

研究会成果報告 - 33

研究会I「バイオフィーム被覆によるスラグ新機能創出」の活動報告

Activity Report of "New Functionalities of Iron and Steelmaking Slags by Biofilm Coating"

鈴鹿工業高等専門学校
生物応用化学科
教授 平井信充
Nobumitsu Hirai

鈴鹿工業高等専門学校
生物応用化学科
准教授 甲斐穂高
Hotaka Kai

鈴鹿工業高等専門学校
生物応用化学科
准教授 小川亜希子
Akiko Ogawa

1 はじめに

鉄鋼スラグは既にほぼ全量がリサイクルされているが¹⁾、スラグの中で特に転炉系製鋼スラグは競合する他のリサイクル材料が存在することから、新たな機能の創出が求められている。製鋼スラグは多種多様な金属元素を含有しており、その中の特定元素の選択的な有効利用が新たな機能創出に向けた鍵である。その際、沿岸域や農耕地の環境修復材^{2,3)}など、水と接する環境下で用いる際には、これら金属元素の環境への溶出挙動を制御する必要がある。例えば、沿岸域の環境修復材としては白濁を防止するためにpH増加を引き起こすCa等の溶出速度を抑制することが望ましいのに対して、肥料としての活用には作物に必要な元素(リン、ケイ素等)の溶出速度を高めるのが望ましい。著者は、水と接する環境下で製鋼スラグの表面にバイオフィーム^{*1}が形成されること⁴⁾、形成されたバイオフィームが特定の金属イオンを捕捉すること⁵⁾などを見出しているが、このバイオフィーム被覆による製鋼スラグの活用性の発展・拡大を目指した研究は、従来、なされていない。そこで、製鋼スラグ組成・熱履歴とバイオフィーム種との関係、製鋼スラグの機能や性質に及ぼすバイオフィームの作用を明らかにすることができれば、得られた知見を「製鋼スラグの沿岸域や農耕地等での利用」に適用することができ、製鋼スラグの新機能発掘が期待できる。以上の背景を元に研究会I「バイオフィーム被覆によるスラグ新機

能創出」の設立を提案し採択頂いた。研究会の期間は2017年3月1日～2020年2月29日の3年間であり、メンバーは以下の通りである。

主査：平井信充(鈴鹿高専)

副査：井上亮(秋田大学(現 東北大学))、高橋利幸(都城高専)、日比政昭(日本製鉄)、當房博幸(JFEスチール)

委員：学側メンバー：16名、産側メンバー：10名(申請時、期間途中での交替、追加も有り)

研究会の目指す最終目標としては、バイオフィームの選択的金属イオン抽出・捕捉作用を利用して、製鋼スラグの表面を予めバイオフィームで被覆し、水存在下における特定金属の溶出速度を自在に制御可能にすることにより、製鋼スラグの有する有用成分供給・環境修復機能をより引き出すための知見を得ることである。以上の最終目標を目指すうえで、3年間の研究期間で達成を目指す以下の4つの重点研究項目を設定し、役割分担の上、委員それぞれに研究を進めた。

重点研究項目1. バイオフィームで被覆した製鋼スラグからの溶出挙動の評価

重点研究項目2. 製鋼スラグ上に生成したバイオフィーム定量法の検討

重点研究項目3. 実環境中で製鋼スラグ上に生成するバイオフィームの菌叢^{*2}解析

重点研究項目4. 環境が製鋼スラグ上に生成するバイオフィームに与える効果の調査

*1 バイオフィーム：材料表面に菌(細菌、微生物)の作用によって形成される粘着性があり凹凸のある不均一な膜。菌、水、菌が排出する細胞外重合物質(ぬめり)等からなる。

*2 菌叢：細菌叢ともいう。ある環境に生存している細菌の集合のことであり、それらの遺伝情報を含んでいる。

その詳細は、最終報告会や日本鉄鋼協会秋季講演大会時のシンポジウム、最終報告書で報告した通りである。本稿では、研究会の委員各自が進めた様々な研究の中で、主査である平井が主に携わった以下の3つの研究について紹介する。

研究1. 三重県沿岸域に浸漬した鉄鋼スラグ上に生成したバイオフィームの菌叢解析

研究2. 製鋼スラグ上に生成したバイオフィームのTOC定量法の確立

研究3. 単一菌バイオフィームが付着した製鋼スラグを浸漬した人工海水の短時間 pH 測定

なお、以上の3つの研究に使用した3種類の実製鋼スラグ(秋田大学井上亮教授ご提供)の組成について表1に示す。

2 三重県沿岸域に浸漬した鉄鋼スラグ上に生成したバイオフィームの菌叢解析

製鋼スラグは、多種多様な金属とその酸化物やケイ酸化物等が含まれている。製鋼スラグを沿岸域や海洋域で藻場再生・養生材として利用する際において、藻場形成にはバイオフィアウリング^{*3}が大きく関わっており、その始まりでは(藻類の足場となる)材料表面上にバイオフィームが形成される。狭義のバイオフィームとは、細菌とそれらが産生した細胞外高分子基質から成る膜を示す。このバイオフィーム形成に続き、貝の卵や藻類の孢子といった大型の生物が付着して成長し藻場を形成していくのである。本研究では、バイオフィアウリングの初期段階であるバイオフィームに着目し、組成の異なる3種類の製鋼スラグを対象として伊勢湾で浸漬実験を行い、製鋼スラグ上に形成されたバイオフィーム中の細菌(集団)にはどのような特徴があるかを調査した。

試料には、組成が異なる3種類の実製鋼スラグ(表1)、ホウケイ酸ガラス板およびポリウレタン製スポンジを使用した。試料は、種類別に4mm四方の網目付きポリエチレン製袋に入れ、鋼製ホルダーに取り付けた。なお、このホルダーの両端にはロープが取り付けられており、サンプルホルダー

を浮き桟橋(三重県津市にあるマリーナ河芸)にくくり付けた際には、水面からホルダーまでの距離が常に2mとなるようにした。伊勢湾での浸漬実験は2017年7月18日~25日の間で行い、浸漬3日目と7日目に試料の一部を回収して-80℃で保存した。つづいて、保存した各試料表面からバイオフィームを回収し、そこからDNAを抽出・精製した。精製したDNAサンプルは16S rRNA遺伝子領域をターゲットとしてPCR増幅後、次世代シーケンサーを用いて各サンプル中に含まれる16S rRNA遺伝子のV1-V2領域の塩基配列を決定した。最後に、これらの塩基配列データを元にして各サンプルの操作的分類単位(operational taxonomic unit)を求め、菌叢を解析した。

各試料から回収したバイオフィーム中の菌叢について、分類学上の網レベル(class)で浸漬3日目と7日目を比較した。その結果、Slag Aを除く試料について構成している細菌のグループの種類とそれらの割合に変化が確認された。また、試料間で菌叢を比較した場合、Slag 5-2、Slag AおよびSlag Fにて浸漬3日目の試料に比べて浸漬7日目の試料中のEpsilonproteobacteriaの割合が増加していた。一方、ホウケイ酸ガラス板とポリウレタン製スポンジについては、Epsilonproteobacteriaの増加は確認されなかった。なお、Epsilonproteobacteriaには硫黄酸化に関わる微生物種が存在している⁶⁾。本実験では、ホウケイ酸ガラス板を表面に凹凸がなく平滑であるものの代表として使用し、ポリウレタン製スポンジを表面に凹凸があるものの代表として使用した。素材中に金属元素を含まないため、どちらの試料についても、製鋼スラグと異なり試料表面からの金属化合物の溶出は生じなかったと考えられる。そのため、使用した製鋼スラグを構成していた金属やその酸化物、ケイ酸塩類が、形成されたバイオフィーム中の微生物集団を増やした要因だと考えられる。さらに網の下位である目レベル(order)で菌叢を解析したところ、Slag AおよびSlag 5-2に特徴的な細菌は、DesulfobacteralesやGemmatimonadetesといった水質浄化に関わる集団や、ChromatialesやThiotrichalesといった硫黄酸化ができる集団であった。

表1 実験に使用したスラグの組成分析結果(mass%) C/S:塩基度

Slag	全CaO	f-CaO	SiO ₂	Al ₂ O ₃	MgO	T. Fe	MnO	P ₂ O ₅	S	C/S
5-2	37.6		22.6	4.2	6.5	4.7	12	5.4	0.02	1.67
A	55.3		18.7	3.0	1.9	4.3	5.6	4.6	0.29	2.91
F	52.2	15.9	14.1	3.0	2.8	12.2	4.3	2.9		3.71

*3 バイオフィアウリング:微生物や生物が材料表面に付着する現象やプロセスを表す。細菌、微細藻類などの付着であるマイクロファウリングと、フジツボ、カキなどのより大きな生物の付着であるマクロファウリングに大別できる。

以上、伊勢湾にて製鋼スラグの浸漬実験を行ったところ、使用した製鋼スラグ上でバイオフィーム形成を確認できた。さらに、それらのバイオフィーム中には、水質浄化や硫酸化に関わる細菌集団が存在していることが分かり、製鋼スラグは水圏環境における硫化物浄化細菌の定着に有効である可能性が示唆された。なお、目の下位である科レベル (family) で菌叢を解析した結果⁷⁾や、模擬スラグを用いてスラグの組成や塩基度が菌叢に及ぼす影響を検討した結果⁸⁾については、他稿をご覧いただきたい。

3 製鋼スラグ上に生成したバイオフィーム量のTOC測定法による測定

前述の通り、海洋浸漬時において、スラグの表面にバイオフィームが形成される。バイオフィームの効果に着目するうえで、まずはバイオフィームの定量法の確立が必須である。しかしながら、一般的な定量法であるクリスタルバイオレット染色法 (以下、CV染色法) はバイオフィームの染色と同時にスラグの染色が生じるため、スラグ上のバイオフィームの定量には適さない。そこで、我々はTOC (全有機炭素) 測定法に着目した。まず、TOC測定法にくわえ、ATPふき取り検査 (A3) 法や従来法であるCV染色法等でスライドガラス上のバイオフィームの定量を行い、十分な相関性が見られるかを確認した。その後、組成の異なる3種の実製鋼スラグ上のバイオフィームの定量を行った。

前準備として海洋菌 (*aliivibrio fischeri*, JCM18803, 微生物材料開発室, 理化学研究所) のコロニーから釣菌し、液体培地中で22℃、2日間培養を行った。任意の濃度に希釈した培養液中にスライドガラスを浸漬し、バイオフィームをスライドガラス上に成長させ、試料を培地から出して純水で軽く洗浄し、超純水が一定量入ったビーカーに試料を入れ、超音波ホモジナイザー (Ultrasonic Generator US-600T, 株式会社日本精機製作所) でスライドガラス表面のバイオフィームを超純水中に剥離・懸濁させ、TOC測定による分析を行った。超音波ホモジナイザーを使用する前にはエタノールで滅菌し、そのエタノールを取り除くため超純水で40分間洗浄した。また、同様の手順で成長させたバイオフィームについて、A3法による発光量、CV染色法による吸光度で評価を行い、定量法としての比較検討を行った後、実組成の異なる3種の実製鋼スラグ (表1) を使用し、培養液の濃度を統一して、スラグ上に成長させたバイオフィーム量についてもTOC測定を行った。

ガラス上に生成したバイオフィームについて、TOC測定、A3法、CV染色法による吸光度測定を行った結果⁹⁾、全て培

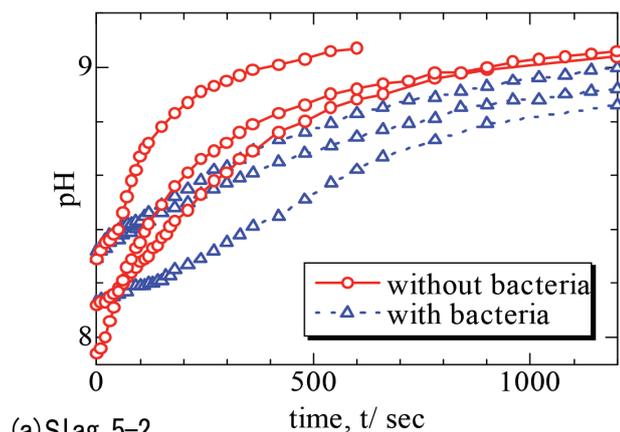
地濃度にほぼ比例して測定値は増加し、培地濃度と測定値は原点を通る直線関係を示した。以上より、TOC測定の結果は従来法と十分な相関性を示すことがわかり、TOC測定法はスラグ上のバイオフィームの定量法として適切であることがわかった。これらを踏まえて、スラグ上のバイオフィームのTOC測定を行ったところ、測定結果にばらつきは見られるものの、Slag Aと比較してSlag 5-2やSlag F上のバイオフィーム量 (TOC量) が大きいことがわかった。

以上、TOC測定法によるバイオフィーム定量の妥当性を確認した後、実製鋼スラグ上のバイオフィーム量を測定したところ、Slag Aと比較してSlag 5-2やSlag F上のバイオフィーム量 (TOC量) が大きいことがわかった。塩基度 (C/S) が高いほうがスラグ表面のpHが上昇し、バイオフィームの成長が抑えられることが予想されるにも関わらず、最も塩基度の高いSlag F上のバイオフィーム量が多い理由については、バイオフィームの成長を加速することが知られているFeが多く含まれていることがその一因であると考えている。

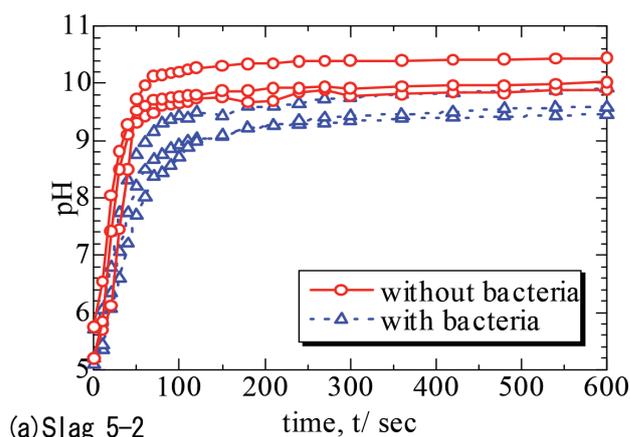
4 単一菌バイオフィームが付着した製鋼スラグを浸漬した人工海水の短時間 pH 測定¹⁰⁾

前述の通り、海洋浸漬時において、スラグの表面に形成されるバイオフィームの菌叢解析および定量法を確立した。そこで、スラグを被覆したバイオフィームによりスラグからの金属イオンの溶出挙動の制御が可能かについて明らかにすることを目標とし、以下の実験を行った。具体的には、2種類の典型的な単一菌バイオフィームである枯草菌バイオフィームと海洋菌バイオフィームについて、いくつかの実製鋼スラグ上に予め成長させた後、その製鋼スラグを浸漬した人工海水のpH経時測定を行い、スラグ種、バイオフィームの有無や種類の違いが製鋼スラグの溶出挙動にどのような影響を与えるかについて調査した。

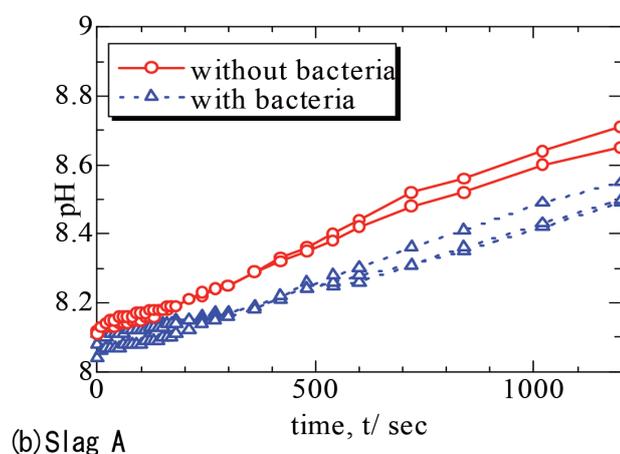
前準備として枯草菌 (*bacillus subtilis*, MSQ15202, 農業生物資源ジーンバンク, 農研機構) のコロニーを試験管に入れた培養液Trypticase Soy Brothに取り、培養器中30℃で1日培養を行った。表1に示す組成の異なる3種の実製鋼スラグを粉碎し、ふるいを用いて75~250 μmのもののみを取り出した。このスラグをシャーレに敷いた濾紙に約0.5 g取り、注射器を用いて前準備で1日培養した枯草菌を含む培養液を約0.5 mL滴下し、培養器中30℃で1日静置した。海洋菌 (*aliivibrio fischeri*, JCM18803, 微生物材料開発室, 理化学研究所) もほぼ同様の手順で行った。ただし前培養は22℃で2日、本培養は22℃で2日間行った。比較のため菌を含まない培養液を滴下したスラグをシャーレにいれたものも用意し



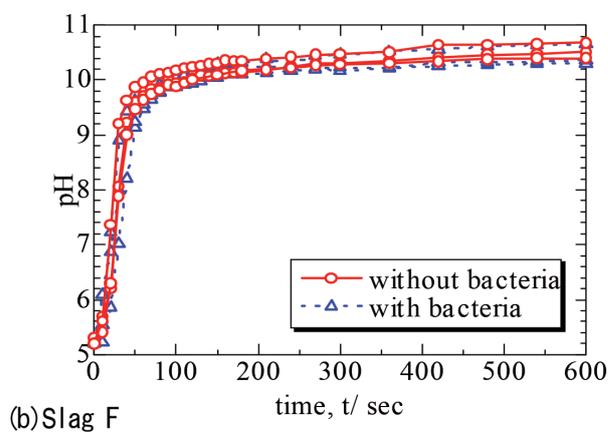
(a) Slag 5-2



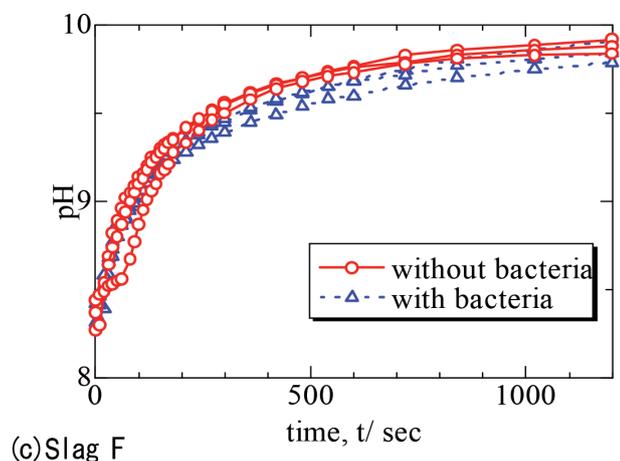
(a) Slag 5-2



(b) Slag A



(b) Slag F



(c) Slag F

図1 枯草菌を被覆させた実製鋼スラグを人工海水中に浸漬した際のpH経時変化 (Online version in color.)

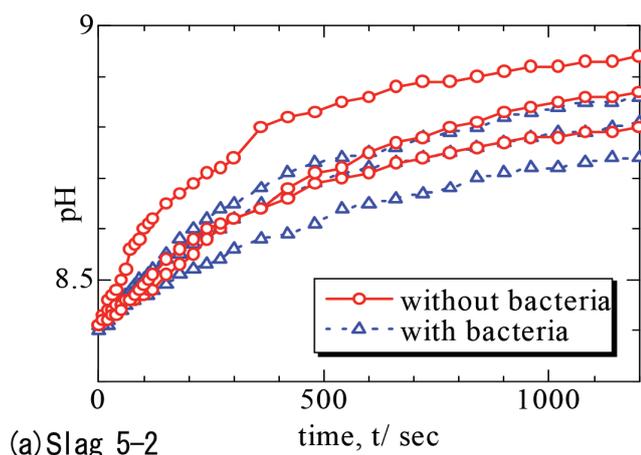
た。翌日、シャーレから取り出したスラグを濾紙ごと80 mLの純水もしくは人工海水 (Marine Art SF-1, 富田製薬) に浸漬し、pHメーターを用いてpHの経時変化を測定した。

枯草菌を含む培養液を滴下して、枯草菌バイオフィルムで被覆したSlag 5-2、A、Fを人工海水に浸漬させたときのpH経時変化をそれぞれ図1 (a) ~ (c) に示す。比較のため、枯草菌を含まない培養液を滴下したスラグの結果も併せて示し

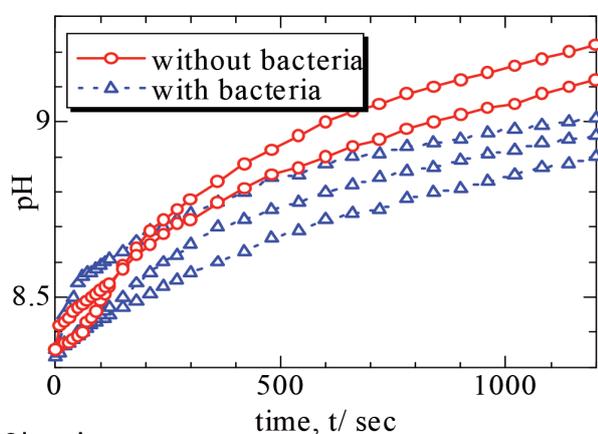
図2 枯草菌を被覆させた実製鋼スラグを純水中に浸漬した際のpH経時変化 (Online version in color.)

ている。図を見ると、すべてのスラグについて、菌を含まない培養液を滴下した場合に比べ、菌を含む培養液を滴下した場合の方がpHの上昇速度が抑えられる傾向が見られる。これは、バイオフィルムがスラグ表面に形成された結果、Caイオン等の溶出速度が低下したためと考えている。また、スラグの種類によってpH上昇速度に差が見られた。次に、Slag 5-2およびSlag Fについて、人工海水の代わりに、純水で同様の実験を行った。結果を図2 (a), (b) にそれぞれ示す。比較のため、枯草菌を含まない培養液を滴下したスラグの結果も併せて示している。図より、人工海水の結果と比較して、純水中では、より短時間での急激なpHの上昇が見られる。また、純水中では、Slag 5-2では菌を含む培養液を滴下した場合pHの上昇が抑えられたのに対し、Slag Fについては違いはほとんど見られなかった。

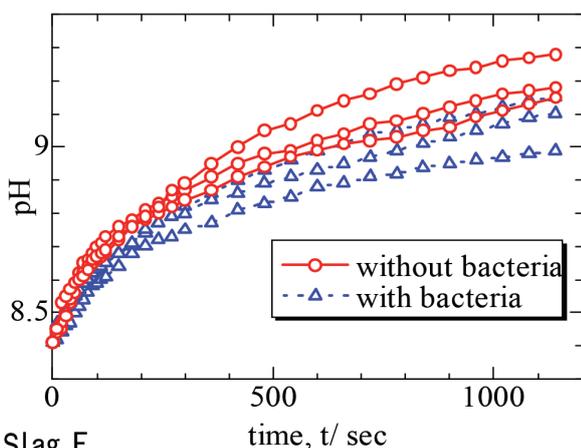
また、海洋菌を含む培養液を滴下して、海洋菌バイオフィルムで被覆したSlag 5-2、A、Fを人工海水に浸漬させたときのpH経時変化を図3 (a) ~ (c) に示す。比較のため、海洋菌を含まない培養液を滴下したスラグの結果も併せて示している。図を見ると、すべてのスラグについて、菌を含まな



(a) Slag 5-2



(b) Slag A



(c) Slag F

図3 海洋菌を被覆させた実製鋼スラグを人工海水中に浸漬した際のpH経時変化 (Online version in color.)

い培養液を滴下した場合に比べ、菌を含む培養液を滴下した場合の方がpHの上昇速度が抑えられる傾向が見られる。これは、バイオフィームがスラグ表面に形成された結果、Caイオン等の溶出速度が低下したためと考えている。一方で、バイオフィームの種類によって同じスラグでも菌の種類や溶出する水溶液の種類により、pH上昇速度に差が見られた。

このことは、バイオフィームと一口に言っても、菌の種類や溶出する水溶液の種類により、バイオフィームの成長挙動やスラグ溶出挙動への影響が異なることを示している。

以上の結果より、本実験条件においては、スラグ上にバイオフィームを形成することにより、おおむね、pHの上昇速度が抑えられる傾向が見られ、バイオフィームはCaイオン等の溶出速度を低下させることが示唆された。しかしながら、菌種、バイオフィーム成長条件、溶出液等、実験条件の影響等により、溶出試験の結果の傾向が異なる場合もあり¹¹⁻¹³⁾、目標の1つである「バイオフィームによりスラグ溶出挙動を自在に制御」できるまでの知見を得ることはできなかった。その理由としては、バイオフィーム生成には水が必須であるが、水の存在は同時にスラグ表面の性状を変化させるため、溶出挙動へのバイオフィームの効果の詳細が明らかにできなかったためなどが考えられる。そのため、この問題については、バイオフィーム生成当初から同時に溶出挙動を評価するという方法などで解決可能ではないかと考えている。

5 まとめ

以上、研究会の委員各自が進めた様々な研究の中で、主査である平井が主に携わった3つの研究について簡単に紹介した。研究会全体として得られた成果について、重点研究項目ごとの成果を簡単に整理して以下に記載する。

重点研究項目1「バイオフィームで被覆した製鋼スラグからの溶出挙動の評価」については、バイオフィームは概ねスラグ浸漬時におけるpH上昇速度を低下させること、スラグ種や菌種が異なるとバイオフィームが製鋼スラグの溶出挙動に与える影響が異なることがわかった。

重点研究項目2「製鋼スラグ上に生成したバイオフィーム定量法の検討」については、従来法では定量が困難であるスラグ上のバイオフィーム定量について、TOC法やA3法、菌DNAの蛍光標識法¹³⁾等により製鋼スラグ上に生成したバイオフィーム定量が可能であることがわかった。

重点研究項目3「実環境中で製鋼スラグ上に生成するバイオフィームの菌叢解析」については、伊勢湾沿岸に浸漬した実製鋼スラグ上に生成したバイオフィームについて菌叢解析を行ったところ、ガラスや石、スポンジ上と比較して、実スラグ上のバイオフィームは硫酸化に関わる環境浄化細菌が多く存在していることがわかった。とりわけ塩基度の高いスラグにおいてその傾向が顕著であった。

重点研究項目4「環境が製鋼スラグ上に生成するバイオフィームに与える効果の調査」については、フミン酸の適量添加によりスラグ上の常在菌バイオフィーム形成が促進された⁴⁾。また、純水への溶出前にスラグに殺菌灯を照射すると

溶出しにくくなるが、溶出中にスラグに殺菌灯を照射すると溶出しやすくなることがわかった¹⁴⁾。

ただし、前述の通り目標の1つである「バイオフィルムによりスラグ溶出挙動を自在に制御」できるまでの知見を得ることはできなかった。それは、バイオフィルム生成には水が必須であるが、水の存在は同時にスラグ表面の性状を変化させるため、溶出挙動へのバイオフィルムの効果の詳細が明らかにできなかったためである。この問題については、バイオフィルム生成当初から同時に溶出挙動を評価するという方法などで解決可能ではないかと考えている。今後後継のフォーラム活動を通じて明らかにしていきたいと考えている。

最後になりましたが、素晴らしい研究成果を挙げられた研究会I「バイオフィルム被覆によるスラグ新機能創出」のメンバー全員に心より感謝申し上げます。また、本研究会をご推薦、ご支援頂いた日本鉄鋼協会 評価・解析・分析部会、環境・エネルギー・社会工学部会（現サステナブルシステム部会）、高温プロセス部会の関係者の方々に対し、厚く御礼申し上げます。更に、本稿で挙げた3つの研究を進める際の実験データ取得を行ってくれた鈴鹿工業高等専門学校生物応用化学科平井研究室、小川研究室、甲斐研究室の学生の皆さんに感謝いたします。

参考文献

- 1) 鉄鋼スラグ統計年報（2020年度版）、鉄鋼スラグ協会、（2021年7月）。
- 2) 宮田康人：ふえらむ、25（2020）12、788。
- 3) 小杉知佳：ふえらむ、25（2020）12、795。
- 4) 平井信充, 藤本夏鈴, 加藤花, 兼松秀行, 生貝初：溶融塩化学討論会要旨集, 49（2017）, 96。
- 5) 平井信充, 岩田果久, 杉田大地, 兼松秀行：材料とプロセス, 28（2015）2, 507, CD-ROM。
- 6) H. Dong and B. Yu：Episodes, 30（2007）, 202。
- 7) A. Ogawa, R. Tanaka, N. Hirai, T. Ochiai, R. Ohashi, K. Fujimoto, Y. Akatsuka and M. Suzuki：Int. J. Mol. Sci., 21（2020）18, 6945。
- 8) 小川亜希子, 田中礼士, 鈴木賢紀, 平井信充：研究会I「バイオフィルム被覆によるスラグ新機能創出」成果報告書, 日本鉄鋼協会,（2022）, 41。
- 9) 甲斐穂高, 中根十愛, 梅川響, 東浦芙宇, 平井信充：J. Technology and Education, 28（2021）1, 17。
- 10) 平井信充, 田中萌々, 廣田さくら, 加藤花, 中川元斗：研究会I「バイオフィルム被覆によるスラグ新機能創出」成果報告書, 日本鉄鋼協会,（2022）, 7。
- 11) 魚石凱斗, 高崎康志, 井上亮：研究会I「バイオフィルム被覆によるスラグ新機能創出」成果報告書, 日本鉄鋼協会,（2022）, 11。
- 12) 川崎大輝, 松浦宏行：研究会I「バイオフィルム被覆によるスラグ新機能創出」成果報告書, 日本鉄鋼協会,（2022）, 18。
- 13) 高橋利幸：鉄と鋼, 106（2020）12, 961。
- 14) 横山誠二, 安池俊也, Li Bin, 笹野順司：研究会I「バイオフィルム被覆によるスラグ新機能創出」成果報告書, 日本鉄鋼協会,（2022）, 45。

（2022年1月14日受付）