

微細藻類培養ツールとしての鉄鋼スラグ再資源化法の開発

都城工業高等専門学校物質工学科 准教授 高橋 利幸

1. 緒言

地球温暖化は、加熱プロセスを含む鉄鋼製造にとって避けられない重要課題である（図1）。気候変動は、国連で採択されたSustainable Development Goals（持続可能な開発目標：SDGs）のうち、SDGs No. 13（気候変動）に加え、気候変動により誘発される環境変化は農作物の生育に影響するため、SDGs No. 2（食料関連）とも関連する。本国では省エネルギー政策を中心に温暖化対応しているが、取組みは世界的に不十分と見なされ、CO₂の分離・固定化・隔離・利用技術のさらなる開発は喫緊の課題である。

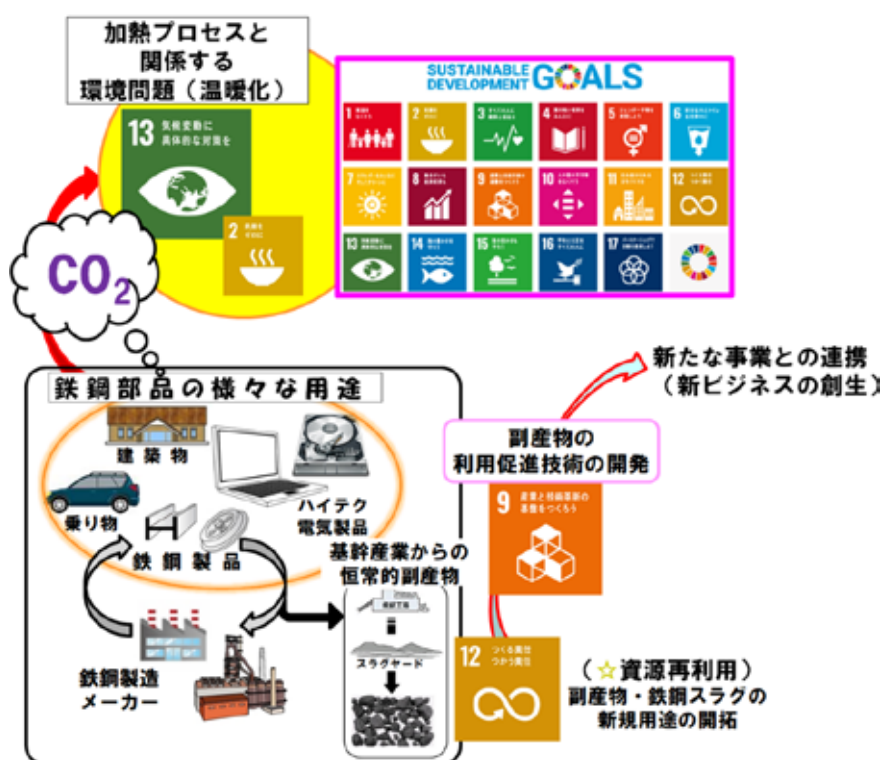


図1 鉄鋼産業とSDGsとの関係

上記の鉄鋼プロセスそのものの課題に加え、鉄鋼業から排出されるCO₂以外の副産物にも注目が必要である。鉄鋼業では、鉄鋼製品を作る鉄鋼精錬を通して、恒常的に鉄鋼スラグが排出される。例えば、2018年の日本において、鉄鋼スラグは、製鋼スラグとして

13,749千トン、高炉スラグとして22,737千トンがそれぞれ生産されている [1]。その多くは、路盤材、コンクリート骨材など陸上用途を中心に活用され、一部はケイカルやミネカルなどの肥料として農業分野にも利用されている [1]。しかし、既存の鉄鋼スラグの用途は、他産業由来の原料との激しい競争にさらされている点や、製鋼スラグの一部が再利用されずに埋立処分（約1.8%：255千トン）されている。これは、基盤産業由来の産業廃棄物として最終処分場のひっ迫を誘導するという観点から問題となっている。そこで、本研究では、鉄鋼業から恒常的に排出される鉄鋼スラグの新規用途の開発可能性を検討することとした。

近年、従来型モノづくりからの脱却を目指す「バイオエコノミー」の概念が、環境保全活動の高まりから、新たなビジネスチャンスとして注目を集めている。その中でも、微細藻類は、化学製品、食品やバイオ燃料など広い分野で期待されるバイオマスとして注目が高く、SDGsの多くの項目への可能性を持ち（SDG Nos. 2, 6, 7, 14: 食料、環境・エネルギー、海洋資源 等） [2-3]、その潜在性の高さから、微細藻類はバイオエコノミーの一翼を担うと期待されている（図2）。微細藻類は多種産業への応用可能性が期待されているものの、その培養コストには依然として課題があり、高い注目を集めたバイオ燃料も実用化に至っていないものが多い。すなわち、微細藻類の活用は、その培養・増殖効率が律速要因となっている。



図2 微細藻類の活用潜在性とSDGsとの関係（文献 [2] から転載）

鉄鋼スラグは、その発生工程により含有する成分に差があるものの、主要または微量含有成分の中には無機資源として生物に対する有用活性をもつ成分もある [4]。例えば、鉄鋼スラグの主要骨格成分であるシリカ (SiO_2) や石灰 (CaO) のうち、Siは植物プランクトンの珪藻などの殻の主要成分であり、植物のストレス軽減作用物質としての効果もある。Caは細胞の情報伝達分子としての作用や多数のカルシウム結合タンパク質の制御に関係する。その他に、主な成分として、Feには細胞呼吸酵素や薬物代謝酵素などの機能に関連し、Mgは葉緑素であるクロロフィルの成分であり、ATP合成酵素などのマグネシウム結合タンパク質などの機能にも関わる。

上述のように、鉄鋼スラグには生物の無機資源としての潜在性があるものの、特定成分の多量溶出は各種環境規制（陸域における土壤環境基準や海域等における海洋汚染防止法による水底土砂基準等の諸規則）の対象となっている [5-7]。本研究では、微細藻類培養時の無機成分として、鉄鋼スラグが有効か評価する。そこで、鉄鋼スラグ再資源化の用途開発の一つとして、鉄鋼スラグを微細藻類の培養に活用する技術の開発を目的とした。

2. 実験方法

2.1. 実験に使用した鉄鋼スラグと微細藻類

本研究では、実スラグ由来の微細粒スラグとして肥料に使用され、市販購入可能なミネカルを転炉スラグモデルとして実験に用いた (図3a & 3b)。なお、上記スラグ製品におけるスラグ粒のサイズを調整するため、ふるいで1mm以上、5mm以下にサイズ調整し [8, 9]、微細藻類の培養実験に使用した。

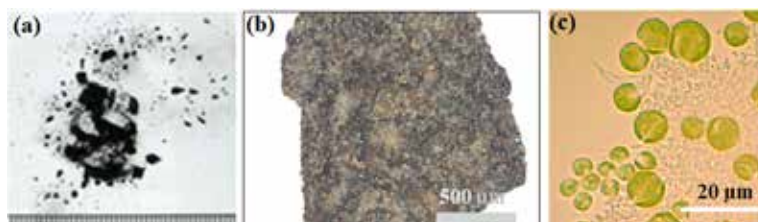


図3 実験に使用した鉄鋼スラグと微細藻類

((a-b) ミネカルの外観 (a) とデジタル顕微鏡による拡大画像 (b))。 (c) 微細藻類の顕微鏡画像。スケールバーは、 (a) は1mmスケール、 (b) は500 μmおよび (c) は20 μmを表す。なお、 (a) と (b) は、文献 [8, 9] から若干改変して掲載。))

2.2. 実験に使用した微細藻類

本研究では、スラグを使って培養試験を行う微細藻類として、環境中に普遍的なクロレラ属のモデル微細藻類として使われている *Parachlorella kessleri* (C-531 strain) を用いた (図3c)。なお、当該微細藻類は、IAMカルチャーコレクション (Institute of Applied Microbiology (IAM) culture collection at the University of Tokyo) に由来する緑藻クロレラ (*Chlorella kessleri* C-531株) であり、近年の分子系統解析の成果から種名が変更されたものである [10]。微細藻類は、CA寒天培地で培養された [11]。微細藻類は、実験の使用前に無菌的に寒天培地からかき取られ、CA液体培地 [11] に懸濁され、白色蛍光灯で調節されたLDサイクル(12時間明期/12時間暗期) および $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ のインキュベーター内で実験に十分な個体数まで前培養された。

2.3. 鉄鋼スラグ存在下での溶媒のpH変化と成分溶出評価

微細藻類に対するスラグの影響を検討する前に、鉄鋼スラグ存在条件における溶媒の状態変化を評価した。特にここでは、溶媒pH (蒸留水【DW】またはCA液体培地)、スラグの骨格成分の1つであるカルシウム (カルシウムイオン: Ca^{2+}) の濃度を評価した。なお、pHはpHメーターで、 Ca^{2+} はカルシウムイオンメーターで評価した。また、この際に、緩衝剤やキレート剤などを共存させた場合に、溶媒pHやスラグからの Ca^{2+} の溶出がどのように変化するかも評価した。緩衝剤やキレート剤などの添加の際に、条件によっては追加で適量の塩酸 (HCl) を添加し、溶媒pHの制御を行った。

2.4. 鉄鋼スラグ存在下での微細藻類の培養とその評価

微細藻類に対するスラグの影響評価を目的として、緑藻クロレラを一定量のスラグ含有CA液体培地で最大1週間培養した。培養後、微細藻類個体数の変化を自動セルカウンター法 [12] で測定した。また、この際、微細藻類の葉緑体中の葉緑素クロロフィルに由来する赤色蛍光 (Cy5蛍光色素相当の赤色蛍光として検出 [12]) も同時に測定し、微細藻類の生理状態の評価に用いた。さらに、培養後のスラグ含有培養液のpH測定と Ca^{2+} 濃度の測定も上記2.3節に記載の通り行った。なお、上記2.3節と同様に、微細藻類とスラグとの混合実験においても、緩衝剤やキレート剤などの有機物を共存させた場合の影響を別途評価した。

3. 結果および考察

3.1. 実験に使用した鉄鋼スラグの化学的特徴

本研究では、実スラグ由来の微細粒スラグ、特に、製鋼スラグ由来の微細粒スラグを用いて、微細藻類培養の無機栄養素として鉄鋼スラグを使用可能か検討した。実験に用いたスラグの組成は、標準的な製鋼スラグの組成と同様に、CaO、SiO₂、Al₂O₃、MgO等が基本成分であり（表1）、製鋼スラグの中でも転炉スラグ由来であるミネカルはFe₂O₃を含み、その外観は黒色であった（図3a & 3b） [8, 9]。

表1 実験に使用した製鋼スラグの主要化学成分（文献 [8] から改変して転載）

	CaO	SiO ₂	Al ₂ O ₃	MgO	SO ₃	TiO ₂	Fe ₂ O ₃	MnO	P ₂ O ₅	V ₂ O ₅	Cr ₂ O ₃
mass%	50.6	13.52	2.188	3.385	0.17	0.355	23.36	4.148	1.591	0.241	0.22

良く知られた現象として、スラグは、水環境下において、その含有成分の溶出により、水域のpHを上昇させる。これは時に、スラグの水環境利用における問題となる場合もある。実際に、スラグを純水に浸漬すると、溶媒のpHが顕著に上昇した（図4）。微細藻類の培養に用いる溶液にも言及できる点として、蒸留水や池水のような淡水溶媒は、海水と比べると緩衝作用が弱く、スラグを溶媒に浸漬直後から急激なpH上昇が起こる [8, 9]。

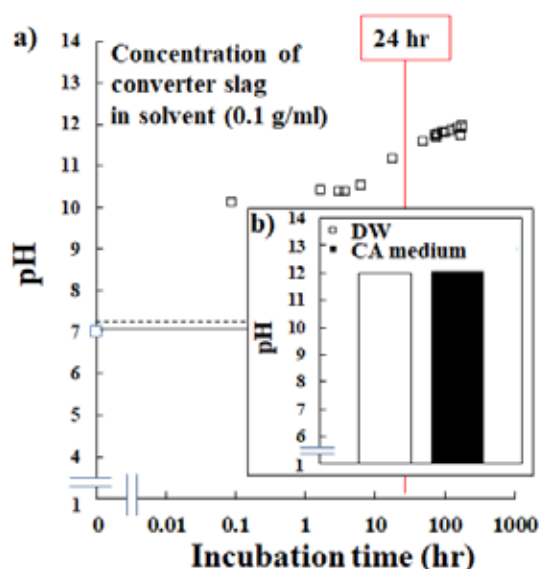


図4 淡水中へのスラグ添加による溶媒pHの変化

（ (a) 蒸留水（DW）中へスラグを添加し、7日間の溶媒pHの経時変化を評価した。 (b) DWまたはCA液体培地へスラグを添加し、7日後の各溶媒のpHの変化を評価した。なお、パネル (a) は、文献 [8, 9] から改変して掲載。）

これらの急激な溶媒pHの上昇は、この環境下で微細藻類を培養する際の障害になることは容易に予想できる。

製鋼スラグによる溶媒pHの上昇は、淡水環境下では最終的にpH 12前後でほぼ頭打ちになったが、この上昇具合は添加したスラグ量に依存した(図5)。また、溶媒中に緩衝剤(ここではトリスヒドロキシメチルアミノメタン【Tris】)やキレート剤(エチレンジアミン四酢酸【EDTA】)を添加したところ、溶媒pHの上昇は起こるものの、スラグだけの場合よりもpHの上昇を抑えることができた。なお、溶媒pHが上昇した時、スラグの主要骨格として使用されるCaOに由来するCa²⁺濃度の上昇が同時に起きていた(data not shown)。したがって、スラグの溶解とともに多様な成分溶出が起きた結果として、溶媒pHの上昇が起きているといえる。条件により、スラグ含有成分の溶出挙動には変化があると想定される[5]。しかし本研究では、化学組成の変化に加え、微細藻類への影響も評価するため、化学挙動の分析としては、全ての化学組成の追跡ではなく、溶媒pHとスラグ骨格であるCa²⁺濃度との組合せでスラグの状態を評価することにした。

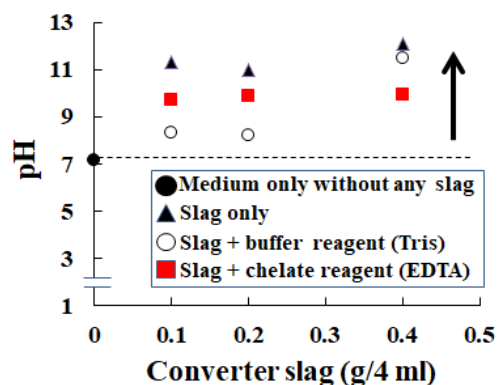


図5 スラグ浸漬7日後のスラグによるCA培地のpH上昇とそのpH変化に対する緩衝剤やキレート剤の効果

3.2. 製鋼スラグ存在下における微細藻類の培養と微細藻類の状態変化

緩衝剤やキレート剤の添加が、製鋼スラグによる溶媒pHの上昇を抑制する可能性を示したため(図5)、この状態で微細藻類の培養が可能か評価した。ここで、製鋼スラグ、添加した緩衝剤やキレート剤に対する微細藻類の影響は、微細藻類の個体数変化と光合成機能に関わるクロロフィル蛍光の状態変化を基に評価した。光合成生物にとって、光合成機能は、生理活性を反映する。特に、光合成において光を吸収するクロロフィル分子は、適切な励起光の照射により、赤色蛍光を発する特徴を示す(図6)[13]。クロロフィルの赤色蛍光は、クロロフィル分子を壊すような物理化学的な刺激や藻類細胞自体の状態が悪くなると、蛍光強度が低下する(図7)[12, 14]。今回、このクロロフィルの特徴を利用し、外観からは判別困難な微細藻類の生理状態の変化を評価した。

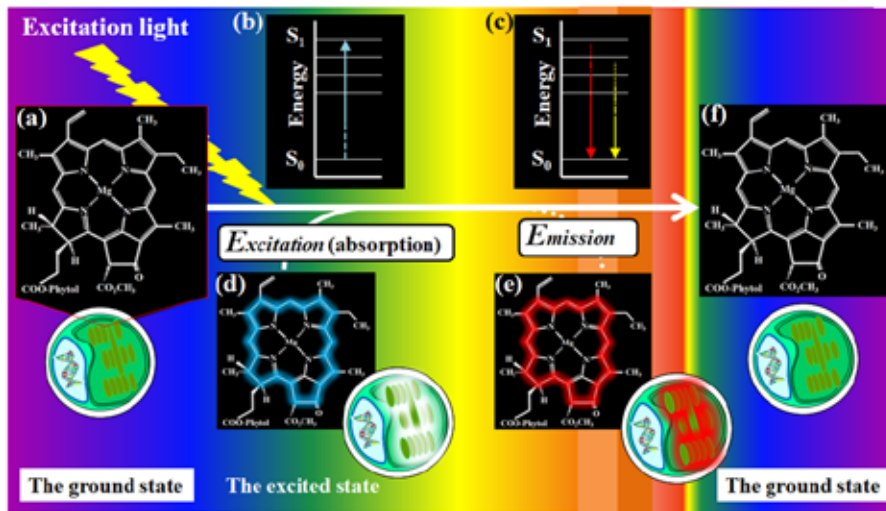


図6 クロロフィルの光に対する応答とクロロフィル蛍光（文献 [13] から転載）

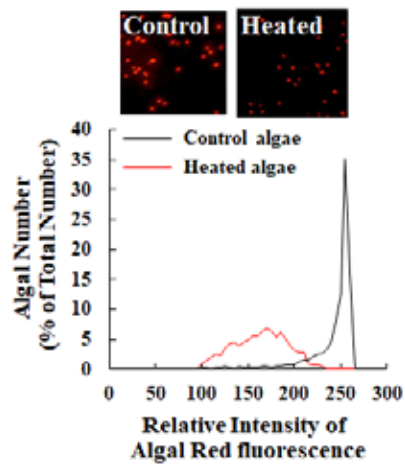


図7 クロロフィルの赤色蛍光と藻類細胞の健全性（文献 [12] から転載）

（グラフ上の画像は蛍光画像、グラフはそれぞれの状態（Controlと加熱処理試料）の細胞数と赤色蛍光強度の変化を示す。）

製鋼スラグ存在下で微細藻類を培養すると、スラグからの漏出成分に由来する溶媒pH上昇の影響を受け、培養開始前と比較して（図8：Before exp.）、培養開始24時間程度で急激にクロロフィル蛍光が低下した（図8：Slag only）。一方、微細藻類のクロロフィル蛍光の低下は、緩衝剤やキレート剤の添加で緩和され、その影響は添加試薬の濃度にも依存した（図8）。しかし、培養初期には効果を示した緩衝剤やキレート剤添加条件（図8）の試料でも、培養7日後には藻類のクロロフィル蛍光がスラグだけを添加した場合とほぼ同程度に低下した（図9）。

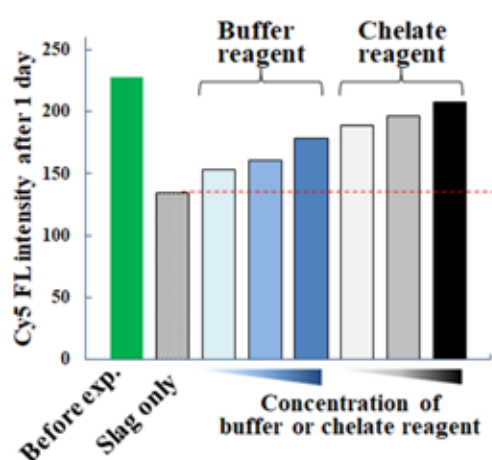


図8 スラグ共存培養における実験前と実験開始24時間後の微細藻類のクロロフィル状態の比較（緩衝剤としてTris、キレート剤としてEDTAがそれぞれ異なる濃度で添加されている。）

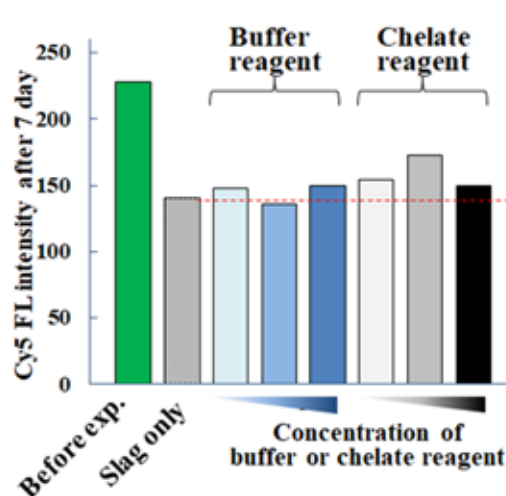


図9 スラグ共存培養における実験開始7日後の微細藻類のクロロフィル状態の変化

さらに詳細に分析するために、培養7日後の溶媒pHを測定したところ、緩衝剤やキレート剤を添加した条件は、スラグ処理7日後の時点でもスラグだけの条件よりは溶媒pHの上昇を抑制したが、それでも多くの条件でpHはpH 10以上になり、培養初期と比べると添加試薬の効果が弱まっていた（図10）。なお、図10のグラフ中の点線は、スラグだけを添加した時のpHレベルを意味する。また、微細藻類の個体数変化をみると、緩衝剤やキレート剤を添加した条件の方が、むしろ低い個体数になる場合もあった（図11）。ここで100%の箇所の実線は、実験開始時の個体数を意味し、点線は実験後のスラグだけを添加した条件の時の微細藻類の個体数を示し、初日の個体数に対する相対値として表記して

いる。多くの条件で微細藻類の個体数は大きく低下したが、スラグのみを含む条件と比べ、微細藻類の個体数が若干ながら改善した条件もあった（図11）。そこで、特に改善状況が観察されたキレート剤の添加条件について、さらに詳しく条件を検討した。

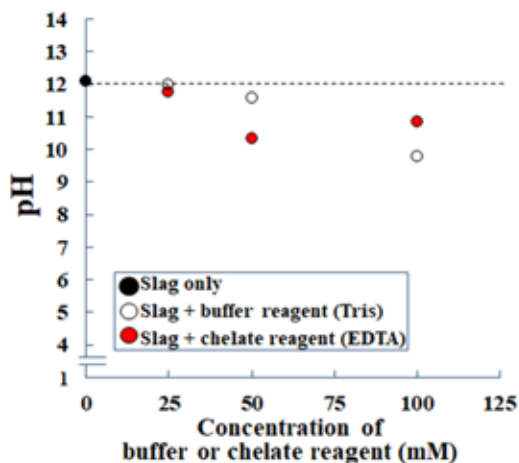


図10 スラグ共存培養7日後の各条件における溶媒pHの変化

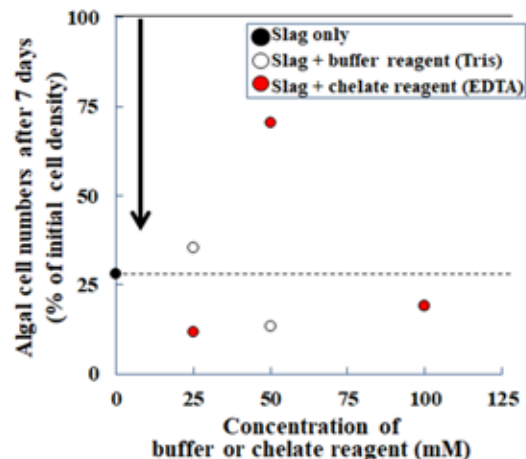


図11 スラグ共存培養7日後の各条件における微細藻類個体数の変化

3.3. キレート剤添加条件の相違による微細藻類の培養環境の改善効果

キレート剤のみではpHが下がりきらなかった（図10）、キレート剤に加え、追加でHClを適量加えた場合の変化を評価した。その結果、スラグのみの場合と比較して、キレート剤にHClを加えた場合、その濃度割合によっては、スラグ誘導性のpH上昇を顕著に抑制できた（図12）。また、pH上昇を抑制できた環境では、微細藻類のクロロフィル蛍光の低下を抑制する傾向があった（図13）。現時点ではデータ数が少なく再検証が必要であるが、微細藻類の個体数においても、一部の条件で大きく改善し、培養開始時よりも個体数の増加を示した条件もあった（data not shown）。

キレート作用のある薬剤の添加とスラグ誘導性pH上昇の制御により、微細藻類を増殖させる環境を形成し得ることが分かった。しかし、EDTAのようなキレート剤は、環境毒性や生体毒性も懸念されている [15]。本研究では、環境中で当該試薬を使用することを想定してはいないが、生体毒性については本研究においても明らかにマイナス要因である。今後、EDTA同様な作用を有し、微細藻類の増殖を阻害しない低毒性の物質をスクリーニングする必要がある。

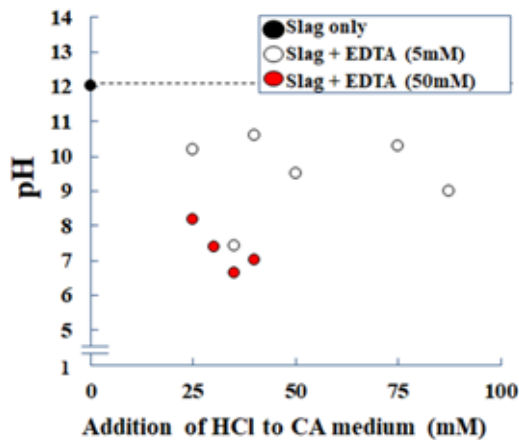


図12 スラグ共存培養7日後のキレート剤添加条件における微細藻類培養環境の変化

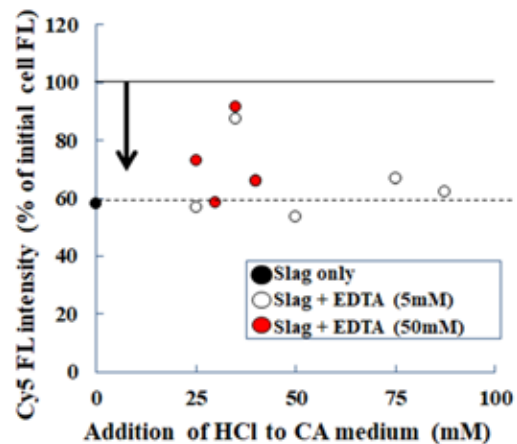


図13 スラグ共存培養7日後のキレート剤添加条件における微細藻類のクロロフィル状態の変化

今回、スラグ処理した微細藻類に対して、時間の都合から、微細藻類の増殖や生理状態変化（クロロフィルの健全性）までしか解析することができなかった。スラグ添加が、微細藻類の個体数に加え、微細藻類の作り出す有用物質の質や合成量にどのような影響を与えるのか、今後は微細藻類の代謝制御も含めた評価が必要である。特に、クロロフィル状態の健全性は、光合成としてCO₂の吸収に加え、光合成から始まる有機物の合成、その生体内代謝による多種多様な有用成分への変換・合成に大きく関わる。スラグが無機栄養資源として、微細藻類活用に貢献できるかどうかは、その評価が重要である。今後の課題として、それらの評価を継続して検討したい。

4. 結言

本研究で微細藻類培養に製鋼スラグを利用したところ、以下の（１）～（２）の知見を得られた。（１）微細藻類培養系にスラグ粒を添加しただけでは、スラグ誘導性の溶媒pH上昇とそれに連動したスラグ含有漏出成分の影響を受け、微細藻類の生理状態が大きく悪化した。（２）緩衝剤やキレート剤の添加により、条件によって程度の差はあるが、スラグ誘導性の微細藻類の状態悪化を抑制できた。すなわち、特定の添加剤の導入で、スラグ単独では損ねてしまったクロロフィル状態の健全性の維持・改善に貢献した。今後、スラグが無機栄養資源として、次世代バイオマスとして期待される微細藻類の活用に貢献できるか判断するにあたり、微細藻類のクロロフィル状態の健全性を維持したうえで、そ

の後の微細藻類個体数の評価やその代謝物分析が重要である。

謝辞

本研究は「公益財団法人JFE21世紀財団」の助成を受けて行われたものであり、ここに感謝の意を表す。

参考文献

- [1] Nippon Slag Association, *Tekko Sulagu Toukeinenpou (Iron and Steel Slag Statistics)*, (2019), FS-169, 2-10 (in Japanese). (accessed 2019-12-1)
- [2] T. Takahashi, Usefulness of a microalgal biorefinery in conversion to chemical products and recent technology in automatic evaluation of microalgae., *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*, vol. 27 (2021), Article No. 100410.
- [3] T. Takahashi, Potential of an Automated- and Image-Based Cell Counter to Accelerate Microalgal Research and Applications., *Energies*, vol. 13 (22) (2020), Article No. 6019.
- [4] T. Takahashi and S. Yokoyama: Bioassay of Components Eluted from Electric Arc Furnace Steel Slag Using Microalgae *Chlorella*., *ISIJ International*, vol. 56(8) (2016), pp. 1495-1503.
- [5] S. Yokoyama, A. Suzuki, NIK H. B. M. Nof, H. Kanematsu, A. Ogawa, T. Takahashi, M. Izaki and M. Umemoto, Serial Batch Elution of Electric Arc Furnace Oxidizing Slag Discharged from Normal Steelmaking Process into Fresh Water., *ISIJ International*, vol. 50 (2010), pp. 630-638.
- [6] L. De Windt, P. Chaurand and J. Rose, Kinetics of steel slag leaching: Batch tests and modeling., *Waste Management*, vol. 31 (2011), pp. 225-235.
- [7] T. Takahashi, Y. Ogura, A. Ogawa, H. Kanematsu and S. Yokoyama, An Effective and Economic Strategy to Restore Acidified Freshwater Ecosystems with Steel Industrial Byproducts., *Journal of Water and Environment Technology*, vol. 10 (2012), pp. 347-362.
- [8] 高橋利幸, DNA選択的検出法を用いた鉄鋼スラグへの微生物吸着挙動と吸着微生物によるスラグ誘導性pH上昇への緩衝作用の評価, *鉄と鋼 Tetsu-to-Hagané*, vol. 106(12)(2020), pp. 961-972.

- [9] T. Takahashi, Biochemical Analysis of Microbial Adsorption Behavior on Iron and Steel Slag Using DNA-specific fluorescent reagent, and the Effect of Microbial Biofilm Attached to Slag on pH Buffering Action, *ISIJ International*, vol. 62 (5)(2022), in press.
- [10] L. Krienitz, V. A. R. Huss, and C. Bock, *Chlorella*: 125 years of the green survivalist., *Trends Plant Sci.*, vol. 20 (2005), pp. 67-69.
- [11] N. Nishihara, S. Horiike, T. Takahashi, T. Kosaka, Y. Shigenaka, and H. Hosoya, Cloning and characterization of endosymbiotic algae isolated from *Paramecium bursaria*. *Protoplasma*, vol. 203 (1998), pp. 91-99.
- [12] T. Takahashi, Applicability of Automated Cell Counter with a Chlorophyll Detector in Routine Management of Microalgae., *Scientific Reports*, vol. 8 (1) (2018), Article No. 4967.
- [13] T. Takahashi, Routine Management of Microalgae Using Autofluorescence from Chlorophyll., *Molecules*, vol. 24 (24) (2019), Article No. 4441.
- [14] T. Takahashi, Direct Evaluation of Endosymbiotic Status in *Paramecium bursaria* Using a Capillary Flow Cytometry., *Cytometry Part A*, vol. 85(11) (2014), pp. 911-914
- [15] C. Oviedo, J. Rodríguez, EDTA: THE CHELATING AGENT UNDER ENVIRONMENTAL SCRUTINY., *Quim. Nova*, vol. 26 (6) (2003), pp. 901-905.