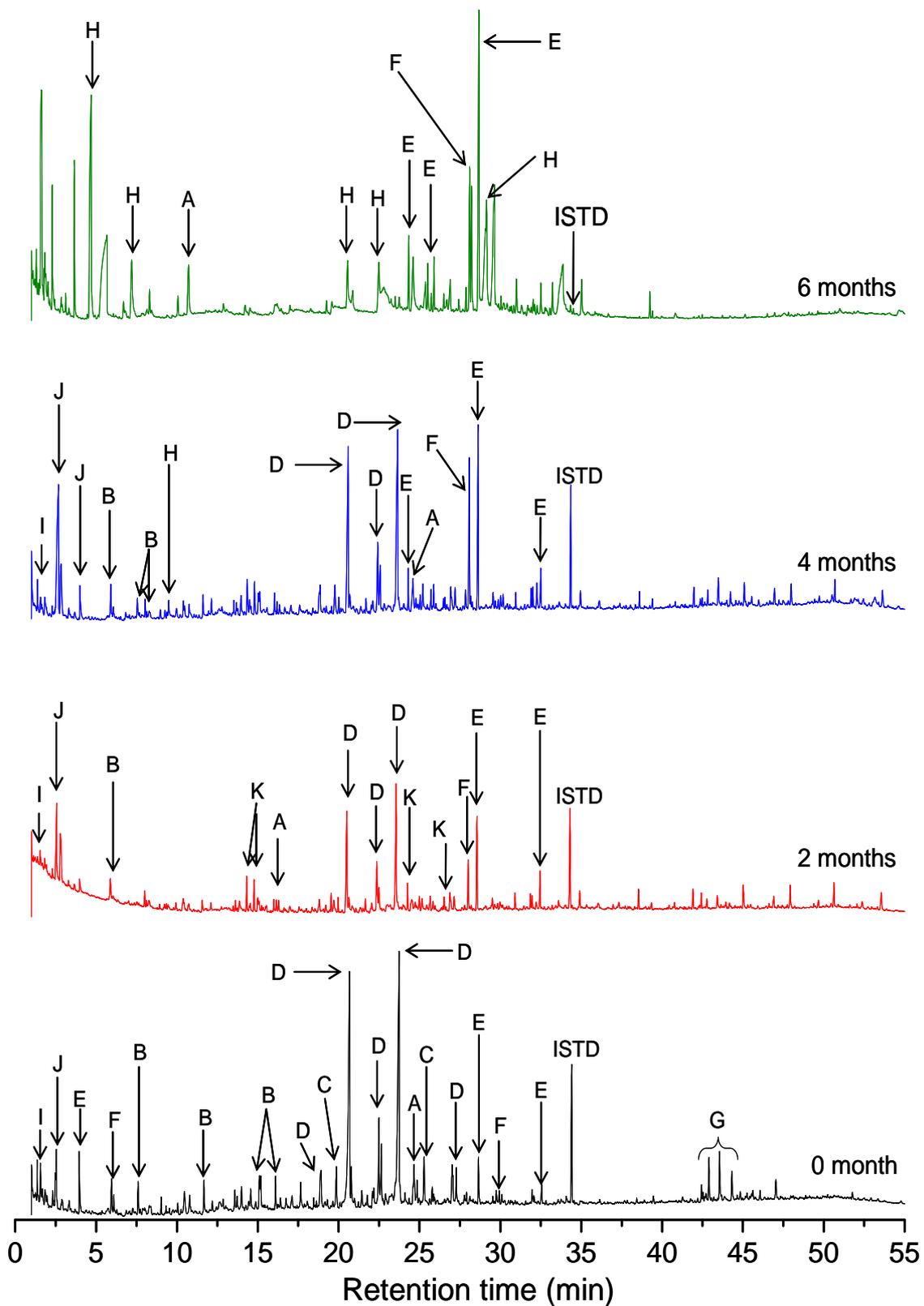


図 4.2.4-8b HA のパイログラムの経時変化(C1/S1)

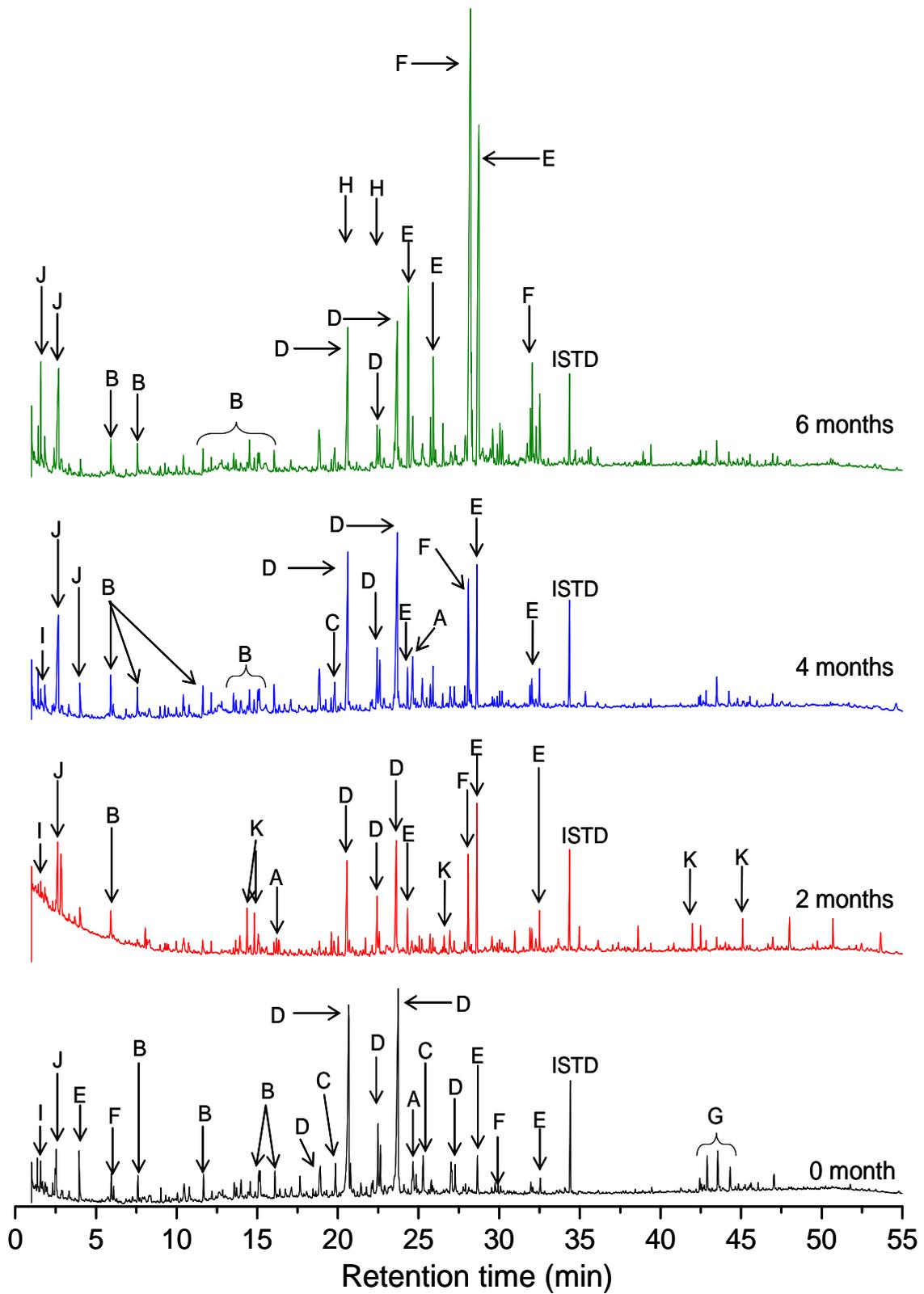


図 4.2.4-8c HA のパイログラムの経時変化(C3/S1)

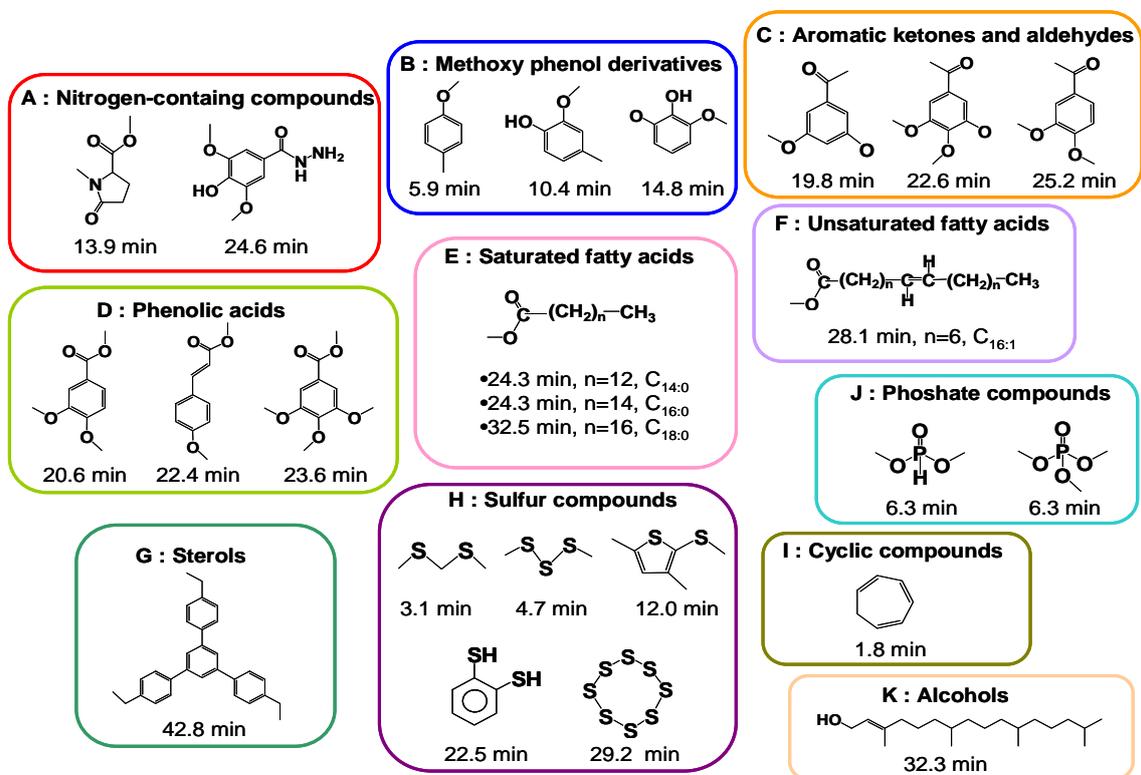


図 4.2.4-9 主な熱分解生成物の帰属とグループ分け

表 4.2.4-4 各熱分解生成物グループの内標準物質に対する相対ピーク強度

Compounds (Remarks)	(C1/S0)0	(C1/S0)2	(C1/S0)4	(C1/S0)6	(C1/S1)0	(C1/S1)2	(C1/S1)4	(C1/S1)6	(C3/S1)0	(C3/S1)2	(C3/S1)4	(C3/S1)6
Nitrogen-containing compounds (A)	1.53	1.99	1.91	1.81	1.53	0.82	1.05	34.18	1.53	1.20	1.74	1.88
Methoxy phenol derivatives (B)	3.32	3.51	1.04	2.21	3.32	1.02	1.14	16.83	3.32	0.84	3.11	2.80
Aromatic ketones and aldehydes (C)	2.22	1.13	0.38	1.57	2.22	0.50	1.08	0.00	2.22	0.42	1.50	1.38
Phenolic acids (D)	10.80	9.01	2.78	7.98	10.80	3.96	6.17	0.00	10.80	3.98	8.08	7.20
Saturated fatty acids (E)	2.52	1.74	6.36	2.71	2.52	1.98	3.39	91.02	2.52	3.52	3.96	16.32
Unsaturated fatty acid (F)	0.66	0.47	3.84	1.41	0.66	1.15	1.70	23.47	0.66	1.72	1.90	15.52
Sterols (G)	0.89	1.53	0.17	0.52	0.89	0.26	0.37	1.00	0.89	n.d.	0.42	0.70
Sulfur compounds (H)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	121.83	0.00	0.00	0.00	0.25
Cyclic compounds (I)	0.36	0.49	0.92	0.14	0.36	0.72	1.09	30.78	0.36	2.08	0.70	1.69
Phosphate compounds (J)	0.38	0.84	1.12	1.41	0.38	1.05	2.71	4.52	0.38	1.12	2.29	2.35
Alcohols (K)	0.00	0.00	1.68	0.07	0.00	3.59	2.16	9.81	0.00	3.45	0.12	1.20

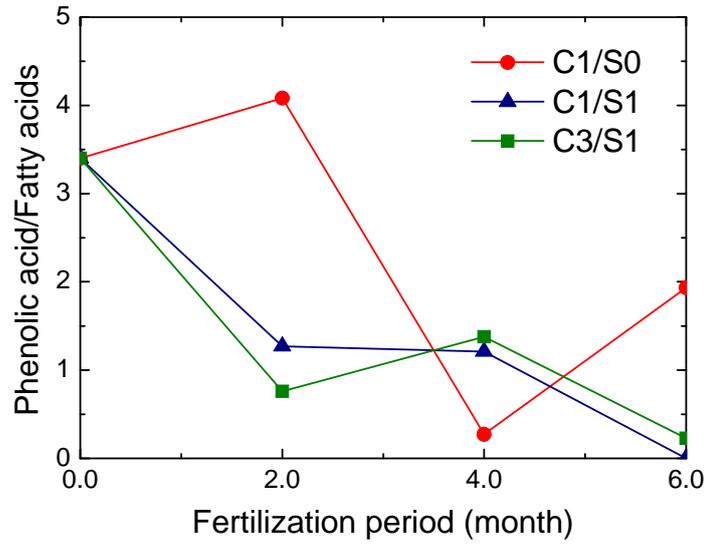


図 4.2.4-10 HA 中のフェノール酸/脂肪酸比の経時変化

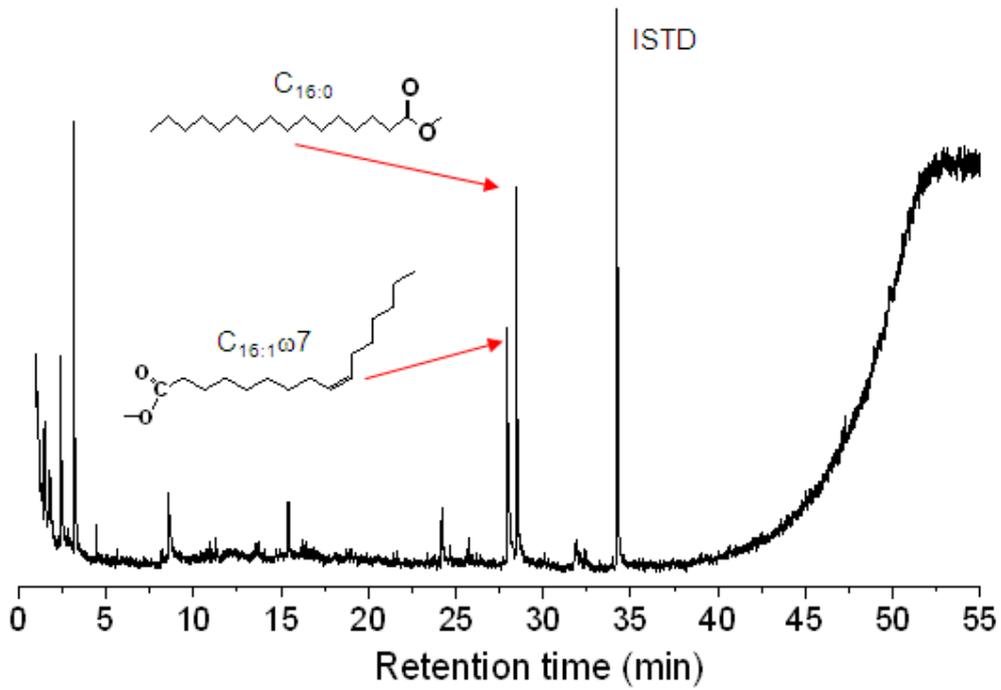


図 4.2.4-11 6ヶ月埋設後のスラグのパイログラム(堆肥無し)

(4) まとめ

本研究では、施肥期間におけるユニット中の腐植酸の化学組成変化に及ぼすスラグの影響を明らかにすることを目的とした。ゆえに、磯焼け海域である舎熊海岸(北海道増毛町)に設置した試験水槽に混合比を変化させた転炉系製鋼スラグー堆肥施肥ユニットを2、4および6ヶ月間埋設した。そして、ユニット中の腐植酸の量的変化および構造的変化を追跡した。

施肥ユニット投入後、スラグ有とスラグ無における腐植酸の量を比較すると、それぞれ2ヶ月目および4ヶ月目で、HA量が最低となった。この短期間におけるHA量の減少は、海水の溶出・溶脱効果であると示唆された。ゆえに、ユニット中のHAが長期に渡りスラグからFe(II)を溶出し続けるとは考え難い。また、スラグ有とスラグ無におけるHA量減少の時期なズレは、スラグ無HAと比較してスラグ有HA中に多くの微生物由来脂肪酸が含まれていたことから、微生物による腐植酸の分解が腐植酸の溶出と同時に進行していると考えられた。スラグ有とスラグ無で共通することは、HA量が最低な時期の2ヶ月後には、HA量が増加することである。これは、ユニット内部で新しく堆肥由来リグニンフェノール酸を基本骨格とした腐植酸が形成されていることが明らかとなった。6ヶ月後のスラグ有(C1/S1)のHAには、リグニンフェノール酸がほとんど含まれていない代わりに多くの微生物脂肪酸と硫黄化合物が存在したことから、硫酸還元菌の微生物活動の寄与が示唆された。反対に、6ヶ月後のスラグ無(C1/S0)のHAはリグニンフェノール酸を主体とした芳香族性に富む腐植酸であった。このような結果から、スラグ有ユニット内部では、硫酸還元菌が還元状態の生息場(FeS、FeS₂)を作る上で適した鉄分と電子供与体として作用する有機物(堆肥またはリグニンフェノール酸)があるため、硫酸還元菌が活動しやすい生活環境が構築され、その微生物活動によって生じた硫化物と微生物死骸が腐植酸に取り込まれていることが示唆された。また、このような硫酸還元菌の微生物活動で代謝される低分子の有機酸(乳酸、酢酸など)は、長期的な供給および鉄との親和性が高いという観点から、本技術における長期的な溶存鉄供給という役割を担っていると考えられる。

4. 2. 5 腐植物質の解析に関する総括

施肥ユニット中の堆肥の海水抽出物である SWEOM は HA 及び FA とは異なる構造的特色をもつことが明らかとなった。SWEOM は、HA 及び FA と比較して、脂肪酸に富み、分子量の大きい分画であることが分かった。FA と同程度の O/C モル比にも関わらず酸性官能基量は少なく、エーテルやアルデヒド、アルコール、ケトンを多く含んでいることが分かった。ステロイド等の脂質も溶出しており、SWEOM 中に多く含まれていることが分かった。多糖類やタンパク等、非 HS も溶出していると考えられ、N 含有量やアミノ酸含有量が高かった。

Fe²⁺との錯形成能を検討した結果、SWEOM は鉄との錯化容量が最も小さいことが分かった。錯化容量については、HA はフェノール酸類を豊富に含むため構造的に有利で、SWEOM は脂肪酸中心の構造であるために錯化容量が小さくなったと考えた。また、Fe(II)-SWEOM 錯体の解離に関わる活性化パラメータを、OP との配位子交換に基づき測定し Fe(II)-HA、Fe(II)-FA と比較した。Fe(II)-SWEOM 錯体の活性化エンタルピーは、Fe(II)-HA 錯体および Fe(II)-FA 錯体の値に比べて大きく低くなり、解離しやすく生物利用性が高い錯体であることが示唆された。

しかし、SWEOM の分子量範囲は極めて広くどのような分子量分画が錯形成に関与しているのが疑問である。そこで、SWEOM を限外濾過により分画下結果、高分子サイズ (> 100 kDa) の分画と低分子サイズ (< 0.5 kDa) の 2 分画で占められていることが明らかとなり、その間の分子量の存在量は極めて低かった。元素分析および FT-IT や ¹³C NMR のような分光学的測定結果から、高分子分画は脂肪族性に富み低分子の分画は芳香属性に富むことが分かった。さらに、低分子分画の酸性官能基含有量は、高分子分画に比べ遙かに高く親水性に富むことが分かった。また、抗酸化剤としてアスコルビン酸を添加することにより、フェロジン発色試薬との配位子交換反応速度差を利用することにより、海水条件下における解離可能な Fe(II)-SWEOM 錯体の濃度([Fe(II)-SWEOM]_{labile})の測定を可能にした。この測定により、Fe(II)-SWEOM_{labile} の錯形成能を評価し、低分子分画の錯化容量が大きいことを明らかにした。ゆえに、低分子分画と鉄との錯体の生物利用性が高く、コンブの生長に影響するキレートとして貢献することが示唆された。SWEOM の分画の鉄(II)錯体の相違で、コンブへの利用性が異なるか否かを確かめるため、コンブの配偶体生育に及ぼすこれら錯体の添加効果を調べた。SWEOM の低分子分画と鉄(II) を添加したとき、コンブの雌性配偶体の成熟が確認された。この結果は、コンブの生育に利用されうる鉄(II)のキレート剤として低分子分画（すなわち SWEOM における分子量 500 Da 以下の分画）が有用であることを示している。以上の結果から、SWEOM と鉄(II)との錯体はコンブの生育に対する利用性があることが実証され、各分画に対して labile な錯体の錯化容量の傾向とよく一致した。

さらに、施肥期間におけるユニット中の腐植酸の化学組成変化に及ぼすスラグの影響を明らかにすることを目的とした。磯焼け海域である舎熊海岸(北海道増毛町)に設置した試験

水槽に混合比を変化させた転炉系製鋼スラグー堆肥施肥ユニットを2、4および6ヶ月間埋設した。そして、ユニット中の腐植酸の量的変化および構造的変化を追跡した。

施肥ユニット投入後、スラグ有とスラグ無における腐植酸の量を比較すると、それぞれ2ヶ月目および4ヶ月目で、HA量が最低となった。この短期間におけるHA量の減少は、海水の溶出・溶脱効果であると示唆された。ゆえに、ユニット中のHAが長期に渡りスラグからFe(II)を溶出し続けるとは考え難い。また、スラグ有とスラグ無におけるHA量減少の時期なズレは、スラグ無HAと比較してスラグ有HA中に多くの微生物由来脂肪酸が含まれていたことから、微生物による腐植酸の分解が腐植酸の溶出と同時に進行していると考えられた。スラグ有とスラグ無で共通することは、HA量が最低な時期の2ヶ月後には、HA量が増加することである。これは、ユニット内部で新しく堆肥由来リグニンフェノール酸を基本骨格とした腐植酸が形成されていることが明らかとなった。6ヶ月後のスラグ有(C1/S1)のHAには、リグニンフェノール酸がほとんど含まれていない代わりに多くの微生物脂肪酸と硫黄化合物が存在したことから、硫酸還元菌の微生物活動の寄与が示唆された。反対に、6ヶ月後のスラグ無(C1/S0)のHAはリグニンフェノール酸を主体とした芳香族性に富む腐植酸であった。このような結果から、スラグ有ユニット内部では、硫酸還元菌が還元状態の生息場(FeS、FeS₂)を作る上で適した鉄分と電子供与体として作用する有機物(堆肥またはリグニンフェノール酸)があるため、硫酸還元菌が活動しやすい生活環境が構築され、その微生物活動によって生じた硫化物と微生物死骸が腐植酸に取り込まれていることが示唆された。また、このような硫酸還元菌の微生物活動で代謝される低分子の有機酸(乳酸、酢酸など)は、長期的な供給および鉄との親和性が高いという観点から、本技術における長期的な溶存鉄供給という役割を担っていると考えられる。

以上の検討結果から、施肥ユニットから海水により溶出する有機成分の中で低分子の分画や硫酸還元菌など微生物の作用により堆肥が分解することにより生成する低分子の有機酸が、解離安定性が低く生物利用性の高い鉄(II)との錯体を形成し、磯焼け海域の藻場再生に寄与していると結論づけた。

4. 3 腐植酸鉄の生成機構および実海域での実証的検討

製鋼スラグと腐植様物質を利用した生態系修復技術は、北海道日本海側（増毛町）における実証試験によりその効果が確認されており^{1),2)}、その後全国各地で実証試験・事業が実施され³⁾、実用化に向けた取り組みが産学連携で行われている⁴⁾。本技術の特長は海藻群落の衰退の原因の一つとして海水中の溶存鉄不足を考えていることであり、産業副産物と未利用バイオマスの有効活用の観点からも期待の大きい技術である。この修復技術では、製鋼スラグから溶出する鉄イオンと腐植物質が錯形成することによって溶存態鉄となり、海藻が取り込める鉄の量を増加させるとの原理が考えられてきた。これまで錯形成能評価⁵⁾をはじめとした基礎研究が行われてきたが、実用化に向けては鉄溶出メカニズムや海藻生育への鉄添加効果をはじめとした課題に対する更なる基礎的知見の集積やフィールドに近い条件での実験的検討が必要である。

本研究の目的は、製鋼スラグと腐植様物質を利用した生態系修復技術について、腐植物質－鉄錯体生成メカニズムの解明と藻場再生促進に向けた化学的・生物学的検討に基づき、循環型社会に適合した技術を確立することにある。本研究は、(1) 製鋼スラグと腐植物質の相互作用と環境リスク評価、(2)腐植物質の構造解析に基づく共存金属の環境挙動、(3) 腐植酸鉄の生成機構および実海域での実証的検討の 3 テーマにより成り立つが、東京大学においては(3)の課題の担当として研究を行った。

実際の研究では、①製鋼スラグと腐植様物質の海水への溶出特性評価、②海藻生育試験による鉄添加効果の検討、③実海域での実証的検討の 3 項目に分けて研究を実施した。「腐植酸鉄の生成機構」の部分については、実質的には(1)、(2)の知見を基に検討するものであるため、本課題では特に製鋼スラグと腐植様物質を混合した際の溶出特性について検討することにした。そして(1)、(2)で得られる知見と合わせることで腐植酸鉄の生成機構ならびに藻場再生技術への利用の有効性を評価することとした。②については「実証的検討」につながる項目として、特に海藻生育への鉄添加効果に関して実際に海藻培養を行って明らかにすることとした。そして③については生態系修復技術がこれまで効果が確認されているコンブ場以外への適用に関して実海域での実証試験に基づいて検討することと、特に生態系修復技術の確立に向けて、海藻以外の生物種も含めて海域調査を実施しながら検討・評価することを試みた。

4. 3. 1 製鋼スラグと腐植様物質の海水への溶出特性評価

(1) 背景と目的

ここでは、腐植酸鉄の生成メカニズムの解明および腐植様物質の鉄溶出促進への役割を検討するために、海水を用いた鉄分供給ユニット（製鋼スラグと腐植様物質の混合物）からの鉄溶出特性に関して評価することを目的とした。実際には、室内溶出試験および磯焼け海域の実海水を用いた屋外水槽試験（北海道増毛町に設置）を行い、腐植様物質混合による鉄溶出促進についての評価と効果継続性についての検討、そして栄養塩や重金属の溶出についても考察し、環境影響評価を実施することとした。

(2) 実験方法

・室内溶出試験

北海道増毛町で2004年10月より実施された藻場再生実証試験^{1), 2)}で用いられたものと同じ製鋼スラグ（新日鐵、表面を炭酸化処理済）と腐植様物質（堆肥）⁶⁾（以下、腐植物質）を用いて、製鋼スラグのみ、腐植物質のみ、製鋼スラグ+腐植物質の3種類の試料に関して、鉄溶出試験を行った。具体的には、表4.3.1-1の条件で試験を行った。人工海水は市販のもの（マリンテック、SEALIFE）を用い、固液（試料と海水）比を1:10として、試料の重量は各条件とも等しくした。また実証実験では製鋼スラグと腐植物質の混合比は体積比で1:1で行っているため、今回の溶出試験においても製鋼スラグ+腐植物質の試料においては体積比で1:1とした。なお、今回の溶出試験で用いた製鋼スラグと腐植物質の比重は、20:9（製鋼スラグ10gと腐植物質4.5gが同体積）であった。試験では2日ごとに人工海水を交換し海水中の全鉄濃度の測定を行った。一方で表4.3.1-1の条件では50mLの遠沈管を用いているが、溶質と試料が少量であることから測定誤差が大きい可能性がある。したがって溶出特性の再現性を確認するために、250mLのポリ瓶を用いて溶媒10g、溶液100mLとして表4.3.1-1と同条件（3試料）で溶出実験を行った。ここでは鉄濃度測定のほかに溶出液中のpHについても測定を行った。海水の分析方法としては、フェロジンを用いた分光光度法（フェロジン法）を用いて全鉄測定を行った。フェロジン法自体は、腐植酸鉄を含む有機態鉄の測定は困難であるが、全鉄測定を行うために試料溶液を塩酸酸性として煮沸し、ポリマー態の鉄を分解した後に塩酸ヒドロキシルアミンで全鉄を二価へ還元して分析を行った。また溶出試験の期間については、14日間として行った。

表 4.3.1-1 鉄溶出試験における溶媒・溶質の条件

体積比 Slag : HS	溶質			溶媒 ml
	Slag / g	HS / g	合計 / g	
1 : 0	4.00	0	4.00	40
0 : 1	0	4.00	4.00	40
1 : 1	2.76	1.24	4.00	40

※HS (Humic substance) :腐植物質

・屋外水槽試験

図 4.3.1-1 に今回の実験で使用した北海道増毛町の屋外水槽の写真を示す。この水槽は今回の実験を行うにあたって、現地漁業協同組合、(株)北海道オーシャングリーン開発、そして新日本製鐵(株)の協力を得ながら新たに設置をしたものである。水槽の容量は 300L である。本実験は北海道大学と共同で行い、この水槽を用いてユニットからの鉄溶出特性（東大担当）とユニット（固体試料）中の腐植物質の変化（北大担当）について検討を行った。なお、この実験で使用する腐植様物質としては、実証実験や室内溶出試験と同様に（株）エコ・グリーン製の堆肥（腐植物質）を用いることとした。本試験は平成 21 年と平成 23 年



図 4.3.1-1 実験に利用した増毛町の屋外水槽

度の2回実施している。平成21年度の試験においては腐植物質側の変化に関しては有用な知見が得られたが、海水側についてはより有意なデータが得られたのは平成23年度の試験であった。したがってここでは平成23年度の実験条件および結果に関して述べる。

図4.3.1-1の水槽のうち平成23年度は4つの水槽を用いて、海水容量300L、海水流量2.1L/minで試験を開始し、定期的に行った試料（固体）サンプリング後には滞留時間が一定となるように海水量と流量を変化させた。また試料条件は以下の①～④とし、製鋼スラグ3kgの体積を基準体積（ V_0 ）として、①～④の全てで体積が一定（ V_0 ）となるようにして、個別に水槽に設置した。今回の試験では、実験室内で検討を実施してきた①～③に加えて④を新たに実験条件として加えている。これは腐植物質の添加効果に関してより多くの知見を得るためである。

- ① 製鋼スラグのみ
- ② 腐植物質のみ
- ③ 腐植物質：製鋼スラグ＝1：1
- ④ 腐植物質：製鋼スラグ＝2：1

実験期間は、平成23年5～11月の6カ月間行った。分析については、最初の一カ月は半月に1度採水し、以後は月に一度海水を採水し、以下の項目について検討・評価を行った。

<分析項目>

- 1) 溶存鉄濃度：溶存鉄濃度を分光光度法によって分析した。分析は有明工業高等専門学校の劉教授に依頼した。
- 2) 栄養塩濃度：全窒素（T-N）、全リン（T-P）について、それぞれ紫外吸光光度法、ペルオキシ硫酸カリウム分解法によって分析を行った。また溶存無機態栄養塩については、窒素（ $\text{NO}^2\text{-N}$ 、 $\text{NO}^3\text{-N}$ 、 $\text{NH}^4\text{-N}$ ）、リン（ $\text{PO}^4\text{-P}$ ）の分析を栄養塩自動分析装置を用いて行った。
- 3) 重金属濃度：ICP-MSを用いて、Cd、Pb、Cr、Cu、Zn、Mnの6種類について分析を行った。

(3) 結果と考察

・室内溶出試験

図4.3.1-2に表4.3.1-1の条件で行った溶出実験における全鉄濃度の変化を示す。溶出試験期間中の鉄濃度はほぼ「腐植物質（HS）＞製鋼スラグ＋腐植物質＞製鋼スラグ」の順に推移していることがわかる。この結果より、製鋼スラグに腐植物質を混合することによって、鉄溶出量が増大することが示された。一方で、今回用いた製鋼スラグに含まれる全鉄

量は 22.2wt%、腐植物質に含まれる全鉄量は 2.55wt%であるが、実験結果からは腐植物質からの鉄溶出量が特に多いことがわかる。表 4.3.1-2 は、図 4.3.1-2 に示した 14 日間の鉄濃度から計算した 3 条件（試料）の鉄溶出速度、そして製鋼スラグと腐植物質に含まれる鉄含有量のうち 1%が溶出すると仮定して計算した鉄溶出寿命である。まず鉄溶出速度については、製鋼スラグに腐植物質を混合することによって約 1.2 倍速度が増加することが示された。製鋼スラグ+腐植物質の場合、製鋼スラグだけの時よりもスラグ量が半分になっているにも関わらず溶出速度が増加していることから、腐植物質との混合により鉄溶出速度が増加したと考えられる。一方で腐植物質だけの時には、製鋼スラグだけの場合よりも溶出速度が約 3.8 倍になっていることが示されている。この結果だけから考えると、鉄溶出速度の観点では腐植物質だけの場合が最も有利であると言える。しかし表 4.3.1-2 の寿命を見てみると、製鋼スラグだけ、製鋼スラグ+腐植物質と比較して極端に短くなっており、実海域で利用することを考えると最適であるとは言い難い。以上のことから、製鋼スラグと腐植物質との混合は、鉄溶出速度促進と鉄溶出の寿命の両方の観点から、優位であることが示唆された。なお今回求めた溶出速度は、真の溶出速度ではなくみかけの溶出速度であると言える。海水 40mL に対して 2 日間溶出させて海水を交換していることから、鉄酸化・沈殿も同時に起こっていると考えられるためである。みかけの溶出速度は、以下の関係から導出されるものと推測される。

$$\begin{aligned} (\text{みかけの溶出速度}) &= (\text{真の鉄溶出速度}) - (\text{鉄酸化・沈殿速度}) \\ &\quad - (\text{微生物による鉄吸収速度}) \end{aligned}$$

但し、今回は人工海水を利用していることから、海水中のプランクトンの影響は考慮しなくてよいため、微生物による鉄吸収速度の影響は小さいと考えられる。また算出した寿命については、全鉄量の 1%が溶出と仮定していることや、長期間経過後の溶出速度を考慮せずに溶出試験開始 14 日間の平均鉄溶出速度から計算していることから、溶出特性については今回の実験結果をもとに、更なる検討が必要であると考えられる。

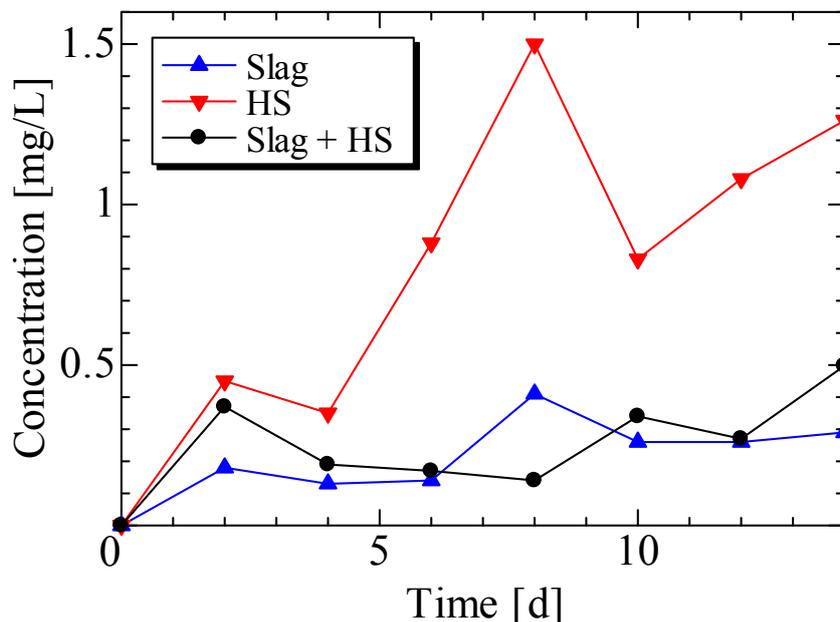


図 4.3.1-2 各試料における鉄濃度の変化

表 4.3.1-2 溶出試験結果より算出した鉄溶出速度と寿命

	slag	HS	slag + HS
Fe elution rate [mg-Fe/g-sample/day]	0.74	2.84	0.88
Lifetime [year]	5.1	0.15	3.1

再現性確認のために試料 10g、海水 100mL の条件行った実験では、3 試料からの溶出特性は定量的には完全に一致はしていないものの、定性的には図 4.3.1-2 と一致する結果が得られた。このことから、製鋼スラグと腐植物質の混合効果は鉄溶出促進と長寿命化であることが裏付けられた。その一方で図 4.3.1-3 に示す様に、更に pH の面から新たな知見を得ることができた。実証試験で使用している製鋼安定化スラグは、未処理のスラグに比べてアルカリ溶出が少ないと言えるが、それでも pH が 9.5 程度まで上昇していることがわかる。一方で腐植物質だけの場合には pH が 7.5 程度に抑えられていることがわかる。そして製鋼スラグ+腐植物質の場合、腐植物質の存在により pH が 8.8 程度に抑えられていることが示されている。このことから、腐植物質との混合は、鉄溶出と寿命に加えて、海水の pH 上昇を抑える効果もあることが示唆された。

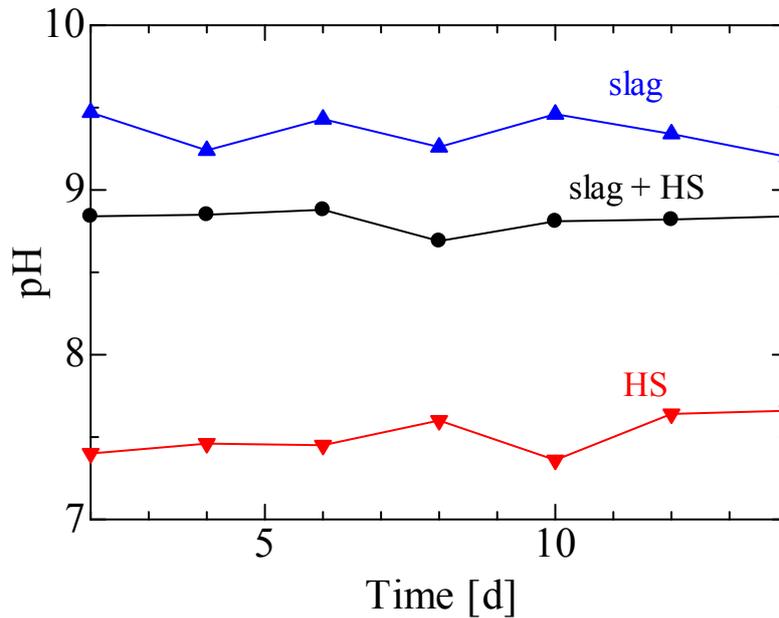


図 4.3.1-3 各試料における pH の経時変化

・屋外水槽試験

図 4.3.1-4 に溶存鉄濃度の実験開始後 2 カ月後までの経時変化について示す。まずブランクの鉄濃度が変動しているが、これは季節変動や気象条件などの影響と考えられる。一方で、試料③（製鋼スラグ：腐植物質＝1：1）における溶存鉄濃度はブランク値よりも高く、試料④（製鋼スラグ：腐植物質＝1：2）では試料③よりも溶存鉄濃度が高いことから、製鋼スラグに腐植物質を混合することにより、鉄溶出速度が増加することが示された。

但し、この結果は室内溶出試験結果とは腐植物質の挙動の部分が異なるものとなった。室内実験においては腐植物質だけ（試料②）の場合が最も鉄溶出量が多い結果となったが、この試験においては腐植物質と製鋼スラグの混合物の方が濃度は高くなっている。一方で、今回の屋外水槽試験と室内実験では実験条件について異なる点もあり（海水中のプランクトン量なども異なると予想される）、この結果の理由については今後の検討課題である。また 60 日以降においては、ブランクと試料①～④の鉄濃度に明確な差が見られなくなる結果が得られた。この結果に関しては、過去の研究で示された実験室内で 250 日間、あるいは 90 日間の溶出実験を行った際の結果と異なっている。この実験では、溶出試験開始直後は溶出量が多く、次第に溶出量が減少し一定となる様子が示されている。このことを考えると、屋外水槽試験開始直後は各試料からの鉄溶出量が多いが 60 日経過後からは溶出量の差が少なくなり、今回の試料と海水量の比、また滞留時間では溶出速度が安定した後は差が出なかった可能性がある。いずれにしても、より詳細な検討を行うためには、今後海水量に対する試料の量を増やして検討する必要性が考えられる。

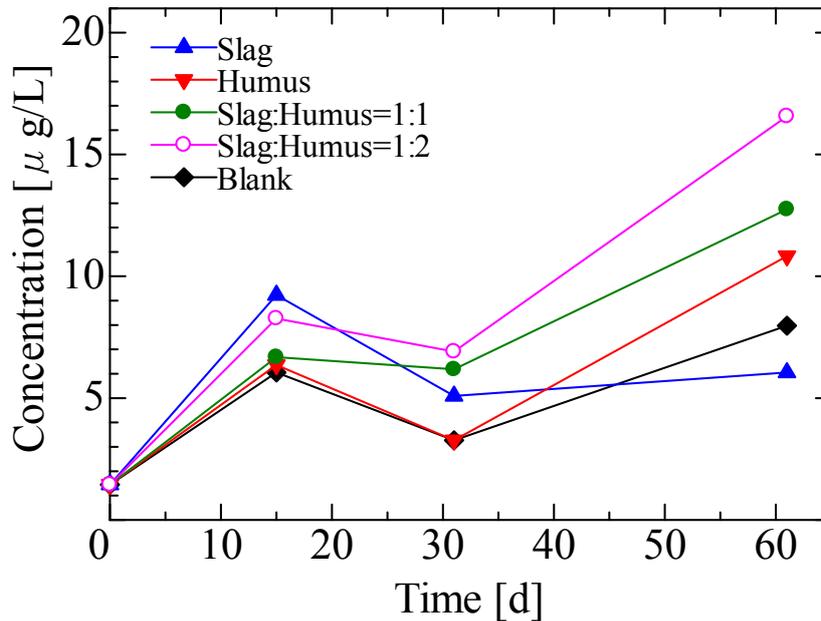


図 4.3.1-4 4 試料（製鋼スラグ，腐植物質，腐植物質：製鋼スラグ＝1：1，腐植物質：製鋼スラグ＝2：1）からの鉄の溶出特性

次に栄養塩(N, P)の挙動について示す。本章では、栄養塩について検討した全窒素(T-N)、全リン(T-P)および無機態栄養塩(NH₄-N, NO₂-N, NO₃-N, PO₄-P)の中で、ある程度の傾向性が示されたT-NとT-Pについて記載する。図4.3.1-5に試験期間中のT-N濃度変化についての図を示す。ブランクと製鋼スラグ(試料①)、腐植物質(試料②)を比較すると実験開始直後は若干の差が見られるものの、全体を通しては大きな差が無いことが示された。試料②の条件ではN, Pなどの栄養塩溶出が予想されたが、実際には、今回の実験条件の場合ではそれほど栄養塩の溶出はないとの結果が示された。一方で、製鋼スラグに腐植物質を混合した場合には、栄養塩溶出量が増えることが示された。また試料④ではブランクに比べて2倍近くのT-N濃度が得られており、腐植物質量が増えることによってT-N濃度も増加することが示された。図4.3.1-6はリン(T-P)濃度の挙動について示したグラフである。T-PについてもT-Nと同様に腐植物質の割合が増えると(試料④)、リンの溶出量も増加していることが確認された。一方でT-Nの場合とは異なり、試料②はブランクと比較してT-P濃度が上昇しており、更に試料①は試料②よりもT-P濃度が高いことが示された。スラグからのリンの溶出に関しては既往の研究でも研究例があるが⁸⁾、リンの場合には腐植物質だけでなく、製鋼スラグからもリンが溶出していることが示された。

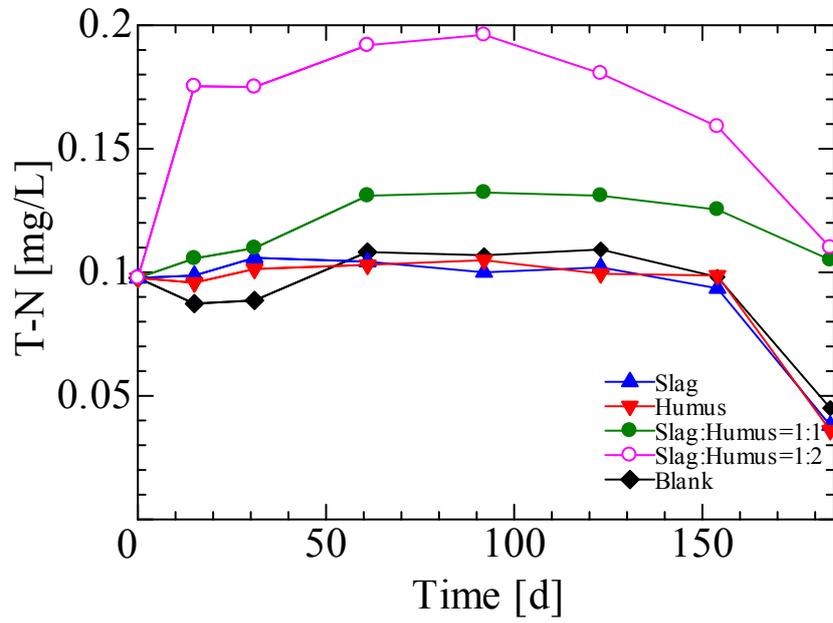


図 4-3-1-5 4種類の試料における T-N 濃度の変化

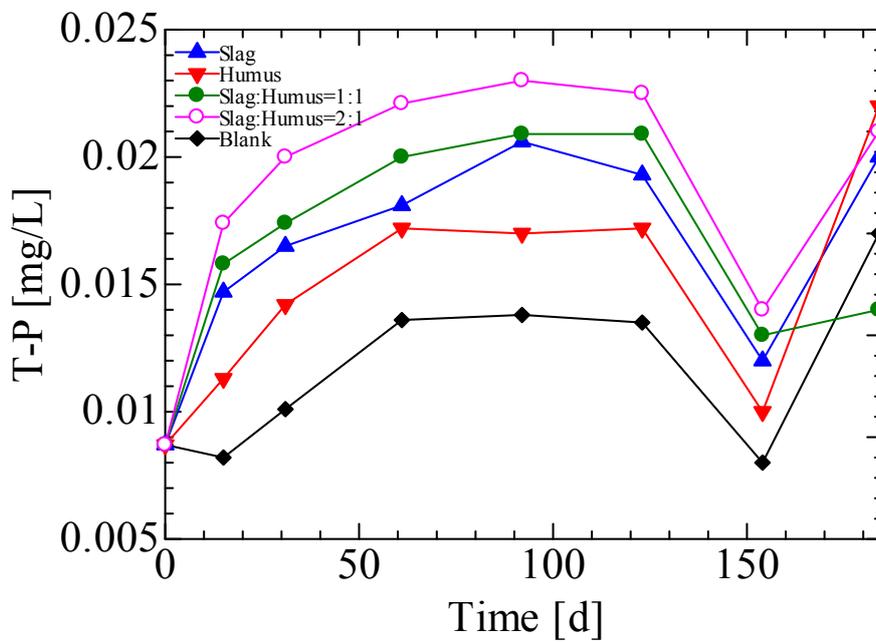


図 4.3.1-6 4種類の試料における T-P 濃度の変化

表 4.3.1-3 重金属元素の濃度 [$\mu\text{g/L}$]

測定項目		Pb						
基準値 ($\mu\text{g/L}$)		10						
定量下限値 ($\mu\text{g/L}$)		1						
日数	15	31	61	92	123	154	184	
BLANK	0.4	1.0	0.9	0.1	0.1	0.2	0.5	
slag : HS = 1 : 0	0.4	0.6	0.1	N.D	0.3	0.2	0.2	
slag : HS = 0 : 1	0.1	0.1	1.2	0.1	0.5	N.D	N.D	
slag : HS = 1 : 1	N.D	N.D	0.4	1.0	N.D	0.3	N.D	
slag : HS = 2 : 1	0.1	N.D	0.4	0.6	N.D	0.2	N.D	

測定項目		Cd						
基準値 ($\mu\text{g/L}$)		3						
定量下限値 ($\mu\text{g/L}$)		1						
日数	15	31	61	92	123	154	184	
BLANK	0.0	0.1	0.2	0.0	0.1	0.0	0.0	
slag : HS = 1 : 0	0.1	0.1	0.1	0.1	0.0	0.1	0.0	
slag : HS = 0 : 1	0.0	0.1	0.2	0.1	0.1	0.0	0.0	
slag : HS = 1 : 1	0.1	0.0	0.1	0.1	0.0	0.0	0.0	
slag : HS = 2 : 1	0.0	0.1	0.1	0.0	0.1	0.0	0.0	

測定項目		Cr						
基準値 ($\mu\text{g/L}$)		50						
定量下限値 ($\mu\text{g/L}$)		1						
日数	15	31	61	92	123	154	184	
BLANK	N.D	0.5	0.1	0.0	0.0	0.1	0.3	
slag : HS = 1 : 0	N.D	0.1	0.0	0.1	0.0	0.0	0.2	
slag : HS = 0 : 1	N.D	0.1	0.1	0.0	0.0	0.1	0.5	
slag : HS = 1 : 1	N.D	0.1	0.0	0.0	0.0	0.2	0.2	
slag : HS = 2 : 1	N.D	2.6	0.1	0.0	0.0	0.1	0.4	

測定項目		Mn						
基準値 ($\mu\text{g/L}$)		10,000 (10 mg/L)						
定量下限値 ($\mu\text{g/L}$)		0.1						
日数	15	31	61	92	123	154	184	
BLANK	0.2	0.3	N.D	N.D	N.D	N.D	7.1	
slag : HS = 1 : 0	0.2	0.2	0.1	N.D	N.D	N.D	4.8	
slag : HS = 0 : 1	0.2	0.3	0.3	N.D	1.4	N.D	4.1	
slag : HS = 1 : 1	0.2	0.2	N.D	N.D	N.D	N.D	4.4	
slag : HS = 2 : 1	0.2	0.3	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	

測定項目		As						
基準値 ($\mu\text{g/L}$)		10						
定量下限値 ($\mu\text{g/L}$)		1						
日数	15	31	61	92	123	154	184	
BLANK	N.D	2.0	1.8	2.0	1.9	1.9	2.4	
slag : HS = 1 : 0	N.D	1.9	2.2	2.1	2.1	2.0	2.2	
slag : HS = 0 : 1	N.D	2.2	2.0	1.9	1.9	2.5	2.1	
slag : HS = 1 : 1	N.D	1.9	2.2	1.9	2.1	2.3	2.1	
slag : HS = 2 : 1	N.D	2.1	2.1	2.2	1.8	2.2	1.9	

測定項目		Se						
基準値 ($\mu\text{g/L}$)		10						
定量下限値 ($\mu\text{g/L}$)		1						
日数	15	31	61	92	123	154	184	
BLANK	N.D	N.D	0.4	N.D	N.D	N.D	N.D	
slag : HS = 1 : 0	N.D	N.D	0.4	N.D	N.D	N.D	N.D	
slag : HS = 0 : 1	N.D	N.D	0.1	N.D	N.D	N.D	N.D	
slag : HS = 1 : 1	N.D							
slag : HS = 2 : 1	N.D							

これらの実験結果より、製鋼スラグと腐植物質を混合した鉄分供給ユニットは、鉄だけでなく栄養塩溶出もなされることが実海域に近い実験条件で結果として示された。但し、北海道増毛町で行われた実海域実証試験（ユニットは試料③の条件）においては、試験開始後3年後については、海域の溶存鉄濃度の上昇は確認されたが、栄養塩濃度（N, P）の上昇は確認されていない⁹⁾。長期的に考えた場合では、鉄分供給ユニットは栄養塩供給よりも鉄供給能に優れていることが考えられるが、実海域試験と屋外水槽試験の結果の差異については今後更に検討していく必要がある。

次に重金属濃度の分析結果を表4.3.1-3に示す。Pb, Cd, Cr, Mn, As, Seの6種類についての分析結果を示しているが、表にある基準値とは、水質汚濁に係る環境基準（Pb, Cd, Cr, As, Se）および水質汚濁防止法に基づく排水規制の一律排水基準（Mn）を示す。また各元素の定量下限値をそれぞれ示している。

まずMnとSeについては、検出限界以下の場合が多いことが示された。一方でAsについては分析値が得られているが、ブランクと比較して有意な差が認められなかった。またPb, Cd, Asについてもスラグや腐植物質からの溶出はほとんど認められなかった。今回の溶出試験においては、試験期間を通して栄養塩溶出は続いていることが確認されているが、重金属に関しては少なくとも今回の条件については溶出がないことが示された。室内試験においては、製鋼スラグと腐植物質からの重金属溶出に関する知見が得られているが⁹⁾、腐植物質混合することによって製鋼スラグからの重金属溶出が抑制されることが示されている。今回の屋外水槽試験の結果は、試料と海水量の比も異なるため混合による減少傾向は確認されなかったが、環境へのリスクが少ないと予想される結果が得られたこと自体は室内実験と同様の結果が得られた。

(4) まとめ

人工海水を用いた鉄溶出試験の結果、製鋼スラグへの腐植物質の混合は、鉄溶出促進、長寿命化、そしてpH上昇抑制の三点から有利であることが示された。また実海域にできるだけ近い条件で、屋外水槽を利用して鉄分供給ユニットからの鉄や栄養塩そして重金属溶出試験を行った結果、鉄溶出に関しては製鋼スラグと腐植物質の混合によって鉄溶出量が増加する結果が得られた。これまでの研究結果を支持する成果が得られたが、今後は海水量に対する試料の量を増やすなどして更なる検討を行っていく必要がある。また栄養塩（N, P）については、6カ月にわたって溶出が継続する結果が得られたほか、製鋼スラグとの混合によって栄養塩溶出量も増加する可能性が示された。これについては今後室内試験によって更なる検討を行う必要がある。重金属濃度に関しては、環境基準値と比較して問題のあるデータは得られなかった。今後は、試料の量が増加した場合の影響に関して検討をしていく必要がある。

4. 3. 2 海藻生育試験による鉄添加効果の検討

(1) 背景と目的

2004年10月に開始された北海道増毛町での実証実験においては、鉄分供給ユニットの効果は証明されたが、フィールド実験であるためにユニット設置以外の影響を少なからず受ける結果となった。したがって海藻生育に対する鉄添加効果についての体系的な理解が必要であり、室内における海藻培養試験による実験的検討が有用であると考えられる。これまで室内培養試験に関しては、コンブ配偶体の成熟に関する評価などの研究例¹⁰⁾はあるものの、十分な検討がなされていないのが実状であった。

本研究においては、2Lのフラスコを用いて実験室内で海藻生育試験を行い、海藻成長への鉄添加効果に関して評価することを目的とした。実験室内における試験で使用する海藻は幼体であり、既往の研究にある配偶体成熟とは海藻の状態が異なることから、海藻生育に及ぼす鉄の効果に関して新たな知見を得ることができると期待される。これまでの研究ではコンブについての知見は多く得られている一方で、北海道以外で生育する海藻への鉄添加効果に関するデータは少なく、特にアラメ・カジメ場などの多年生の海藻が繁茂する海中林の再生に対する効果に関しては基礎的知見を得ておく必要がある。それを踏まえてここでは、多年生海藻であるアラメを用いて、海藻成長促進への鉄添加効果を定量的に評価することとした。

(2) 実験方法

2Lフラスコ中で海藻培養を行う海藻生育試験装置（本研究で新たに作製）を利用して、アラメの幼体の生育試験を行った。アラメは、長崎大学の桑野和可准教授から提供を受けた。実際の生育方法としては、アラメの幼体5枚を各フラスコに入れ、人工海水および実海水（小笠原）を用い、海藻成長率（湿重量比）の差を評価した(図4.3.2-1)。フラスコには2L/dayの速度で海水を常時供給しながら海水交換を行い、天然にできるだけ近い形で光合成を行えるように、装置に設置されている蛍光灯を1日12時間点灯させるようにした。



図 4.3.2-1 試験で使用したアラメの幼体

人工海水と実海水を利用した際の実験条件は以下の通りである。

1) 人工海水での海藻生育試験

人工海水（マリンテック、SEALIFE）に栄養塩（硝酸（ NaNO_3 ）、リン酸（ NaH_2PO_4 ））と鉄（Fe-EDTA）をフラスコごとに条件を変えて添加し、海藻成長率の差を評価した。

2) 実海水での海藻生育試験

以下の3条件を基本にして検討を行うこととした。

- ① 製鋼スラグのみ
- ② 腐植物質のみ
- ③ 腐植物質：製鋼スラグ = 1 : 1

具体的には、製鋼スラグ 20g を基準体積 V（試料①）とし、それと同体積の腐植物質を試料②とした。また試料③については基準体積 V となるように製鋼スラグ量と腐植物質量は調製した。また試料は、細かいメッシュ状の小さい袋の中に入れ、それをそのままフラスコに入れて生育試験を行った。その他の条件に関しては人工海水を用いた海藻生育試験と同様とした。

(3) 結果と考察

最初に予備実験を兼ねて、人工海水に栄養塩（N, P）と鉄の両方を加えた場合と、何も添加しなかった場合の海藻生育の差について評価した。図 4.3.2-2 は Fe（Fe(III)-EDTA）濃度：10ppb、N（ NaNO_3 ）濃度：0.1 ppm、P（ NaH_2PO_4 ）濃度：0.01ppm に調製した人工海水を用いた際の結果である。

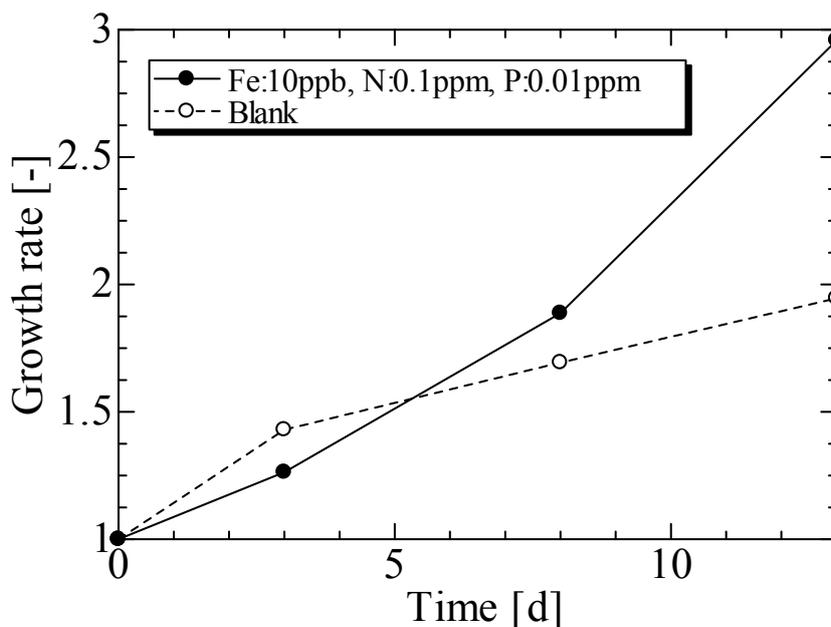


図 4.3.2-2 栄養塩と鉄添加が海藻生育に及ぼす影響

横軸は時間変化、縦軸は成長率 (= (試験開始後の海藻重量) / (試験開始時の海藻重量)) を表している。試験開始 3 日後は、栄養塩・鉄を添加していない海藻の方が成長率は大きくなっているが、8 日後は栄養塩・鉄を添加した海藻の方が成長率は大きくなり、13 日後にはその差が更に大きくなっていることが示された。このことにより、栄養塩 (N, P) と鉄は海藻生育にとって必要であることが改めて示された。

この試験結果だけからは鉄が海藻生育に効果があるとは言うことは難しい。したがって、栄養塩と鉄を添加した海水と栄養塩だけ添加した海水の海藻生育の差を比較することで鉄の効果을明らかにすることにした。図 4.3.2-3 は N 濃度 : 0.35ppm、P 濃度 : 0.045ppm の海水を基準として、Fe 濃度を 0, 30, 60ppb と変化させた場合の約 3 週間にわたる海藻成長率の変化について示したグラフである。なおこの実験においては、実験開始後 3 日目までは送液ポンプによるフラスコ内の海水置換は行わず、毎日 (1 日ごとに) フラスコ内の海水を全交換する方法をとった。また、人工海水による海藻生育ではある程度時間が経過すると海藻の先端がちぎれてくる現象がどの実験条件においても確認されたが、図 4.3.2-3 の場合でも 18 日目以降は先端がちぎれる現象が強く確認されるようになったことを付記しておく。実験により、Fe 濃度 : 0ppm に比べて Fe 濃度 : 60ppm の場合の方が海藻成長率は大きいことが確認された。しかも図 4.3.2-2 と同様に時間の経過とともに成長率の差が増大していることが示されている。試験開始後 3 日後における Fe 濃度 : 60ppm の成長率が極端に大きくなっているが、その後の成長率の推移を考慮すると測定誤差の可能性が高いことが考えられる。いずれにしてもこの結果と図 4.3.2-2 の結果から、鉄添加が海藻生育促進へと効果があることを確認できた。

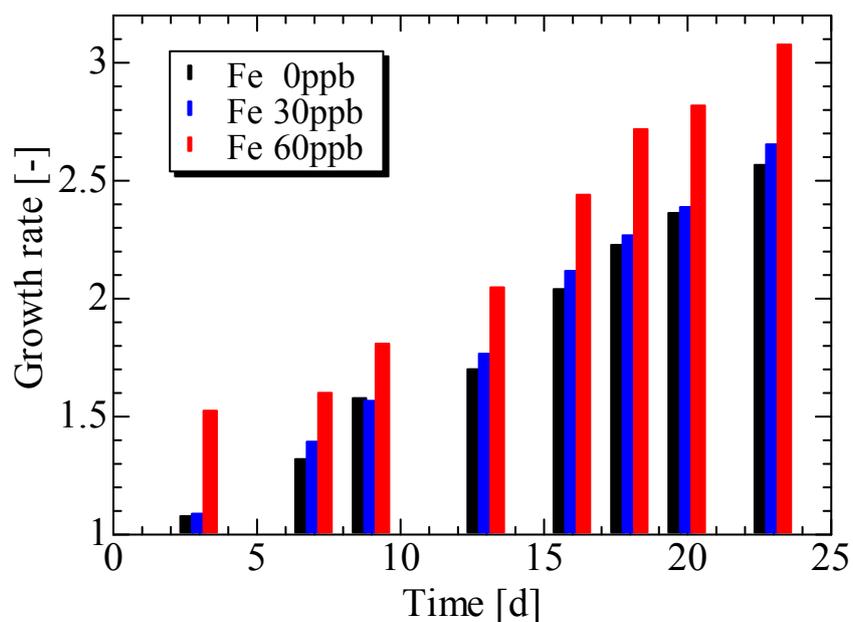


図 4.3.2-3 栄養塩と鉄添加が海藻生育に及ぼす影響 (N:0.35ppm, P:0.045ppm)

一方で、Fe 濃度 : 30ppm の場合、Fe 濃度 : 0ppm の場合と比較すると海藻成長率自体は高いものの、その差は小さいことがわかる。これは鉄濃度の増加と海藻生育には直線的な関係性がない可能性を示している。あるいは海藻成長への鉄添加効果には閾値（最少添加量）のようなものが存在する可能性も考えられる。しかし鉄添加量と海藻成長の定量的な関係性に関してはここで結論を出すことは難しく、今後更なる検討が必要である。

以上の実験において添加したのは Fe(III)-EDTA 溶液であり、腐植酸鉄とは形態が異なる。鉄溶出試験結果と実証試験で得られている結果とをつなぐ成果を得るためには、少なくとも、製鋼スラグのみ、腐植物質のみ、製鋼スラグ+腐植物質の 3 条件の試料から溶出する鉄を利用した海藻生育試験を行う必要があると考えられたため、上述の 2) の条件で試験を行った。

図 4.3.2-4 に 2) に記載した試料①～③の条件で海藻生育試験を行った結果を示す。ブランクと比較して、製鋼スラグを入れた時（試料①）の方が海藻成長は良くなっているが、腐植物質だけ（試料②）を入れた場合は更に成長率が大きくなっていることが示された。そして製鋼スラグと腐植物質を混合した場合が最も成長率が良い結果が得られた。4.3.1 章の溶出試験結果や既往の研究 7) によって製鋼スラグと腐植物質の混合により鉄溶出量が増加することが示されており、既往の研究 7) では室内溶出試験においては腐植物質だけの条件で

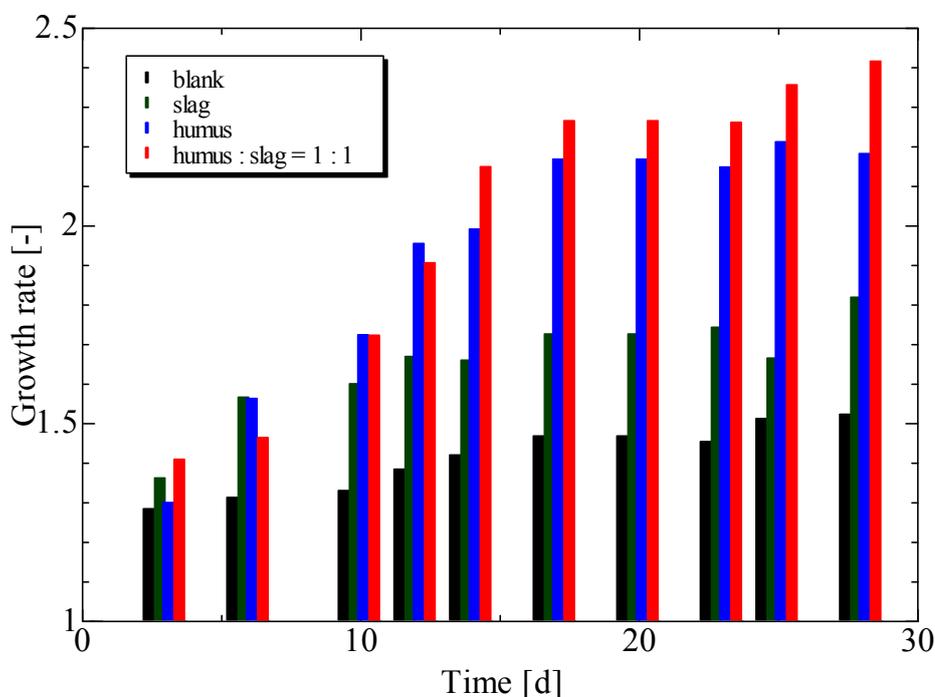


図 4.3.2-4 4つの実験条件における海藻の成長速度の変化

鉄溶出量が多いことが示されている。これらは、図 4.3.2-4 の海藻生育試験と矛盾しない結果と言える。したがって今回の結果からは、実際の製鋼スラグと腐植物質から溶出する鉄が海藻生育に効果があること、更に製鋼スラグと腐植物質の混合は海藻生育の観点からも効果のあることが実験的に示された。

一方で図 4.3.2-4 の試験では実海水を利用しており、海水中のプランクトンの影響などが排除できていない。また腐植物質の混合効果をより詳細に評価するためには、2 章の溶出試験のように腐植物質と製鋼スラグの比率を変えた試験を行う必要性が考えられた。したがってここでは、オートクレーブにて滅菌した海水を用い、以下の 3 条件で生育試験を行った。

- (1) 腐植物質：製鋼スラグ＝1：1（4.3.1 章の試料③の条件）
- (2) 腐植物質：製鋼スラグ＝1：2
- (3) 腐植物質：製鋼スラグ＝2：1（4.3.1 章の試料④の条件）

図 4.3.2-5 に結果を示す。ブランクに比べ製鋼スラグと腐植物質を混合した試料を供給した条件では海藻成長率が大きく増加することが確認された。この結果より、海藻成長に対してはプランクトンの有無にかかわらず、鉄添加効果はあることが示された。一方で製鋼スラグと腐植物質の混合比に関しては、腐植物質の割合が大きいほど海藻成長が良くなることが示された。但し、特に製鋼スラグと腐植物質の混合比が 1：1 の時と 1：2 の時で

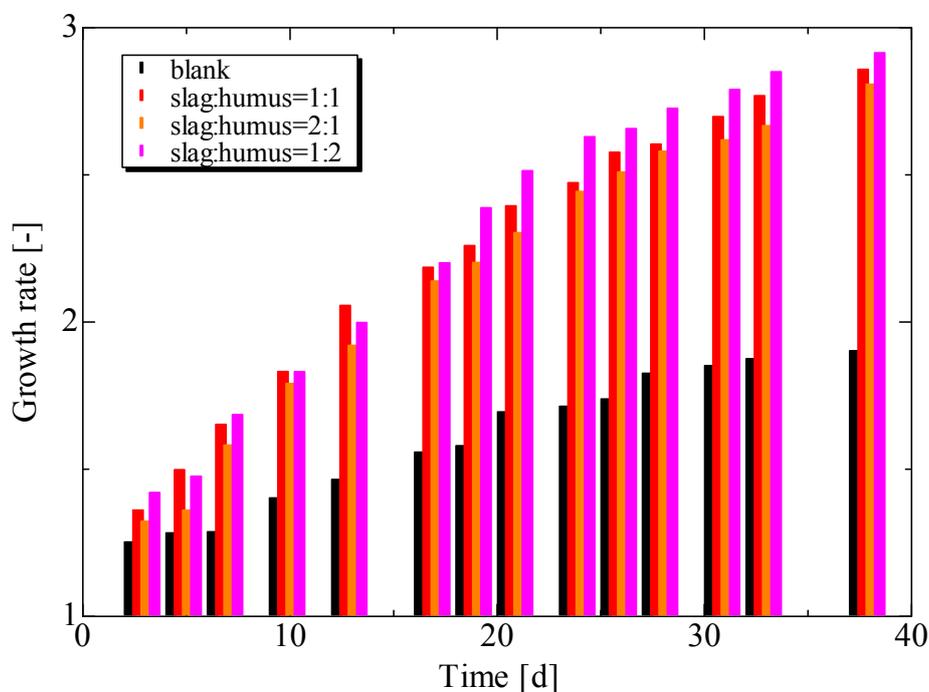


図 4.3.2-5 海藻の成長速度に与える腐植物質の影響

は海藻成長率にそれほど大きな違いはないことも示されている。室内溶出試験結果について鉄溶出促進とともに溶出の長期継続性の観点で有利であると記載した通り、混合比に関しては鉄溶出量と寿命の両方の観点から検討する必要があると考えられる。したがって、実海域においてスラグと腐植物質比が1 : 1のものを利用していることは、この観点からも妥当と言えると考えられる。

(4) まとめ

多年生海藻であるアラムの成長に及ぼす鉄の影響に関して、室内での海藻生育試験によって検討を行った。その結果、栄養塩がある程度存在する条件下においても海藻成長促進に鉄は効果のあることが確認された。また 4.3.1 章の鉄溶出試験結果と実証試験で得られている結果とをつなぐ成果を得ることを視野に入れ、製鋼スラグのみ、腐植物質のみ、製鋼スラグ+腐植物質の試料から溶出する鉄を利用して、実海水による海藻生育試験を行った。その結果、製鋼スラグと腐植物質の混合によって海藻生育も促進することが確認され、鉄分供給ユニットによる生態系修復技術の有用性を示す有用なデータを得ることができた。これらの結果は、鉄溶出試験結果や実証試験の結果とも矛盾しないものである。今後に関しては、海水中の栄養塩濃度等が鉄添加効果に及ぼす影響をより詳細に検討することで、生態系修復技術の有用性を示すだけでなく、海藻生育への鉄添加効果に関する体系的なデータが得られることが期待される。

4. 3. 3 実海域での実証的検討

(1) 背景と目的

製鋼スラグと腐植様物質を用いた藻場再生技術における課題としては、全国各地で実証試験・事業が行われている中で、海域ごとの鉄分供給ユニット導入の効果について、生態調査をはじめとして体系的な検討・評価がこれまで十分に行えていないことにあった。本研究においては、北海道とは気候や海藻種が異なる海域での藻場再生技術の効果を確認することを旨とし、特にコンブ場以外の多年生の海藻群落場での評価を行うことを目的として、実証試験を実施した。実施場所を選定するにあたり、以下の 1)~3)の条件の場所を満たす海域として、三重県志摩市の海岸を選定し、実海域での実証的検討を行った。

- 1) 海藻群落が衰退・消失している温帯域の海域であること
- 2) 多年生海藻が生育しているアラメ・カジメ場やガラモ場であること
- 3) 鉄分供給ユニット（製鋼スラグ+腐植物質）の効果について、対照区などが設置できる比較的長い海岸線を有していること

(2) 事前調査・環境モニタリング

実証試験は平成 22 年 12 月に開始をしたが、実験開始前に対象海域の事前調査・環境モニタリングを実施して、この海域の特性についての把握を試みた。

「第 7 回自然環境保全基礎調査 浅海域生態系調査（藻場調査）報告書」（平成 20 年 9 月）によると、この海域の西側に位置する志摩市志摩町御座地先において、2004 年に藻場調査が実施されている。調査対象地における海藻群落は、ザガラメ・カジメ場であり、アラメ・カジメ属の海中林は一般に外海性の岩礁域において浅所にアラメ属、深所にカジメ属が分布するとされており、この調査でも同様の傾向を示している。東海地方のザガラメ／カジメ海中林は、渥美半島の先端、対岸の鳥羽、志摩半島の太平洋から、尾鷲湾まで分布しているとされている。また三重県が実施した「藻場・干潟等分布状況マップ作成委託業務」（平成 22 年 3 月）においては、航空写真からの藻場分布域判読、既存資料・聞き取り調査、及び現地目視・潜水観察調査による調査結果を報告しており、本フィールド周辺においては、アラメ・カジメが優占する藻場が広く分布するとされている。

以上より、実証試験海域では極端な磯焼け状態でないことは予想されたが、6 月の海中観察・調査においても、北海道日本海側のような磯焼け海域が広がっているのではなく、ザガラメやホンダワラ類が海域に分布している様子が確認された。しかし、地元で行った藻場調査結果では海域全体では藻場の分布域が狭くなっていることが示されており、対象海域は磯焼け状態とは必ずしも言えないものの海藻群落が衰退傾向にある海域であるとは示唆された。したがって実証的検討を行うにあたっては、特に事前調査が重要であると考えられるため、次に示すような沿岸域生態系モニタリング調査を実施することにした。

・モニタリング方法

モニタリング調査は、実証試験においてできるだけ多くの試験区を設置することを踏まえて、図 4.3.3-1 の通り、A～C の 3 区と対照区を設定し、汀線側基点から沖側へ 50m の調査測線を設定した。この測線に沿ってベルトトランセクト調査及びコドラート調査により、海藻類の繁茂状況および動物の生息状況を観察した。調査は 2010 年 11 月 19～20 日の 2 日間にわたって行い、東和環境科学㈱に調査作業は依頼して行った。以下に、2 つの調査の概要を示す。

<ベルトトランセクト調査>

調査測線に沿って観察幅 2m について、藻類・動物ともに連続的に種類数、被度、単位面積あたりの個体数を観察・記録し、水深と底質情報とともに断面図として整理した。また全体状況の把握のために、一定間隔で海底の全景写真を撮影した。

<コドラート調査>

各調査測線において汀線側基点から 5、10、20、30、40、50m の 6 地点にコドラート（方形枠）を設定し、この枠内で確認された生物（藻類、動物）種を記録した。藻類観察は、一辺 50cm のコドラートを用いて、波浪の影響で動く可能性の低い転石を中心に観察位置を設定し、大型海藻（ホンダワラ類、コンブ目）を主に、その他小型海藻についても観察を行った。観察項目は、種類、被度とし、大型海藻に関しては個体数（株数）を計数し、小型海藻に関しては（個体数計測は困難であるため）被度観察のみとした。動物観察は、一辺 1m のコドラートを用いて、基盤の裏側に生息する動物を確認した。観察対象はウニ類、サザエ、アワビ類、小型巻貝とし、種類、個体数を記録した。



図 4.3.3-1 実証試験海域図（Google Map より）

・モニタリング調査結果

ここではベルトトランセクト調査とコドラート調査のうち、測線全体の生物、水深、底質状況の全体的な情報が得られるベルトトランセクト調査の結果を示すこととする。図 4.3.3-2～図 4.3.3-5 は各測線における調査断面模式図を示している。なお、実際に調査を開始したところ、もともと設置した対照区については測線 A～C と底質構成や水深が大きく異なったため、比較的同様の条件である対照区 2 を設置した。ここでは対照区 2 の調査結果を図 4.3.3-5 に示している。各測線の調査結果は以下の通りである。

<測線 A>

水深は、基点から 10m 地点までは水深 0.5m で平坦で、10m 以遠で徐々に深くなり、50m 地点の水深はおよそ 2m であった。底質については、基点から 5m 地点までは大小の礫で構成され、5m 以遠から岩盤や巨礫がみられるようになる。30m 以遠では砂の割合が高くなることが確認された。出現した動物については、バフンウニが各水深帯で確認され、特に 1m 以深の個体数が多い。この他では、ムラサキウニやトコブシなどが確認された。藻類は、ジョロモクが各水深帯で繁茂しており、特に水深 1～2m 付近の被度が高い。この他では、オオバモクやマクサなどが点生していた。

<測線 B>

水深は、基点から 15m 地点までは比較的急勾配で、15m 以遠で徐々に緩やかになり、50m 地点の水深はおよそ 2.5m となる。底質は、基点から 10m 地点までは大礫で構成されており、10m 以遠から岩盤や巨礫がみられるようになり、30m 以遠では小礫の割合が高くなっていった。出現した動物は、測線 A と同様にバフンウニが各水深帯で確認され、特に 1.5m 以深の個体数が多い。この他では、ムラサキウニやアカウニ、トコブシなどが確認された。藻類は、水深 1m 付近でジョロモクの被度が高く、この他では、サガラメやオオバモク、有節サンゴモなどが点生している。

<測線 C>

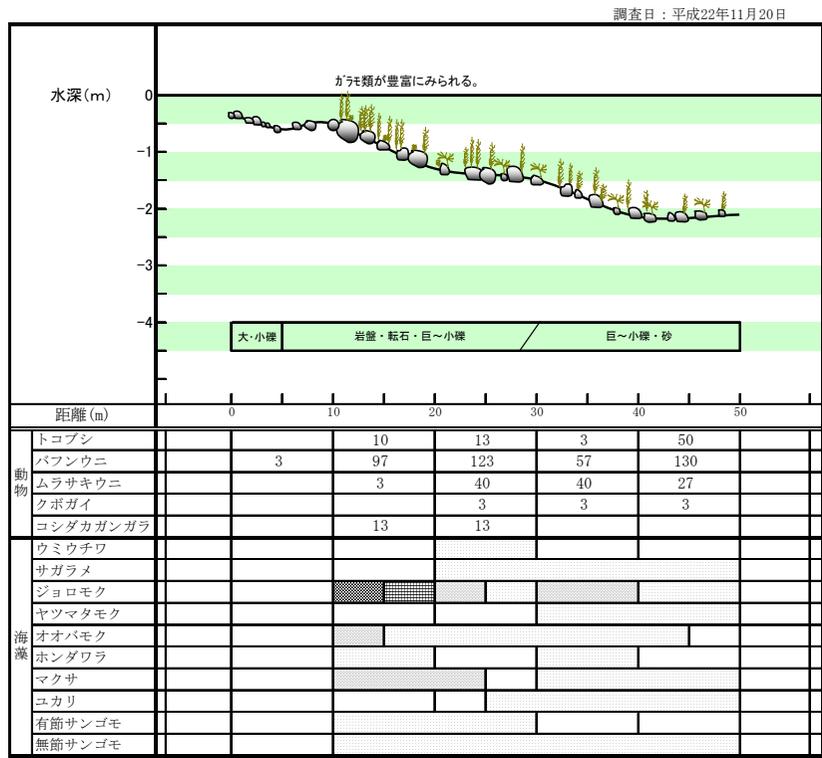
水深は、基点から 20m 地点までは徐々に水深が深くなるが、25m 以遠からは水深約 2m で平坦となる。底質は、基点から 10m 地点までは巨礫～小礫で構成されており、10m 以遠から岩盤がみられるようになる。出現した動物としては、他の測線同様、バフンウニの個体数が多く、基点から 40m までの各水深帯で確認された。この他ではムラサキウニが多くみられた他、岸よりではアカナマコやアカウニが、やや沖側ではサザエやトコブシなどが確認されており、出現種類数が比較的多い傾向がみられた。藻類は、水深 2m 付近でサガラメや有節サンゴモの被度が高く、この他では、他の測線同様、オオバモクなどが点生する。

<対照区 2>

水深は、基点から沖側へほぼ一様勾配で深くなり、50m 地点の水深はおよそ 3.5m で他の測線よりも深い。底質は、基点から 10m 地点までは転石や巨礫～大礫で構成されており、10m 以遠では岩盤がみられるようになる。出現した動物は、バフンウニが各水深帯で確認

された他は、ムラサキウニやトコブシなど他の測線と同様の種類構成となっているが、出現個体数が他の測線よりも多い傾向がみられた。藻類は、水深 1m 以深でサガラメやジョロモク、オオバモク、有節サンゴモなどが確認され、特に水深 1.5m 付近でサガラメの被度が高いことが確認された。

以上の事前調査によって、実証試験海域ではホンダワラ類（ガラモ類）やザガラメ類が汀線からの距離によっては比較的豊富に残っていることが確認された。また磯焼けの持続要因とされている食害を引き起こすウニなどの動物も比較的多く存在することが示された。これらを踏まえると、本藻場再生技術の効果を本フィールド（三重県志摩市）において確認するためには、試験区（測線）、対照区の差を考察することに加え、同じ測線の変化を十分に観察していくことが重要であることが示された。



※動物は単位面積(10m×2m)当たり個体数を表す。底質、海藻は以下の区分による。

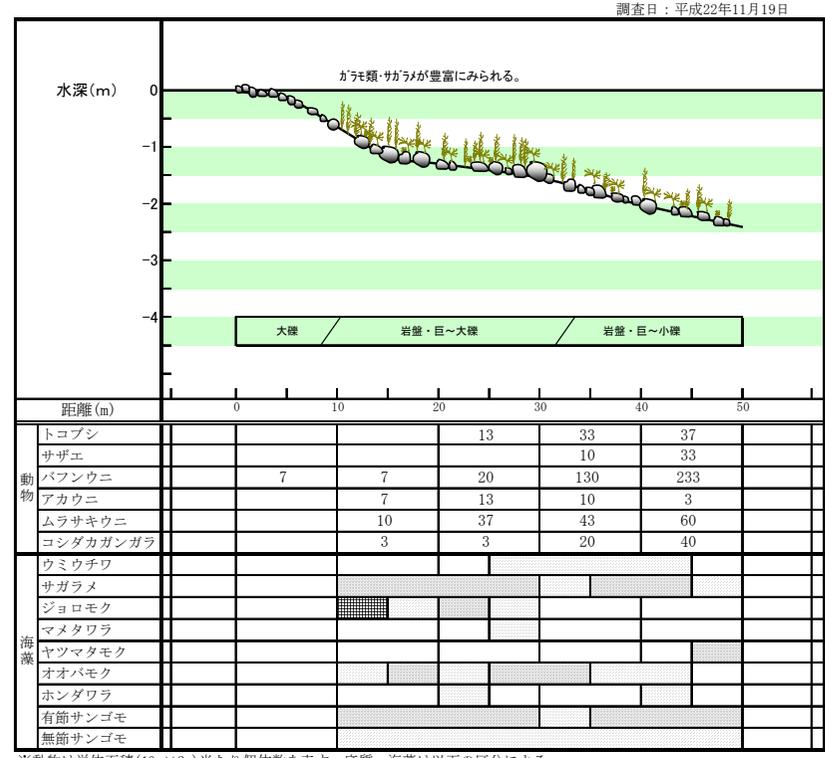
＜底質区分＞

底質類型	区分の基準
岩盤	—
岩塊	等身大以上
巨礫	等身大～大人の頭
大礫	大人の頭～こぶし大
小礫	こぶし大～米粒大
砂	米粒大以下～粒子が認められる程度
泥	粒子がみとめられない

＜植生区分＞

区分	植生率(%)
—	75<
濃生	50～75
疎生	25～50
点生	5～25
ごく点生	<5

図 4.3.3-2 調査断面模式図 (測線 A)



※動物は単位面積(10m×2m)当たり個体数を表す。底質、海藻は以下の区分による。

＜底質区分＞

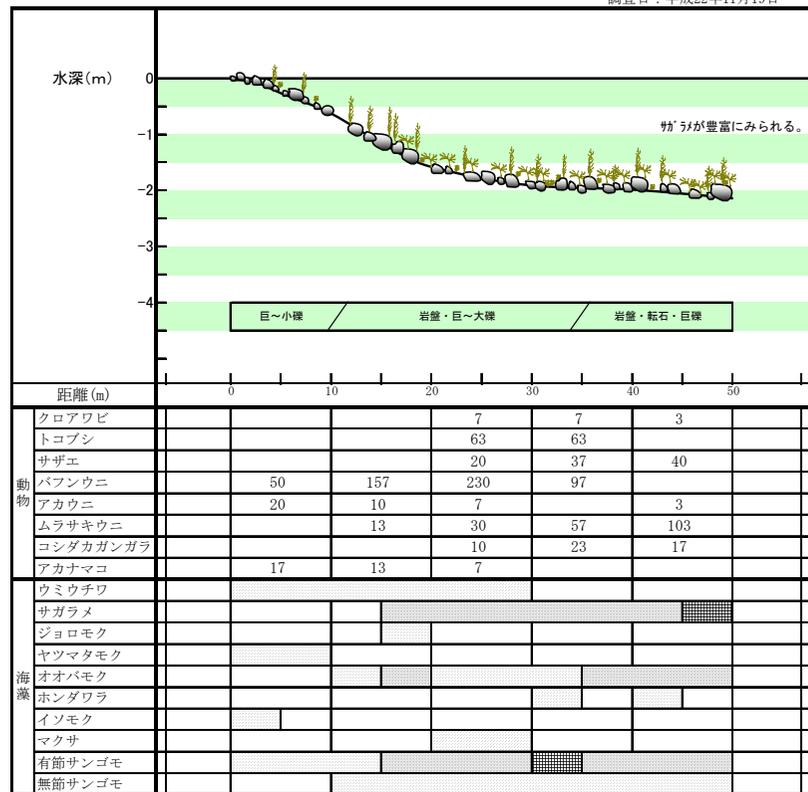
底質類型	区分の基準
岩盤	—
岩塊	等身大以上
巨礫	等身大～大人の頭
大礫	大人の頭～こぶし大
小礫	こぶし大～米粒大
砂	米粒大以下～粒子が認められる程度
泥	粒子がみとめられない

＜植生区分＞

区分	植生率(%)
—	75<
濃生	50～75
疎生	25～50
点生	5～25
ごく点生	<5

図 4.3.3-3 調査断面模式図 (測線 B)

調査日：平成22年11月19日



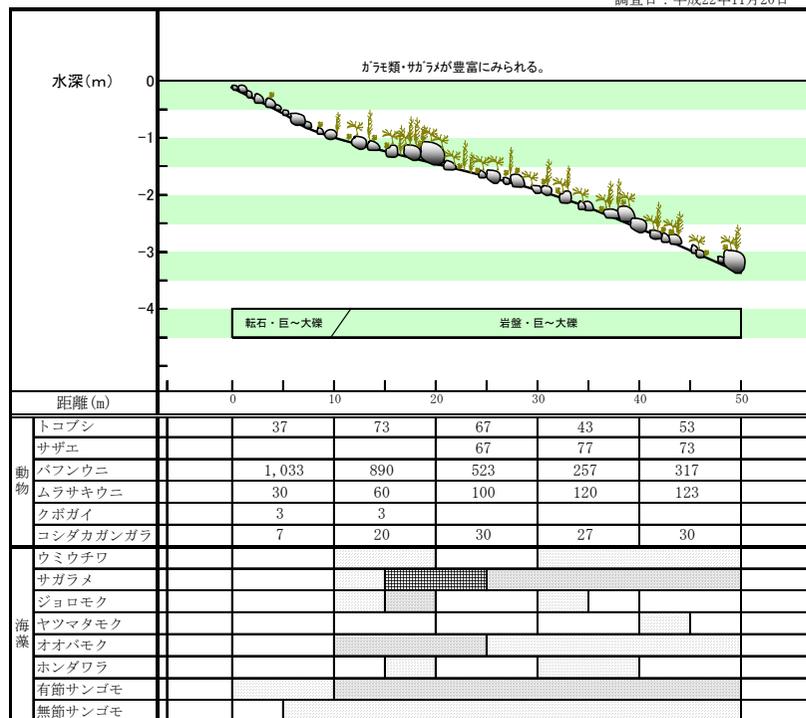
※動物は単位面積(10m×2m)当たり個体数を表す。底質、海藻は以下の区分による。

＜底質区分＞	
底質類型	区分の基準
岩盤	—
岩塊	等身大以上
巨礫	等身大~大人の頭
大礫	大人の頭~こぶし大
小礫	こぶし大~米粒大
砂	米粒大以下~粒子が認められる程度
泥	粒子がみとめられない

＜植生区分＞		
区分	植生	植被率(%)
濃生	75<	
密生	50~75	
疎生	25~50	
点生	5~25	
ごく点生	<5	

図 4.3.3-4 調査断面模式図 (測線 C)

調査日：平成22年11月20日



※動物は単位面積(10m×2m)当たり個体数を表す。底質、海藻は以下の区分による。

＜底質区分＞	
底質類型	区分の基準
岩盤	—
岩塊	等身大以上
巨礫	等身大~大人の頭
大礫	大人の頭~こぶし大
小礫	こぶし大~米粒大
砂	米粒大以下~粒子が認められる程度
泥	粒子がみとめられない

＜植生区分＞		
区分	植生	植被率(%)
濃生	75<	
密生	50~75	
疎生	25~50	
点生	5~25	
ごく点生	<5	

図 4.3.3-5 調査断面模式図 (対照区 2)

4. 3. 4 実証実験

(1) 試験方法

事前調査を行った図 4.3.3-1 の海域において、実証試験では測線 A～C をそれぞれ試験区 A～C として、それぞれの海岸線に以下の 3 条件で作製したユニットを埋設して実証試験を行った。ユニットに関しては、新日本製鐵株により提供を受けた他、地元漁業協同組合や建設会社等から大きな協力を受けて設置された。

試験区 A：製鋼スラグのみ

試験区 B：製鋼スラグ＋腐植物質

試験区 C：腐植物質のみ

生態系の変化に関する評価方法としては、事前調査と同様にコドラート調査とベルトトランセクト調査の 2 種類を主に用いた。

(2) 結果と考察

・生態調査

実証試験開始後、平成 23 年 3 月、平成 23 年 11 月、平成 24 年 3 月の 3 回にわたって生態系調査を実施した。特に平成 23 年 11 月に関しては、事前調査を平成 22 年 11 月に実施していることから、実証試験の効果を確認する意味で重要な調査であった。しかしながら、結果としては実証試験開始前後で海藻生育への優位な差は認められたとすぐに判断することは難しい結果となった。これは実験海域における地形（海底を含む）や沿岸の流れの関係によるものと推測されるほか、実験を行うにあたっての制約によって当初予定のユニット量を埋設できなかったことにも起因すると推測される。一方でこの海域は海藻量の減少はみられているとのことであったが、先に述べた通り、事前調査からは磯焼け海域とは言えない結果が得られているため、鉄分供給ユニット埋設効果の検討には、対照区との比較よりも試験区における実験開始後の変化に関して定期的にモニタリングを行う方が有用と考えられる。

そこでここでは、製鋼スラグ＋腐植物質の鉄分供給ユニットを設置した試験区 B に絞り、実験開始前後のベルトトランセクト調査とコドラート調査の結果について考察することとする。図 4.3.4-1～図 4.3.4-3 にベルトトランセクト調査で得られた試験区 B の調査断面模式図、表 4.3.4-1 と表 4.3.4-2 にコドラート調査結果（海藻被度）を示す。コドラート調査は、各調査地点においてコドラート(方形枠)を 3 箇所設定して、この枠内で確認された生物種を記録した。

<ベルトトランセクト調査>

平成 23 年 11 月の調査の結果について以下に示す（事前調査に結果に関しては、(2)事前調査・環境モニタリングの測線 B の記述を参照）。水深は、事前調査とほぼ同様に、基点から 15m 地点までは比較的急勾配で、15m 以遠で徐々に緩やかになり、50m 地点の水深はおよそ 2.5m となった。底質は、基点から 10m 地点までは主に大礫で構成されており、10m

以遠から岩盤や巨礫がみられるようになる。動物は、水深 1m 付近からバフンウニやアカウニ、コシダカガンガラなどが出現し、約 1.5m 以深ではトコブシやムラサキウニが確認された。バフンウニは水深 2m 以深でもみられており、この水深帯での個体数が多い。藻類は、ジョロモクが水深 1m 付近で比較的多く、それより水深 1.5m 付近まで散見された。この他ではサガラメやオオバモク、ホンダワラなどが認められた。海底面には有節サンゴモや無節サンゴモの着生がみられた。

<コドラート調査>

— 事前調査 —

海藻被度については、出現種類数は 20 種であり、褐藻類では 10m 地点におけるジョロモクの被度が高く、この他ではオオバモクやサガラメなどがみられた。紅藻類ではヘリトリカニノテ属の被度が 10% 以上であった他はいずれも被度は低かった（表 4.3.4-1）。

— 平成 23 年 11 月調査 —

出現種類数は 23 種であり、事前調査結果よりも 3 種多い。褐藻類ではオオバモク、ジョロモクの被度が高く、この他ではサガラメ、ヤツマタモク、ホンダワラなどがみられた。紅藻類では、ヘリトリカニノテ属の被度が 20m 地点より沖側で 10% 以上であったが、他の種の被度はいずれも低いものであった。また、被度は低いものの、緑藻類のシオグサ属も確認された。（表 4.3.4-2）。

<試験開始前後の比較・考察>

事前調査結果と平成 23 年 11 月の調査結果について、種類数および種構成を比較すると、試験区 B では 20 種から 23 種へ 3 種増加したことが確認された。（なお対照区 2 では減少していた。）また、ベルトトランセクト調査では試験区 B では種数に変化がなかった一方で、種の構成比率について比較すると極端な変化は見られなかった。種類数の増減傾向として、種類数が増えた試験区 B では紅藻類の占める割合が増加していた。種類数は、海域全体としては同程度か減少の傾向であったが、事前調査時より大型海藻が繁茂し、良好な藻場が形成されていた。

事前調査と比較して種類数、被度が減少した原因として、比較的種類数の多い浅い海底を、基質から剥離した大型のサガラメが覆っていたことが挙げられる。このサガラメはほとんどが年齢 3 年以上の葉体長が 1 m を越えるような「老成個体」であった。サガラメは本海域におけるコンブ目藻類の代表的な海藻であり、着生より 5 年前後成育する多年生藻類である。このサガラメの卓越年級群である個体が、一時的な流動環境（波浪等）によって一気に岩礁より剥離、浮遊したと考えられる。また試験海域は波当たりの強い場所であり、波浪やそれに伴う石礫の揺れ動きにより着生基質が研磨され、海藻類の剥離を促したことも考えられた。

いずれにしても、北海道増毛町での実証試験結果のように顕著な効果は、少なくとも試験開始後 1 年目の状態では確認できなかった。海域の溶存鉄濃度について合わせて測定（分析は有明高専劉教授に依頼）したが、平成 23 年 11 月の調査時は、試験区 B と対照区 2 に

は顕著な差が見られなかったこともあり、鉄の拡散が不十分である可能性も示唆された。試験開始直後は海域の鉄濃度が上昇したことは推察されるが、プランクトンによる鉄吸収等も溶存鉄濃度がそれほど上がらない要因として考えられるため、今後詳細な検討を行う必要が示された。また今回の試験においては、これまでの各地での実証試験の実績も踏まえてユニット供給量を決めたが、藻場修復に必要なユニット量については4. 3. 1章における溶出試験結果で得られる溶出量に関する知見、屋外水槽試験における腐植物質側の検討で得られる知見を活かすとともに、海域の環境特性（流れ、プランクトン存在量等）を考慮した上で検討することが重要であることが改めて示された。一方で、今回の試験海域において海域の波浪等の状況から、試験開始後翌年にすぐに効果が確認されることが難しいことは、平成23年3月の調査段階で予想されていた。したがって、平成23年11月の調査の際に、新たに試験区と対照区に基質を投入し、基質への海藻着生状況から鉄分供給ユニットの効果を検討することにした。

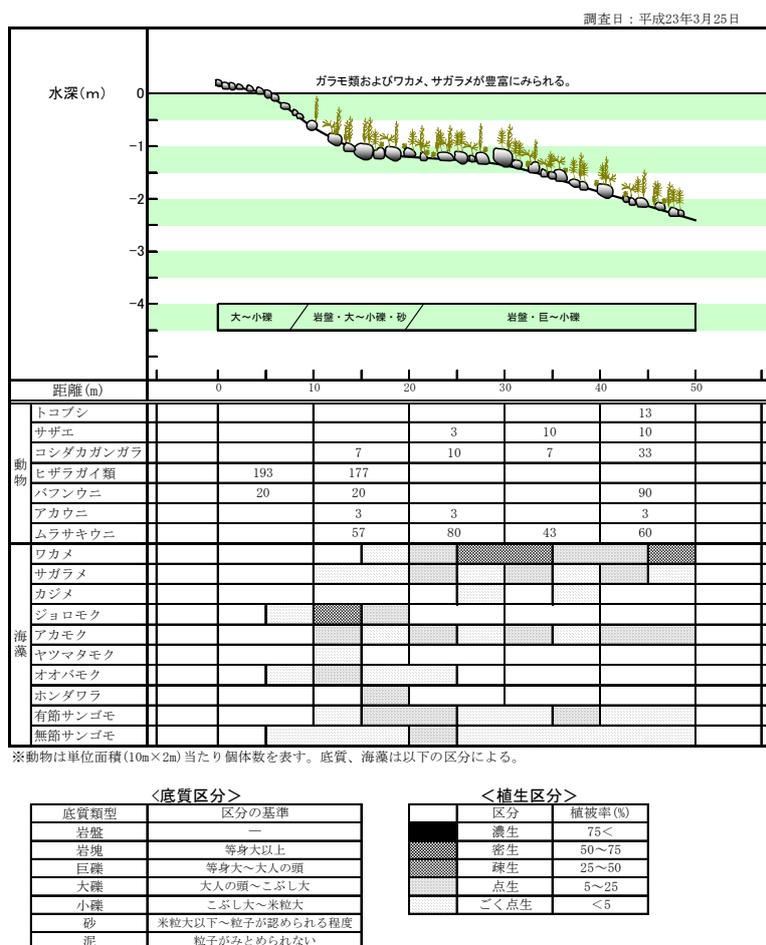
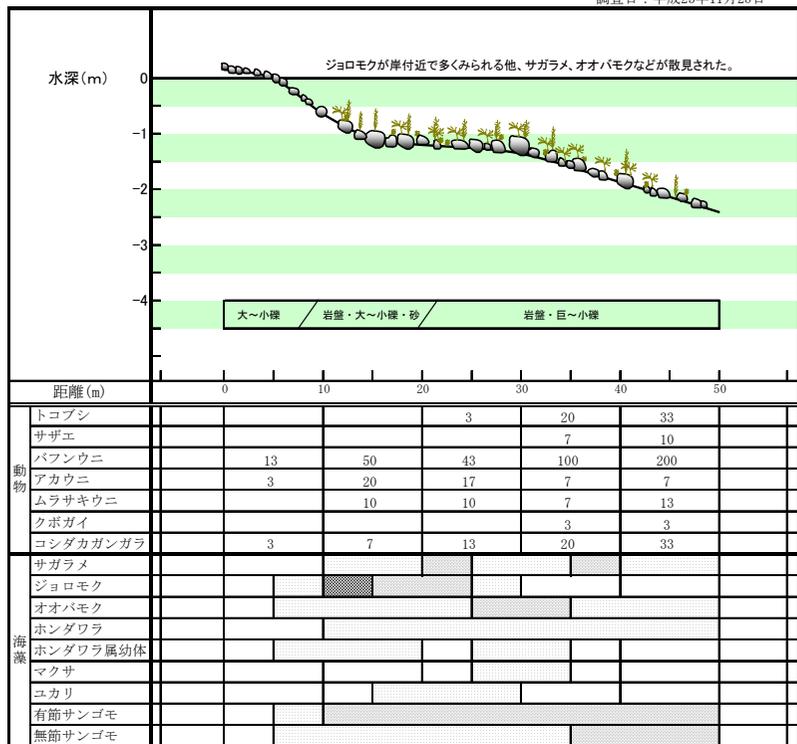


図 4.3.4-1 試験区 B における調査断面模式図 (平成 23 年 3 月)

調査日：平成23年11月25日



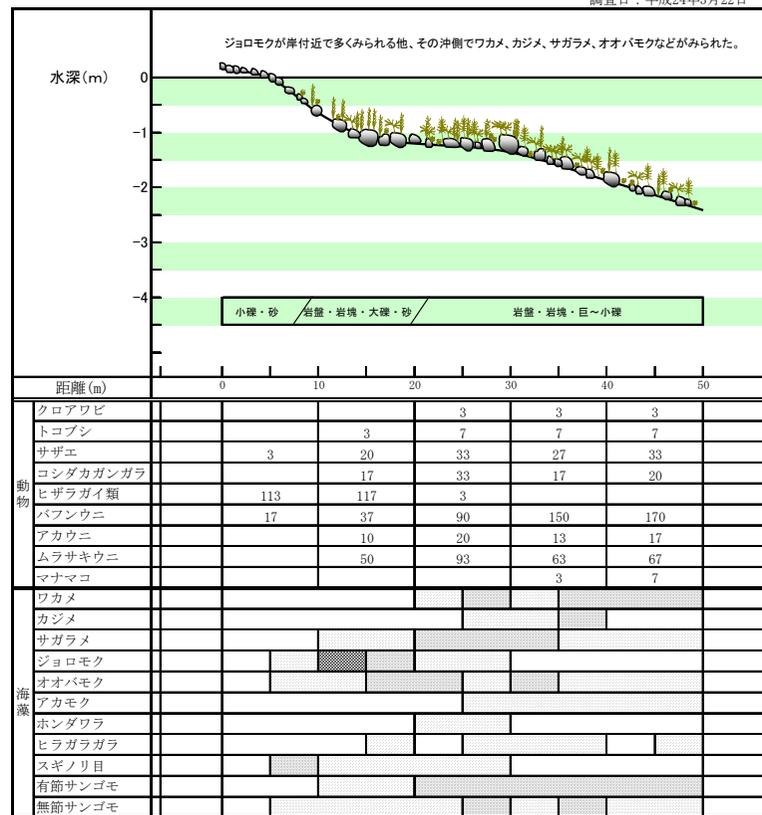
※動物は単位面積(10m×2m)当たり個体数を表す。底質、海藻は以下の区分による。

＜底質区分＞	
底質類型	区分の基準
岩盤	—
岩塊	等身大以上
巨礫	等身大～大人の頭
大礫	大人の頭～こぶし大
小礫	こぶし大～米粒大
砂	米粒大以下～粒子が認められる程度
泥	粒子がみとめられない

＜植生区分＞		
区分	植生	植被率(%)
濃生	75<	
密生	50～75	
疎生	25～50	
点生	5～25	
ごく点生	<5	

図 4.3.4-2 試験区 B における調査断面模式図 (平成 23 年 11 月)

調査日：平成24年3月22日



※動物は単位面積(10m×2m)当たり個体数を表す。底質、海藻は以下の区分による。

＜底質区分＞	
底質類型	区分の基準
岩盤	—
岩塊	等身大以上
巨礫	等身大～大人の頭
大礫	大人の頭～こぶし大
小礫	こぶし大～米粒大
砂	米粒大以下～粒子が認められる程度
泥	粒子がみとめられない

＜植生区分＞		
区分	植生	植被率(%)
濃生	75<	
密生	50～75	
疎生	25～50	
点生	5～25	
ごく点生	<5	

図 4.3.4-3 試験区 B における調査断面模式図 (平成 24 年 3 月)

表 4.3.4-2 試験区Bにおけるコドラート調査結果 (平成 23 年 11 月)

種類	ラインNo ＼ 離岸距離	A					B					C					対照1					対照2										
		5m	10m	20m	30m	40m	50m	5m	10m	20m	30m	40m	50m	5m	10m	20m	30m	40m	50m	5m	10m	20m	30m	40m	50m	5m	10m	20m	30m	40m	50m	
緑藻綱 褐藻綱	シオグサ属							R																								
	ウミウチワ		R	R				R	R	R						R				R	R				R	R						
	フクロノリ								R																							
	アミジクサ科								R			R												R								
	カジメ												3.3 0.3				8.3 0.7															
	サガラメ				8.3						3.3	1.7	6.7			3.3	11.7	6.7	25.0					3.3		20.0	36.7	5.0	11.7			
	被度				0.7						0.3	0.3	0.3			0.3	0.7	0.3	2.7					0.3								
	株数																															
	コンブ科								R															R			R				1.7	
	被度								0.3															0.3			0.3				0.3	
	株数																															
	オオバモク			6.7	5.0	10.0	8.3	6.7			15.0	8.3	8.3			3.3	8.3	1.7		6.7	3.3	21.7	21.7	16.7		15.0	R	3.3	15.0			
	被度			0.3	2.0	1.7	0.3	1.0			3.7	0.7	0.3			0.3	0.7	0.7		0.3	0.3	1.7	2.3	1.0		2.3	0.3	1.0	1.7			
	株数																															
	ジョロモク			16.7		16.7		33.3	5.0							25.0				6.7	8.3	10.0		1.7								
被度			1.0		2.0		4.7	1.0							2.0				1.3	1.7	2.0		0.3									
株数																																
ヤツタモク				5.0	1.7						R	3.3								6.7	8.3		16.7						6.7			
被度				0.7	0.3						0.3	1.3								1.7	1.0		2.0						4.0			
株数																																
マメタワラ										5.0													5.0									
被度										1.7													0.7									
株数																																
ホンダワラ				R		R		6.7	6.7	R										1.7	5.0	1.7	3.3				R					
被度				0.3		0.3		3.0	3.0	0.3										0.7	1.0	1.3	2.0				0.3					
株数																																
ホンダワラ属幼体			R	R			R	R		R							R	R	R	R	R	R	R		5.0	R		R				
被度			0.7	0.3			2.3	0.7		0.7							2.3	0.7	1.7	1.3	0.7	1.0	4.7	5.7	15.7	1.0		0.3				
株数																																
紅藻綱	ヒラガラガラ				R	R	R			R	R		R		R	R																
	オキツノリ							1.7																								
	オキツノリ科		R	1.7	R										R						1.7	R	R	R	R							
	マクサ			R	R	11.7	11.7	R			1.7		R											5.0	R	R						
	テングサ科			R								R																				
	カギイバラノリ		R																													
	スキノリ属		R	R				R																								
	ユカリ			R	R	R	R		R	R	R	R																				
	ホソユカリ																															
	ワツナギソウ属																															
	エツキイワノカワ															R																
	ヘトリカニノテ属		R	3.3	10.0	R	R	R	13.3	13.3	23.3	11.7				8.3	18.3	13.3	18.3	R	1.7	1.7	3.3	3.3	R			23.3	26.7	16.7	10.0	
	被度		R	1.7	5.0	R	R	R	10.0	1.7	6.7	R				13.3	8.3	5.0	11.7	R	R	R	R	R	R			R	5.0	R	R	
	株数																															
	ヒライボ								R	R																						
無節サンゴモ		R	R	R	R	R	R	R	5.0	1.7	13.3	R	R	3.3	8.3	6.7	8.3	R	1.7	1.7	R	R	R			5.0	10.0	R	8.3	10.0		
種類数																																

調査日:平成23年11月24、25日

単位:%(株数除く)

ここで、被度は調査結果がRのみの場合はRとし、3枠のうち1枠でもR以上確認された地点はRを0として算出した。

・海藻類着生試験

<方法>

新たな海藻類の着生状況を把握することを目的として調査区 A～C と対照区 2 において建材ブロックを図 4.3.4-4 のように設置した。投入場所は、ユニットの埋設位置や波浪の影響、現在の海藻類の繁茂状況などを勘案して、各調査測線における汀線側基点から約 15～18m の地点とした。

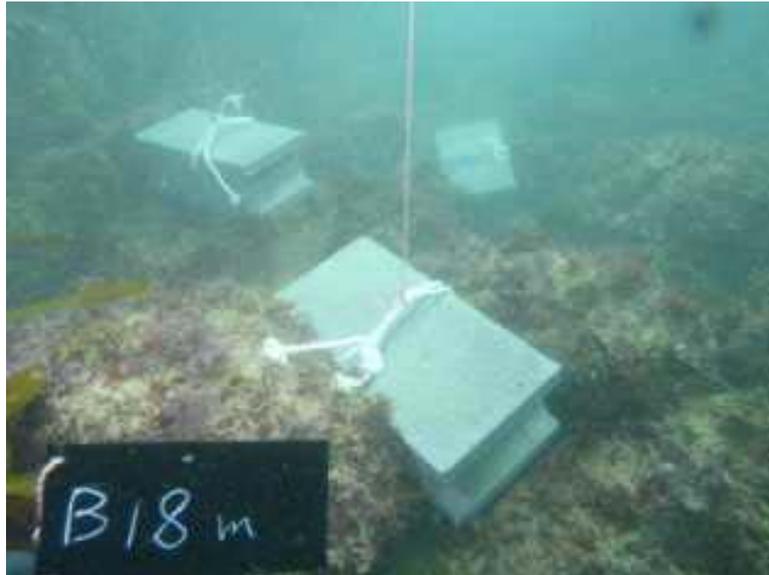


図 4.3.4-4 試験区 B に設置された基材（建材ブロック）

<結果と考察>

表 4.3.4-3 に試験区 B と対照区 2 に着生した海藻種類と湿重量の結果を示す。この結果だけ見ると、対照区 2 よりも試験区 B の方が着生は良く、鉄分供給ユニットの効果であるように見える。しかし対照区 2 については、設置した 3 個の基材のうち 1 つが流失をしてしまっており、他の 2 つの基材についても波浪によって位置が大きく移動し、表面に着生した海藻が流失したことが観察された。これは試験区 B についても基材の湿重量が 3 つとも大きく異なることから見て取れる。但し、基材には緑藻、褐藻、そして紅藻に至るまで多くの海藻が着生していることが確認される中で、対照区 2 に着生していて試験区 B に着生していない種類も存在することが示されている。このように客観的に鉄分供給ユニットの効果の差を判断できる結果は得られなかったが、本方法は実証的検討を行う上で有効な手段となり得ることは示唆された。

表 4.3.4-3 海藻着生試験結果（平成 24 年 3 月）

綱	目	科	種名	試験区B			対照区2			
				1	2	3	1	2	3	
緑藻	アオサ	アオサ	<i>Enteromorpha</i> sp.	アオノリ属	1.53	2.78	0.85			
			<i>Ulva</i> sp.	アオサ属			0.20			
	シオグサ	シオグサ	Cladophoraceae	シオグサ科	0.06	0.15	0.11			
	ハネモ	ハネモ	Bryopsidaceae	ハネモ科	0.04		0.08			
褐藻	アミジグサ	アミジグサ	<i>Dictyopteris prolifera</i>	ヘラヤハズ		0.11				
			<i>Gelidium sinuosa</i>	フクロノリ		4.00	25.99			
	ムチモ	ムチモ	<i>Cutleria cylindrica</i>	ムチモ		0.07	1.51			
紅藻	テングサ	テングサ	<i>Gelidium elegans</i>	マクサ	5.65	138.23	40.64	0.48	0.63	
			<i>Pterocladia tenuis</i>	オバクサ				0.23		
			<i>Acanthopeltis japonica</i>	ユイキリ						
			<i>Gelidium japonicum</i>	オニクサ				0.81		
			Gelidiaceae	テングサ科						
	サンゴモ	サンゴモ	<i>Amphiroa</i> sp.	カニノテ属	0.01	0.01	0.01			
			Corallinaceae	サンゴモ科			0.44	0.02		
	スギノリ	オキツノリ	Phylloporaceae	オキツノリ科						
		スギノリ	<i>Chondracanthus tenella</i>	スギノリ		1.71				
			<i>Chondrus ocellatus</i>	ツノマタ						
			イバラノリ	<i>Hypnea japonica</i>	カギイバラノリ	0.07	0.20			
			ユカリ	<i>Plocamium telfairiae</i>	ユカリ	1.21	0.62	0.94		
			GIGARTINALES	スギノリ目						
	オゴノリ	オゴノリ	<i>Gracilaria textorii</i>	カバノリ						
	マサゴシバリ	ワツナギソウ	<i>Champia japonica</i>	ヘラワツナギソウ			1.76			
	イギス	コノハノリ	<i>Acrosorium venulosum</i>	カギウスバノリ					0.03	
			Delesseriaceae	コノハノリ科		0.45	0.11			
			<i>Laurencia undulata</i>	コブソウ			0.09			
			CERAMIALES	イギス目						
種類数					7	11	13	4	2	
湿重量 (g/ブロック)					8.57	148.33	72.73	1.54	0.66	

流失

(4) まとめ

太平洋沿岸域である三重県志摩市において、生態系修復技術の実用化に向けた実証試験を実施した。これまでの実証試験においては、海藻種類と湿重量の変化、および溶存鉄濃度などの水質分析が主に調査項目として行われていたが、今回はベルトトランセクト調査やコドラート調査において、海藻以外の生物種についても調査を行った。その結果、生物種・量と海藻群落の関係性についての新たな知見を得ることができた。一方で、鉄分供給ユニットの設置に関しては、設置 1 年後の段階で判断できる効果は確認されなかったが、実証試験を行った海域は多年生海藻が優占種の一つとして存在し、また波浪の影響等も少なくないと考えられることから、複数年にわたってモニタリング調査を行う必要性が示唆された。また基材投入による海藻着生試験も方法自体は有効な手段であることが示され、今後の継続的な調査によって新たな知見が得られる可能性が示唆された。

4. 3. 5 実証的検討のまとめ

本課題においては、製鋼スラグと腐植様物質を利用した生態系修復技術の確立に向けて、特に実海域における効果の検証を行うことを目的として研究を実施した。その目的達成のために、(1) 製鋼スラグと腐植様物質の海水への溶出特性評価、(2) 海藻生育試験による鉄添加効果の検討、(3) 実海域での実証的検討を実施した。

(1)については、実験室内での鉄溶出試験および北海道増毛町にて実海水による屋外水槽試験を実施した。その結果、室内溶出試験からは、製鋼スラグへの腐植物質の混合は、鉄溶出促進、長寿命化、そして pH 上昇抑制の三点から有利であることが示された。屋外水槽試験からは、鉄溶出に関しては製鋼スラグと腐植物質の混合によって鉄溶出量が増加する結果が得られ、これまでの研究結果を支持する成果が得られた。また栄養塩 (N, P) についても、製鋼スラグとの混合によって溶出量が増加する可能性が示唆された。重金属濃度に関しては、今回の条件では、環境基準値と比較して問題のあるデータは得られず、鉄分供給ユニットからの溶存鉄、栄養塩、重金属溶出に関する有用な知見を得ることができた。

(2)に関しては、多年生海藻であるアラメの成長に及ぼす鉄の影響に関して、室内での海藻生育試験によって検討を行った。その結果、栄養塩 (N, P) がある程度存在する条件下においても海藻成長促進に鉄は効果のあることが確認された。また製鋼スラグのみ、腐植物質のみ、製鋼スラグ+腐植物質の試料から溶出する鉄を利用して、実海水による海藻生育試験を行った。その結果、製鋼スラグと腐植物質の混合によって海藻生育も促進することが確認された。このように、鉄分供給ユニットによる生態系修復技術の有用性を示す結果が得られ、生態系修復技術の有用性を示す結果が示された。

(3)については、三重県志摩市で実証試験を実施した。新たにベルトトランセクト調査やコドラート調査において、海藻以外の生物種についても検討を行った結果、生物種や量と海藻群落の関係性についての新たな知見を得ることができた。鉄分供給ユニットの効果については、設置 1 年後の段階で判断できる結果は得られなかったが、複数年にわたってモニタリング調査を行うことで新たな知見が得られることが期待される。

参考文献

- 1) 山本光夫, 濱砂信之, 福嶋正巳, 沖田伸介, 堀家茂一, 木曾英滋, 渋谷正信, 定方正毅「スラグと腐植物質による磯焼け回復技術に関する研究」日本エネルギー学会誌, **85**(12) (2006), 971-978
- 2) M. Yamamoto, M. Fukushima, E. Kiso, T. Kato, M. Shibuya, S. Horiya, A. Nishida, K. Otsuka, and T. Komai, "Application of Iron-Humate to a Coastal Area of Barren Ground for Restoring Seaweed Bed", *J. Chem. Eng. Jpn.*, **43**(7) (2010) 627-634.
- 3) 山本光夫, 桑野和可, 須川英之, 笠原 勉, 堀家茂一, 劉 丹「腐植物質-鉄錯体を利用した藻場再生技術の九州沿岸海域における有効性評価」第 18 回日本エネルギー学会大会講演論文集 (2009) 170-171.

- 4) 山本光夫「鉄鋼スラグと未利用バイオマスによる『海の森』の再生」*化学工学 (特集 森と水の化学工学)*, **73**(8) (2009) 390-394.
- 5) M. Yamamoto, A. Nishida, K. Otsuka, T. Komai, and M. Fukushima, “Evaluation of binding abilities of iron(II) to humic substances derived from a compost sample by a colorimetric method using ferrozine”, *Bioresour. Technol.* **101**(2010) 4456-4460.
- 6) M. Fukushima, K. Yamamoto, K. Otsuka, T. Komai, T. Aramaki, S. Ueda, S. Horiya, “Effect of the maturity of wood waste composts on the structural features of humic acids”, *Bioresour. Technol.* **100** (2009) 791-797.
- 7) 山本光夫, 福嶋正巳, 劉丹「製鋼スラグを利用した藻場再生技術における腐植物質の鉄溶出への影響」*鉄と鋼*, **97**(3) (2011) 159-164.
- 8) 山本民次, 鈴木正巳, 呉硯津, 松田治「製鋼スラグからのリン, 珪素の溶出とそれらが植物プランクトン自然群集の増殖に及ぼす影響」*鉄と鋼*, **89** (2003) 102-108.
- 9) 駒井武, 川辺能成, 原淳子, 大塚敬嗣「製鋼スラグと腐植物質による生態系修復技術の受容性」*日本エネルギー学会誌*, **90** (2011) 449-454.
- 10) T. Motomura and Y. Sakai, “Effect of Chelated Iron in Culture Media on Oogenesis in *Laminaria angustata*”, *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **47**(12)

5. 結論と課題

5. 1 結論

製鋼スラグと腐植物質の相互作用に関する実証的な検討を進め、溶出特性や錯体形成に関する室内実験、腐植物質の構造解析と実際の海水環境条件に基づく錯形成能の評価、さらには海洋を模擬した各種試験を実施して、生態系修復効果を検証した。実海水を用いた標準的な試験では、重金属の溶出はほとんど認められず、環境安全品質基準（港湾用途溶出量基準）を大きく下回ることが分かった。これらの検討を通じて、海域に循環資材を適用するための標準的な試験法を提案するとともに、製鋼スラグと腐植物質を活用した生態系修復効果および環境リスク評価を実施する上での基盤データを整備することができた。

製鋼スラグと腐植物質の相互作用により、海洋生態系に必須の溶存鉄を大量に供給することが可能であり、腐植酸鉄の化学形態により沿岸域から海洋に効率的に輸送できることが分かった。また、鉄の生成機構および実海域での実証的検討によって、製鋼スラグと腐植物質の混合効果に関して、鉄溶出と海藻生育の関係に相関性があることが確認された。実海域における生態系修復に関する環境モニタリングを実施し、実用化に向けて科学的な知見を蓄積することができた。

これらの一連の研究により、製鋼スラグの実海域での導入に向けての実証試験と環境リスク評価手法を確立した。また、上記の各種データや標準的な試験法の提案に基づいて、以下に示すような製鋼スラグと腐植物質の環境安全品質基準に関わる技術的な指針を作成した。

5. 2 技術的指針のまとめ

製鋼スラグと腐植物質の混合物を海域の藻場再生のために使用するための環境安全品質に関する技術指針について、藻場再生のために使用される海域環境を想定し検討を行い、環境安全品質基準値と試験方法を次のように提案した。

1) 環境安全品質基準の考え方

溶出量試験に対する基準値は、スラグ指針報告書に示される港湾用途溶出量基準とする。含有量試験に対する基準値は、土壌汚染対策法指定基準とする。なお、本提案における含有量基準は直接摂取を想定したものではなく、有害物質を高濃度で含む資材が海域に直接投入されることを防止するために設定する。

2) 曝露環境の考え方

製鋼スラグと腐植物質の混合物の場合、海域で利用後に廃棄または再利用は基本的に想定されないこと、また、利用中は混合物が海水に露出していることから、藻場再生のために施工される海域環境を、最も配慮すべき曝露環境に設定することが適切と考えられる。そのため、曝露の可能性としては、製鋼スラグや腐植物質からの溶出リスクおよび海域環境（資材の直接投入）としての含有リスクの両者を想定することとした。

3) 環境安全品質基準の設定

製鋼スラグを含むスラグ類については、VOC や農薬・PCB 等はスラグの製造工程で熱分解し、重金属等のうちのシアンは分解・揮発してガス側に移行するため、基準設定項目とせず、重金属等のうちのカドミウム、鉛、六価クロム、ヒ素、水銀、セレン、フッ素及びほう素の 8 項目を規定した。本研究で提示された製鋼スラグと腐植物質の混合物の環境安全品質基準（案）を表 5.1 に示す。

表 5.1 製鋼スラグと腐植物質の混合物の環境安全品質基準（案）

項目	溶出量基準 (mg/L)	含有量基準 (mg/L)
カドミウム	0.009 以下	150 以下
鉛	0.03 以下	150 以下
六価クロム	0.15 以下	250 以下
ヒ素	0.03 以下	150 以下
水銀	0.0015 以下	15 以下
セレン	0.03 以下	150 以下
フッ素	15 以下	4000 以下
ほう素	20 以下	4000 以下

4) 検査試験法および手順

試験法および手順の詳細を図 5.1 に示す。溶出量試験は、JIS K0058-1「スラグ類の化学物質試験方法—第 1 部：溶出量試験方法」の第 5 項（利用有姿による攪拌試験）による。ただし、本研究における利用環境は海域に限られることから、溶媒は海水またはそれに準ずるもの（人工海水など）を用いる。なお、溶媒は、溶出液と同じ項目について測定を実施する。含有量試験は、JIS K0058-2「スラグ類の化学物質試験方法—第 2 部：含有量試験方法」による。

溶出量試験と含有量試験に用いる試料は利用形態を模擬して、実際の配合割合で他の材料と混合するなどした状態（利用模擬試料）を基本とすることとしている。本研究の場合は、製鋼スラグは数 cm 程度の大きさのものが用いられ、また、腐植物質として堆肥などが製鋼スラグと混合されて使用される。溶出量試験では、製鋼スラグは粉碎や粒度調整を行わずに、実際に使用されるものと同じ状態のものを用いることとする。また、腐植物質との配合割合が決定済みの場合は、その割合に基づき両者を配合した試料について試験を行うこととする。ただし、製鋼スラグと腐植物質中の有害物質は、海水を用いた溶出試験により溶出量が減少する傾向にあることが確認され、製鋼スラグを単独で試験に用いることも選択可能とする。

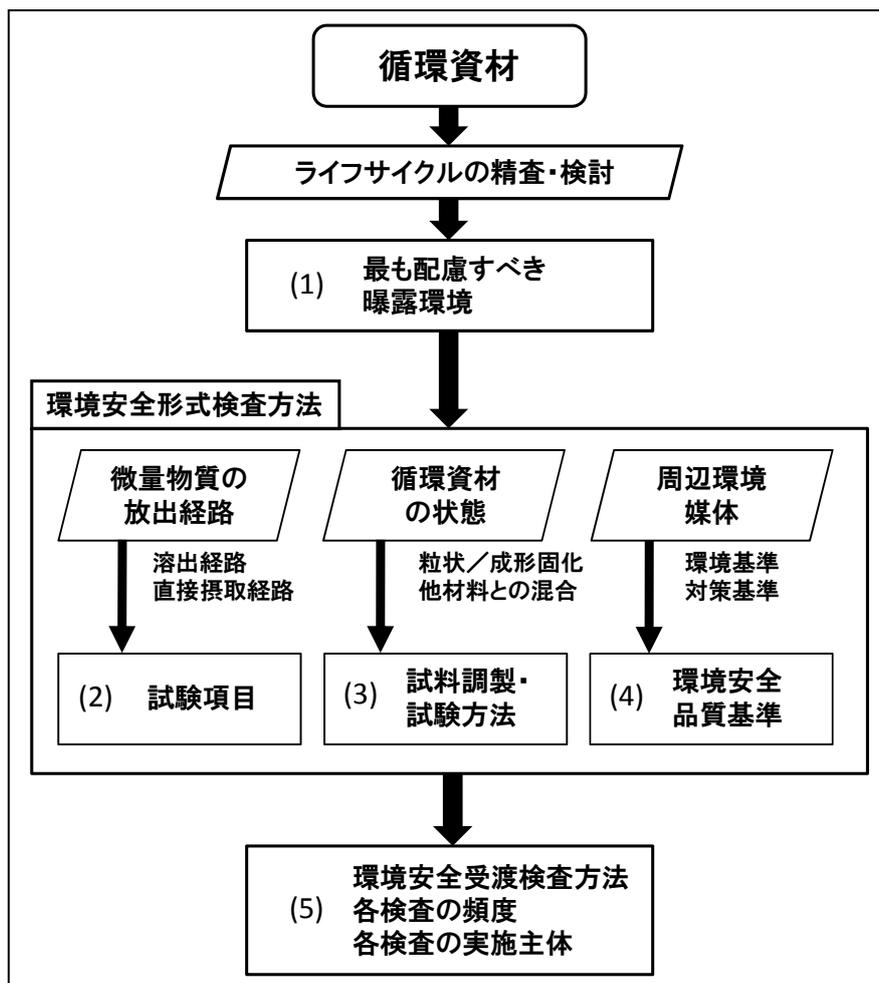


図 5.1 循環資材に環境安全品質と検査方法を設定するための手順の概要³⁾

5. 3 成果の社会への貢献

本研究開発では、製鋼スラグと腐植物質の相互作用について実験的および解析的に検討し、双方の資材を混合することにより腐植酸鉄の生成が促進され、海藻などの生態系に大きな便益があることを実証した。また、鉄還元菌などの環境微生物により腐植酸鉄の溶出を促進させる機構を明らかにし、実海域における実証試験や環境モニタリングなどを通じて、生態系修復の効果を定量的に検証した。さらに、製鋼スラグと腐植物質の環境安全性について総合的に検討した結果、これらの資材を混合して使用することにより、鉛、ヒ素、クロムなどの重金属類の溶出が抑制され、環境リスクを低減できることなどを示した。

製鋼スラグを活用した沿岸域の環境修復については、すでに製鉄会社を中心に日本国内で30箇所以上の実証試験が進行している。その多くは、ワカメ、昆布および海草類の繁茂および磯やけの防止を目的として実施されている。しかし、製鋼スラグと腐植物質からの鉄や栄養塩の溶出メカニズムや効果的な施肥の方法などについては明確になっておらず、基盤的な研究開発が強く求められていた。(例えば、日本鉄鋼学会2009シンポジウム)

このような新たな科学的知見や基礎データは、今後実際の海域において磯やけの防止および修復を実施するために、定量的かつ実用的な指針を与える。また、今回の研究において製鋼スラグと腐植物質の効果とリスクに関して標準的な試験法を提案したことにより、海域での使用に関する技術的な指針を確立することができた。これにより、今後業界における製鋼スラグの安全な活用について一定の理解が得られ、生態系修復技術としての適用事例が増加することが期待される。さらに、自治体や漁業関係者などとのリスクコミュニケーションが円滑となり、海域における製鋼スラグと腐植物質の活用が飛躍的に進むことも考えられる。

6. 研究発表等

・研究論文（原著）

- 1) M. Fukushima, K. Yamamoto, K. Ootsuka, T. Aramaki, T. Komai, S. Ueda, K. Horiya, Effects of the maturity of wood-waste compost on the structural features of humic acids, *Bioresource Technology*, 100, 791-797 (2009).
- 2) M. Fukushima, M. Yamamoto, T. Komai, K. Yamamoto, Studies of structural alterations of humic acids from conifer bark residue during composting by pyrolysis-gas chromatography/mass spectrometry using tetramethylammonium hydroxide (TMAH-py-GC/MS), *Journal of Analytical Applied Pyrolysis* 86, 200-206 (2009).
- 3) Mitsuo Yamamoto, Atsushi Nishida, Keishi Otsuka, Takeshi Komai, Masami Fukushima, Evaluation of the binding of iron(II) to humic substances derived from a compost sample by a colorimetric method using ferrozine, *Bioresource Technology*, 101, 4456-4460, (2010).
- 4) 駒井 武、川辺能成、小川桂子、森田佳実、大塚敬嗣：腐植物質を用いた金属元素の錯体形成および腐植酸鉄の長期安定性、*環境地質学論文集*、Vol.18, 209-214, (2009).
- 5) M. Yamamoto, M. Fukushima, T. Komai: Application of Iron Humates to Barren Ground in a Coastal Area for Restoring Seaweed Beds, *JOURNAL OF CHEMICAL ENGINEERING OF JAPAN*, 43, pp.627-634, (2010)
- 6) M. Yamamoto, A. Nishida, K. Otsuka, T. Komai, M. Fukushima, Evaluation of the binding of iron(II) to humic substances derived from a compost sample by a colorimetric method using ferrozine, *Bioresource Technology*, 101, 4456-4460, (2010).
- 7) M. Fukushima, K. Furubayashi, N. Fujisawa, M. Takeuchi, T. Komai, K. Ootsuka, M. Yamamoto, Y. Kawabe, S. Horiya, Characterization of humic acids in sediments from dam reservoirs by pyrolysis-gas chromatography/mass spectrometry using tetramethylammonium hydroxide: Influence of the structural features of humic acids on iron(II) binding capacity, *Journal of Analytical Applied and Pyrolysis*, 91, (2011).
- 8) N. Fujisawa, K. Furubayashi, M. Fukushima, M. Yamamoto, T. Komai, K. Ootsuka, Y. Kawabe, Evaluation of the iron(II)-binding abilities of humic acids by complexometric titration using colorimetry with ortho-phenanthroline, *Humic Substances Research*.
- 9) 駒井 武、福嶋正巳、竹内美緒：ダム湖底に堆積した腐植物質の有効利用に関する実証実験、*LARGE DAMS*、53, pp.93-105, (2011)
- 10) 駒井 武：製鋼スラグと腐植物質の相互作用、*海洋理工学研究論文集*、10, pp.25-28, (2010)
- 11) Naotaka Fujisawa, Masami Fukushima, Mitsuo Yamamoto, Hisanori Iwai, Takeshi Komai, Yasunari Kawabe, Dan Liu, Recovery of a seaweed-bed in a coastal area of barren ground using a steel slag-compost fertilizer: Characterization of humic acids in the fertilizer during fertilization by pyrolysis-gas chromatography/mass spectrometry, *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* in press.

- 12) Masami Fukushima, Naotaka Fujisawa, Ken Furubayashi, Hisanori Iwai, Keishi Otsuka, Mitsuo Yamamoto, Takeshi Komai, Yasunari Kawabe, Shigekazu Horiya, Structural features and Fe(II)-binding capacities of humic acids from reservoir sediments, *Journal of Chemical Engineering of Japan*, in press.
- 13) Guangxia Qi, Dongbei Yue, Masami Fukushima, Shigeki Fukuchi, Yongfeng Nie, Enhanced humification by carbonated basic oxygen furnace steel slag - I. Characterization of humic-like acids produced from humic precursors. *Bioresource Technology*, 104, 497-502 (2012).
- 14) Naotaka Fujisawa, Ken Furubayashi, Masami Fukushima, Mitsuo Yamamoto, Takeshi Komai, Keishi Otsuka, and Yasunari Kawabe, Evaluation of the iron(II)-binding abilities of humic acids by complexometric titration using colorimetry with ortho-phenanthroline, *Humic Substances Research*, 8, 1-6 (2011).
- 15) Masami Fukushima, Ken Furubayashi, Naotaka Fujisawa, Mio Takeuchi, Takeshi Komai, Keishi Otsuka, Mitsuo Yamamoto, Yasunari Kawabe, Shigekazu Horiya, Characterization of humic acids in sediments from dam reservoirs by pyrolysis-gas chromatography/mass spectrometry using tetramethylammonium hydroxide: Influence of the structural features of humic acids on iron(II) binding capacity, *Journal of Analytical Applied and Pyrolysis*, 91, 323-331 (2011).
- 16) Masami Fukushima, Hisanori Iwai, Characterization and binding of Fe(II) in organic matter in a fertilizer including steel slag and compost to supply soluble Fe(II) to barren ground in coastal areas, *Journal of Advanced Marine Science and Technology Society*, 17, 1-8 (2011).
- 17) 山本光夫「鉄を利用した藻場再生技術導入に関わる沿岸域の環境評価手法に関する研究」*海洋理工学会誌*, 17(1), 13-20 (2011).
- 18) 駒井 武、竹内美緒、川辺能成、原 淳子、腐植酸鉄供給の環境受容性と流域環境評価、*海洋理工学会誌*、17(1), 9-12, (2011)
- 19) 駒井 武、川辺能成、原 淳子、大塚敬嗣、製鋼スラグと腐植物質による生態系修復技術の受容性、*日本エネルギー学会誌*、90(5), 449-445, (2011)

・学会発表

- 1) 山本光夫, 桑野和可, 須川英之, 笠原 勉, 堀家茂一, 劉 丹「腐植物質-鉄錯体を利用した藻場再生技術の九州沿岸海域における有効性評価」第 18 回日本エネルギー学会大会講演論文集 (2009) 170-171.
- 2) Mitsuo Yamamoto, Masami Fukushima, Keishi Otsuka, Takeshi Komai and Dan Liu, "Restoration of Seaweed Beds by Supplying Iron-Humate from Steel Slag and Humus Materials", *The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (PACIFICHEM 2010)*, Hawaii Convention Center (Dec., 2010).
- 3) 岩井久典、福嶋正巳、山本光夫、大塚敬嗣、駒井武、川辺能成：堆肥の海水可溶分画と腐植物質分画の構造的な特色に関する比較検討、第 71 回分析化学討論会、島根大学(松江)、2010 年 5 月。

- 4) 川辺能成、大塚敬嗣、原淳子、駒井武：環境微生物による製鋼スラグからの鉄溶出挙動、資源・素材 2010（福岡）、2010年9月
- 5) 福嶋正巳：沿岸海域における腐植酸鉄の役割と溶存有機物のキャラクターゼーション（依頼講演）、海洋工学会シンポジウム（鉄を利用した沿岸海域環境修復の現状と展望）、京都大学（京都）、2010年10月。
- 6) 藤澤尚隆、福嶋正巳、山本光夫、駒井武、川辺能成、劉丹：製鋼スラグ - 堆肥施肥ユニットによる磯焼け回復技術：施肥過程における腐植酸の化学組成変化、第26回日本腐植物質学会講演会、筑波大学（つくば）、2010年11月。
- 7) 岩井久典、福嶋正巳、山本光夫、駒井武、川辺能成：堆肥の海水可溶分画、腐植酸及びフルボ酸の構造的な特色と鉄（II）との錯形成能、第26回日本腐植物質学会講演会、筑波大学（つくば）、2010年11月。
- 8) 川辺能成、原 淳子、駒井 武：大川流域における腐植物質の動態、水環境学会年会、北海道大学、2011年3月
- 9) 山本光夫、木之下彩子、劉 丹：鉄供給による海藻群落再生技術における製鋼スラグと腐植物質の相互作用評価、第47回環境工学研究フォーラム、高知大学（高知）、2010.11。
- 10) 川辺能成、大塚敬嗣、原淳子、駒井武：大川流域における河川堆積物中の腐植酸鉄の挙動、第44回日本水環境学会年会、2010年3月
- 11) 川辺能成、大塚敬嗣、原淳子、駒井武：環境微生物による製鋼スラグからの鉄溶出挙動、資源・素材 2010（福岡）、2010年9月
- 12) 福嶋正巳：沿岸海域における腐植酸鉄の役割と溶存有機物のキャラクターゼーション（依頼講演）、海洋工学会シンポジウム（鉄を利用した沿岸海域環境修復の現状と展望）、京都大学（京都）、2010年10月。
- 13) 川辺能成、原淳子、駒井武：製鋼スラグからの鉄溶出に及ぼす腐植物質の影響、資源・素材 2011（大阪）、2012年9月
- 14) 福嶋正巳、岩井久典、川辺能成、駒井武、山本光夫、磯焼け海域回復を目的とした製鋼スラグ/堆肥施肥材に含まれる腐植酸の構造変化、資源素材学会 2012 春季大会、東京大学（東京）、2012年3月。

・特許、実用新案等

無し