

# 処理済都市廃水存在下における製鋼スラグ由来元素の植物プランクトンに対する有効性

有田 康一\*・海口 靖幸\*・谷口 旭\*<sup>2</sup>

Availability of Elements Originated from Steelmaking Slag for Phytoplankton Enriched Simultaneously with Treated Urban Sewage

Koichi ARITA, Yasuyuki UMIGUCHI and Akira TANIGUCHI

**Synopsis** : Availability of the elements originated from decarburization steelmaking slag, such as iron, phosphorus and silicon, was confirmed in the previous part of this paper. However, the slag does not contain nitrogen. On the other hand, treated urban sewage is rich in ammoniac nitrogen, while relatively poor in phosphorus. In this part, combined effect of the slag and the sewage on growth of the marine planktonic diatom *Thalassiosira guillardii* was tested. Media used in the growth experiments were modified ESAW media, in which the powdered slag and/or the sewage were/was added. Growth response of the diatom was determined by changed *in vivo* chlorophyll *a* fluorescence. The results obtained suggest that, although the combined effect is usually significant, the availability of the elements can sometime be reduced under a certain experimental condition.

**Key words** : marine planktonic diatom; decarburization steelmaking slag; treated urban sewage; enrichment.

## 1. 緒言

筆者らは前報<sup>1)</sup>において、製鋼スラグに由来する鉄、りんおよび珪素が植物プランクトンの増殖に有効であるという事を明らかにした。しかし、製鋼スラグはもうひとつの必須栄養元素である窒素を含有していない。

一方、処理済都市廃水には高濃度のアンモニア態窒素が残存している。しかし、りんは技術進歩によりその大半が除去されている<sup>2)</sup>ため、処理済都市廃水が直接放流されている沿岸海域は窒素過多となり、りんが相対的に不足したバランスの崩れた栄養塩環境となっている。

もし、処理済都市廃水と製鋼スラグとを適切に配合利用することにより、互いに不足する元素を補って栄養塩環境を整え、海洋の基礎生産者である植物プランクトンを増殖させることができるならば、沿岸海域における生物生産を高めるとともに、地球温暖化の原因とされている二酸化炭素を光合成によって固定することも可能になる。ただし、製鋼スラグは鉄、りんおよび珪素を含有し、また処理済都市廃水は窒素、りんおよび珪素に加えて鉄も含有していると考えられるので、両者の併用では鉄、りんおよび珪素が重複供給されることになる。

そこで本報では、これらを併用することを想定した条件下で両者に由来する鉄、りん、珪素および窒素が植物プランクトンの増殖に利用可能であるか否かを確認した上で、併用時に重複する鉄、りんおよび珪素の有用性の変化について検討した。

## 2. 実験方法

### 2.1 供試材, 実験方法

供試製鋼スラグには前報<sup>1)</sup>と同じ脱炭スラグの粒径5-20  $\mu\text{m}$ の粉碎粒子(以下スラグとする)を用いた。その成分組成は、Total F・17.9%、 $\text{P}_2\text{O}_5$ ・2.1%、 $\text{SiO}_2$ ・14.1%、CaO・43.4%、MnO・3.4%、MgO・8.6%、S・0.07%、 $\text{Al}_2\text{O}_3$ ・2.8%、 $\text{TiO}_2$ ・0.91%および others・6.9%であった(東北大学工学部日野研究室調べ)。

供試処理済都市廃水(以下、処理廃水とする)は、活性汚泥処理後、海洋放流のために塩素処理を施した最終処理廃水で、2000年11月29日に仙台市南蒲生浄化センターより分与していただいた。同センターによれば、処理廃水は水質汚濁防止法に定められた全項目について水質検査されたのち放流されている。例えば微量金属としては、カドミウム、鉛および水銀とそれらの化合物、銅、亜鉛、可溶性鉄、可溶性マンガン、クロムの濃度が測定され、すべてが検出限界以下であることが確認されている。残留有機物および本研究で問題となる栄養塩類については、本試水採水日から翌日にかけて通日検査が行われ、そのデータの提供を受けた。その平均値をTable 1に示す。ただし本実験に用いる際には、新たに $\text{NH}_4\text{-N}$ (アンモニア態窒素)、 $\text{NO}_3\text{-N}$ (硝酸態窒素)、 $\text{NO}_2\text{-N}$ (亜硝酸態窒素)、 $\text{PO}_4\text{-P}$ (りん酸態りん)および $\text{SiO}_2\text{-Si}$ (珪酸態珪素)の濃度を自動水質分析計(ALPKEM, The Flow Solution model 3590)で測定した。その測定値は「2.4 実験3: 処理廃水添加実験」

平成14年8月21日受付 平成14年12月24日受理 (Received on Aug. 21, 2002; Accepted on Dec. 24, 2002)

\* 東北大学大学院生 (Graduate Student, Tohoku University, 1-1 Tsutsumidori-Amamiyamachi Aoba-ku Sendai 981-8555)

\* 2 東北大学大学院農学研究科 (Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University)

Table 1. Average of data on water quality obtained every second hour ( $n=12$ ) of the treated urban sewage analyzed at Minami-Gamo Sewage Treatment Plant, where the sewage for this experiment was taken.

| Item               |           |
|--------------------|-----------|
| pH                 | 7.3       |
| Transparency       | 48.9 cm   |
| SS                 | 4.5 mg/L  |
| COD                | 11.7 mg/L |
| BOD                | 17.3 mg/L |
| ATU-BOD            | 3.3 mg/L  |
| TOC                | ND        |
| NH <sub>4</sub> -N | 1399 μM   |
| NO <sub>2</sub> -N | 21.7 μM   |
| NO <sub>3</sub> -N | 5.0 μM    |
| Total N            | 1780 μM   |
| PO <sub>4</sub> -P | 3.8 μM    |
| Total P            | 11.6 μM   |
| Ca                 | 461 μM *  |

\* $n=6$

の本文中に示した。この処理廃水から大型の懸濁物およびバクテリアを除去するために、孔径 0.7 μm のガラスファイバーフィルター (Whatman, GF/F)、さらに孔径 0.2 μm のポリカーボネートメンブレンフィルター (MILLIPORE, GTTP) で濾過した。濾過した処理廃水は、実験に供するまで -80°C のディープフリーザー (SANYO, MDF-493) 内に凍結保存した。

供試培地には前報<sup>1)</sup>と同様、ESAW 培地<sup>3)</sup>を適宜改変して用いた。自然海水を模した ESAW 培地の窒素源は硝酸態窒素である。それに対して処理廃水中の窒素の大部分はアンモニア態窒素である。そこで本研究では、両者の窒素形態を合致させるために ESAW 培地の窒素源を塩化アンモニウムに改変した。この ESAW 培地の調製に必要な Solution I および Solution II の組成を Table 2 に、Nutrient Enrichment Stock の組成を Table 3 にそれぞれ示す。なお、これら溶液および培地の調製の詳細については前報<sup>1)</sup>に記載した。

供試植物プランクトンは、前報<sup>1)</sup>と同じ ESAW 培地にて継代培養しておいた海洋浮游性珪藻 *Thalassiosira guillardii*<sup>4)</sup> である。この株を硝酸態窒素からアンモニア態窒素へ段階的に改変した ESAW 培地に植え継ぎ、アンモニア態窒素に馴化させた。なぜなら培地の改変時に ESAW 培地の規定窒素濃度を基準としたため、アンモニア態窒素の最終濃度が植物プランクトンの増殖を阻害する可能性のある水準<sup>5)</sup> になったからである。さらに本研究においても鉄を対象元素とするため、前報<sup>1)</sup>と同様に鉄飢餓培養を行った。使用した培養器具とその洗浄および培養条件は前報<sup>1)</sup>と同じである。また、*T. guillardii* の増殖も前報<sup>1)</sup>と同様、24h ごとに蛍光光度計 (TURNER DESIGNS, MODEL 10-AU-005-CE) を用いて *in vivo* chlorophyll *a* 蛍光値 (以下蛍光値とする) で記録した。

## 2.2 実験1: FeEDTA 添加実験

植物プランクトンがアンモニア態窒素を利用する際には

Table 2. Basal solutions (×10 conc.) of artificial seawater to be used for ESAW medium.

| Solution I:                          | Amount to Weight |
|--------------------------------------|------------------|
| Anhydrous salts                      |                  |
| NaCl                                 | 207.6 (g/L)      |
| Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>      | 34.8             |
| KCl                                  | 5.9              |
| NaHCO <sub>3</sub>                   | 1.7              |
| KBr                                  | 0.85             |
| H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>       | 0.23             |
| NaF                                  | 0.027            |
| Solution II:                         |                  |
| Hydrated salts                       |                  |
| MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O | 94.0             |
| CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O | 13.2             |
| SrCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O | 0.21             |

Table 3. Nutrient Enrichment Stocks (×1000 conc.) for ESAW medium.

| Enrichment Stocks | Stock Conc. (g/L)                                   | Final Conc. (μM) |
|-------------------|---|------------------|
| Stock N           | NH <sub>4</sub> Cl *                                | 29.4             |
| Stock P           | NaHPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O               | 3.1              |
| Stock Si **       | Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> ·9H <sub>2</sub> O | 15               |
| Stock Fe          | FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O                | 1.8              |
|                   | Na <sub>2</sub> EDTA·2H <sub>2</sub> O ***          | 3.6              |
| Stock Metal ****  | MnSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O                | 0.58             |
|                   | ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O                | 0.073            |
|                   | CoSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O                | 0.016            |
|                   | Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O | 0.13             |
|                   | Na <sub>2</sub> EDTA·2H <sub>2</sub> O ***          | 1.9              |
| Stock B           | H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>                      | 3.8              |
| Stock Se          | Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>                    | 0.0017           |
| Vitamin Stock     | Thiamine HCl  | 0.1              |
|                   | Vitamin B12   | 0.002            |
|                   | Biotin  | 0.001            |

\* Changed from NaNO<sub>3</sub>.

\*\* Stock Si should exceptionally be prepared as ×500 concentration.

\*\*\* Add before the trace metals.

\*\*\*\* Adjust to pH 6 using solid NaCO<sub>3</sub> (about 2 g).

Table 4. Five treatments in Experiment 1 with final concentrations of iron and EDTA enriched.

| Treatment     | Enrichment (Final Conc.) |           |
|---------------|--------------------------|-----------|
|               | Fe (μM)                  | EDTA (μM) |
| Control       | 6.6                      | 14.9      |
| 1/10 FeEDTA   | 0.66                     | 6.1 *     |
| 1/100 FeEDTA  | 6.6 × 10 <sup>-2</sup>   | 5.2 **    |
| 1/1000 FeEDTA | 6.6 × 10 <sup>-3</sup>   | 5.1 ***   |
| Non Fe        | 0                        | 5.1       |

\* 5.1+0.98

\*\* 5.1+9.8 × 10<sup>-2</sup>

\*\*\* 5.1+9.8 × 10<sup>-3</sup>

硝酸還元酵素の働きを要しない分、硝酸態窒素利用時に比べて鉄要求量が減少すると考えられる<sup>6)</sup>。そこで実験1では、Table 4 に示した実験条件下で培養実験を行い、アンモニア態窒素存在下における *T. guillardii* の鉄要求量を調べた。

原理的には、生物学的に有用な鉄である FeEDTA を段階的な濃度で添加して律速鉄濃度 (閾値) を把握するものであり、手順は前報<sup>1)</sup>と同様である。基礎となる培地は、りんおよび珪素の律速がおこることを回避するために両元素の濃度を ESAW 培地の規定最終濃度 (20 μM P, 105.6 μM Si) の 1.5 倍とした鉄無添加の P<sub>Si</sub> 1.5 培地である。この培地に FeEDTA 溶液 (Stock Fe, Table 3) を ESAW 培地の規定最終濃度 (6.6 μM Fe, 9.8 μM EDTA) に対して等倍、1/10 倍、1/100 倍および 1/1000 倍に希釈添加した。このうち等倍の FeEDTA 添加区は、最も良好な条件を備えているものと考えられるので Control 区とした。その他の FeEDTA 添加区は順に 1/10 FeEDTA 区、1/100 FeEDTA 区および 1/1000 FeEDTA 区とした。さらにコンタミした鉄による影響を確認するために鉄無添加の Non Fe 区を設けた。以上計5区の実験区はそれぞれ2本立てとし、その平均値を結果とする。なお、ここで設定した Control 区および Non Fe 区は、以降すべての実験に共通して用いた。

Table 5. Ten treatments in Experiment 2 to test availability of iron, phosphorus and silicon originated from decarburization steelmaking slag.

| Medium  | Treatment | Preadded Concentration (μM) |    |       |     |      | Slag enriched (mg/L) |
|---------|-----------|-----------------------------|----|-------|-----|------|----------------------|
|         |           | NH <sub>4</sub> -N          | P  | Si    | Fe  | EDTA |                      |
| PSi 1.5 | Control * | 549.1                       | 30 | 158.4 | 6.6 | 14.9 | 0                    |
|         | Non Fe *  | 549.1                       | 30 | 158.4 | 0   | 5.1  | 0                    |
|         | Slag 20   | 549.1                       | 30 | 158.4 | 0   | 5.1  | 20                   |
|         | Slag 50   | 549.1                       | 30 | 158.4 | 0   | 5.1  | 50                   |
|         | FeEDTA    | 549.1                       | 0  | 158.4 | 6.6 | 14.9 | 0                    |
| P 0     | Slag 20   | 549.1                       | 0  | 158.4 | 0   | 5.1  | 20                   |
|         | Slag 50   | 549.1                       | 0  | 158.4 | 0   | 5.1  | 50                   |
|         | Si 0      | 549.1                       | 30 | 0     | 6.6 | 14.9 | 0                    |
| Si 0    | Slag 20   | 549.1                       | 30 | 0     | 0   | 5.1  | 20                   |
|         | Slag 50   | 549.1                       | 30 | 0     | 0   | 5.1  | 50                   |

\* Common with Experiment 1.

### 2.3 実験2：スラグ添加実験

前報<sup>1)</sup>では、硝酸態窒素存在下においてスラグ由来の鉄、りんおよび珪素の有用性を確認した。しかし、処理廃水と併用するためには、その含有窒素の大半を占めるアンモニア態窒素存在下においても、スラグ由来の各元素が *T. guillardii* の増殖に有効であることを確かめておく必要がある。そこで実験2では、Table 5 に示した実験条件下で培養実験を行い、アンモニア態窒素存在下におけるスラグ由来の3元素の有用性をそれぞれ確認した。

基礎培地としては、実験1で使用した PSi 1.5 培地の他に P 0 培地および Si 0 培地を鉄無添加で調製した。PSi 1.5 培地はスラグ由来鉄の有用性を確認するために使用した。P 0 培地はスラグ由来りの有用性を確認するために、りんは無添加で珪素濃度だけを規定最終濃度 (105.6 μM Si) の1.5倍として珪素律速を回避した培地である。同様に Si 0 培地は珪素無添加でりん濃度だけを規定最終濃度 (20 μM P) の1.5倍とした培地であり、スラグ由来珪素の有用性を確認するために使用した。これら3種類の培地に対して鉄源としてスラグを添加したスラグ添加区をそれぞれ設けた。スラグの最終添加量は前報<sup>1)</sup>により 20 mg/l および 50 mg/l として、それぞれ Slag 20 区および Slag 50 区とした。PSi 1.5 培地においては、これらスラグ添加区と実験1の Control 区および Non Fe 区と比較し、P 0 培地および Si 0 培地においては、FeEDTA 溶液 (Stock Fe) を ESAW 培地の規定最終濃度となるように添加した FeEDTA 区をそれぞれ設定して比較した。以上計 10 実験区のうち、PSi 1.5 培地の実験区を2本立てとした以外はすべて3本立てとし、その平均値を結果とする。なお、前報<sup>1)</sup>と同様、FeEDTA を鉄源とする実験区以外には EDTA を追加添加していない。これは以降の実験も同じである。

### 2.4 実験3：処理廃水添加実験

処理廃水を窒素源として添加する場合、同時にりんおよび珪素も添加されることになる。また、検出限界 (0.1 ppm=1.8 μM Fe) 以下ではあるものの、鉄も含有されると考えられる。そこで実験3では、Table 6 に示した実験条件下で培養実験を行い、処理廃水に由来するこれら4元素の有用性を確認した。

基礎培地は、実験2で使用した PSi 1.5 培地、P 0 培地および Si 0 培地を鉄および窒素無添加で調製した。これらの

Table 6. Thirteen treatments in Experiment 3 to test availability of nitrogen, iron, phosphorus and silicon originated from treated urban sewage.

| Medium  | Treatment                  | Preadded Concentration (μM) |       |       |     |      | 40% Sewage Enrichment (μM) |                    |                    |                    |                      |    |
|---------|----------------------------|-----------------------------|-------|-------|-----|------|----------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|----------------------|----|
|         |                            | NH <sub>4</sub> -N          | P     | Si    | Fe  | EDTA | NH <sub>4</sub> -N         | NO <sub>3</sub> -N | NO <sub>2</sub> -N | PO <sub>4</sub> -P | SiO <sub>2</sub> -Si | Fe |
| PSi 1.5 | Control *                  | 549.1                       | 30    | 158.4 | 6.6 | 14.9 | 0                          | 0                  | 0                  | 0                  | 0                    | 0  |
|         | Non Fe *                   | 549.1                       | 30    | 158.4 | 0   | 5.1  | 0                          | 0                  | 0                  | 0                  | 0                    | 0  |
|         | Non N-FeEDTA               | 0                           | 30    | 158.4 | 6.6 | 14.9 | 0                          | 0                  | 0                  | 0                  | 0                    | 0  |
|         | Sewage-FeEDTA              | 0                           | 30    | 158.4 | 6.6 | 14.9 | 601                        | 8.9                | 9.1                | 1.8                | 91.9                 | ND |
|         | Sewage-Non Fe              | 0                           | 30    | 158.4 | 0   | 5.1  | 601                        | 8.9                | 9.1                | 1.8                | 91.9                 | ND |
| P 0     | NH <sub>4</sub> -FeEDTA ** | 549.1                       | 0     | 158.4 | 6.6 | 14.9 | 0                          | 0                  | 0                  | 0                  | 0                    | 0  |
|         | NH <sub>4</sub> -Non Fe    | 549.1                       | 0     | 158.4 | 0   | 5.1  | 0                          | 0                  | 0                  | 0                  | 0                    | 0  |
|         | Sewage-FeEDTA              | 0                           | 0     | 158.4 | 6.6 | 14.9 | 601                        | 8.9                | 9.1                | 1.8                | 91.9                 | ND |
|         | Sewage-Non Fe              | 0                           | 0     | 158.4 | 0   | 5.1  | 601                        | 8.9                | 9.1                | 1.8                | 91.9                 | ND |
|         | Si 0                       | NH <sub>4</sub> -FeEDTA **  | 549.1 | 30    | 0   | 6.6  | 14.9                       | 0                  | 0                  | 0                  | 0                    | 0  |
| Si 0    | NH <sub>4</sub> -Non Fe    | 549.1                       | 30    | 0     | 0   | 5.1  | 0                          | 0                  | 0                  | 0                  | 0                    |    |
|         | Sewage-FeEDTA              | 0                           | 30    | 0     | 6.6 | 14.9 | 601                        | 8.9                | 9.1                | 1.8                | 91.9                 |    |
|         | Sewage-Non Fe              | 0                           | 30    | 0     | 0   | 5.1  | 601                        | 8.9                | 9.1                | 1.8                | 91.9                 |    |

\* Common with Experiment 1.

\*\* Common with Experiment 2.

培地に塩化アンモニウムを規定量 (Table 3) 添加したアンモニア添加区 (NH<sub>4</sub> 区) および窒素源として処理廃水を添加した処理廃水添加区 (Sewage 区) をそれぞれ設けた。さらに PSi 1.5 培地には窒素無添加の Non N 区も設けた。なお、処理廃水の添加量は、あらかじめ測定した処理廃水中のアンモニア態窒素濃度 (1502 μM) から、ESAW 培地の窒素濃度 (549.1 μM) と同程度になるように 40% とした。ただし、処理廃水中にはアンモニア態窒素以外にも硝酸態窒素および亜硝酸態窒素がそれぞれ 22.1 μM および 22.8 μM 存在していたので、Sewage 区における全窒素の最終濃度は ESAW 培地よりも高くなった。また、Sewage 区の塩分は、Solution I, II と蒸留水を用いて調整した。

まず、処理廃水由来窒素の有用性を確認するために、PSi 1.5 培地の Non N 区および Sewage 区に FeEDTA 溶液 (Stock Fe) を ESAW 培地の規定最終濃度となるように添加した FeEDTA 添加区を設けた。これらを順に Non N-FeEDTA 区および Sewage-FeEDTA 区とした。さらに処理廃水由来鉄の有用性を確認するために、同培地の Sewage 区に鉄無添加の Non Fe 区 (Sewage-Non Fe 区) も設けた。なお、これらと比較する NH<sub>4</sub> 区の FeEDTA 添加区および Non Fe 区には、実験1の Control 区および Non Fe 区を用いた。

次いで、処理廃水中に含まれているりん酸態りん (4.4 μM) および珪酸態珪素 (229.9 μM) の有用性を確認するために、P 0 培地および Si 0 培地の NH<sub>4</sub> 区および Sewage 区にそれぞれ FeEDTA 添加区 (Sewage-FeEDTA 区、NH<sub>4</sub>-FeEDTA 区) および Non Fe 区 (Sewage-Non Fe 区、NH<sub>4</sub>-Non Fe 区) を設けた。ただし、両培地の NH<sub>4</sub>-FeEDTA 区は実験2と共通して用いた。これらを実験1の Control 区を基準として培地ごとと比較した。

以上計 13 実験区のうち、Control 区および Non Fe 区に Non N-FeEDTA 区および NH<sub>4</sub>-Non Fe 区をあわせた5実験区を2本立てとした以外はすべて3本立てとし、その平均値を結果とする。

### 2.5 実験4：スラグおよび処理廃水の同時添加実験

スラグおよび処理廃水をそれぞれ鉄源および窒素源として同時に添加した場合には、両者に由来する鉄、りんおよび珪素が重複する。そこで実験4では、同時添加時におい

Table 7. Ten treatments in Experiment 4 to test the combined effect of decarburization steelmaking slag and treated urban sewage.

| Medium  | Treatment               | Preadded Concentration (μM) |       |    |       |      | Enrichment    |             |    |
|---------|-------------------------|-----------------------------|-------|----|-------|------|---------------|-------------|----|
|         |                         | NH <sub>4</sub> -N          | P     | Si | Fe    | EDTA | Sewage*** (%) | Slag (mg/L) |    |
| PSi 1.5 | Control                 | *                           | 549.1 | 30 | 158.4 | 6.6  | 14.9          | 0           | 0  |
|         | Non Fe                  | *                           | 549.1 | 30 | 158.4 | 0    | 5.1           | 0           | 0  |
|         | Sewage-Slag 20          |                             | 0     | 30 | 158.4 | 0    | 5.1           | 40          | 20 |
|         | Sewage-Slag 50          |                             | 0     | 30 | 158.4 | 0    | 5.1           | 40          | 50 |
| P 0     | NH <sub>4</sub> -FeEDTA | **                          | 549.1 | 0  | 158.4 | 6.6  | 14.9          | 0           | 0  |
|         | Sewage-Slag 20          |                             | 0     | 0  | 158.4 | 0    | 5.1           | 40          | 20 |
|         | Sewage-Slag 50          |                             | 0     | 0  | 158.4 | 0    | 5.1           | 40          | 50 |
|         | Non Fe                  |                             | 0     | 0  | 158.4 | 0    | 5.1           | 40          | 50 |
| Si 0    | NH <sub>4</sub> -FeEDTA | **                          | 549.1 | 30 | 0     | 6.6  | 14.9          | 0           | 0  |
|         | Sewage-Slag 20          |                             | 0     | 30 | 0     | 0    | 5.1           | 40          | 20 |
|         | Sewage-Slag 50          |                             | 0     | 30 | 0     | 0    | 5.1           | 40          | 50 |
|         | Non Fe                  |                             | 0     | 30 | 0     | 0    | 5.1           | 40          | 50 |

\* Common with Experiment 1.  
 \*\* Common with Experiment 2.  
 \*\*\* For 40% Sewage Enrichment (μM) see Table 6.

でもそれぞれに由来する元素の有効性は変わらず発揮されて互いに補うことになるのか、もしくはその有効性に变化が生じるのかを Table 7 に示した実験条件下で確かめた。ただし、実験条件の比較のために、実験1の Control 区と Non Fe 区および実験2の NH<sub>4</sub>-FeEDTA 区もあわせて記してある。

基礎培地は、実験3と同じ鉄および窒素無添加の PSi 1.5 培地、P 0 培地および Si 0 培地である。これらの培地に窒素源として処理廃水を添加し、さらに鉄源としてスラグを添加した Sewage-Slag 20 区および Sewage-Slag 50 区を設けた。PSi 1.5 培地においては、同時添加時におけるスラグ由来鉄および処理廃水由来窒素の有効性について、実験2および実験3における個別添加時の結果と比較して確認した。P 0 培地および Si 0 培地においても同様に、同時添加時における両者由来のりんまたは珪素の有効性について、実験2および実験3における個別添加時の結果と比較して確認した。なお、各培地における同時添加区はすべて3本立てとし、その平均値を結果とする。

### 3. 結果と考察

以下の実験結果については、*Thalassiosira guillardii* の培養開始から定常期に至るまでの増殖曲線に基づいて考察し、定常期以降の変動は考慮にいれなかった。

#### 3.1 アンモニア態窒素存在下における *T. guillardii* の鉄要求量

FeEDTA の添加量を段階的に変化させた PSi 1.5 培地を用いて、アンモニア態窒素存在下の *T. guillardii* の鉄要求量を調べた実験1の結果を Fig. 1 に示す。

Control 区、1/10 FeEDTA 区および 1/100 FeEDTA 区の蛍光値は、それぞれ 470 (7日目)、510 (9日目) および 470 (13日目) まで増加した。しかし、1/100 FeEDTA 区においては対数増殖期後期の延長がみられた点で他の2区とは異なった。また、前報<sup>1)</sup>の硝酸態窒素存在下の 1/100 FeEDTA 区と比較すると、その増殖曲線はよりスムーズに最大蛍光値に達していた。さらに前報<sup>1)</sup>とは異なり培養期間後半に再び増加した 1/1000 FeEDTA 区の結果は、一貫して減少した Non Fe 区の結果と類似していない。これらの

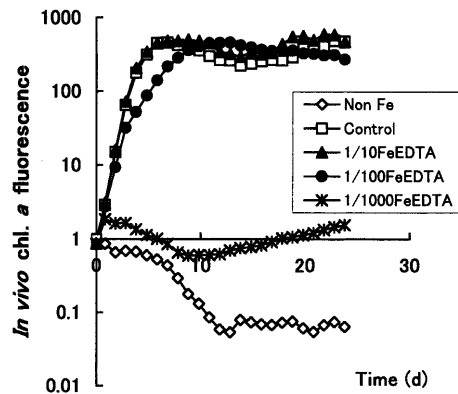


Fig. 1. Expt. 1: Variations of *in vivo* chlorophyll *a* fluorescence of *Thalassiosira guillardii* under different amounts of FeEDTA in PSi 1.5 media (modified ESAW media with 30 μM of phosphorus, 158.4 μM of silicon and 549.1 μM of ammonium).

ことより、窒素を同化する際に硝酸還元酵素の働きを要しないアンモニア態窒素存在下においては、低濃度の鉄をより効率よく利用して増殖するものと理解される。

ただし、*T. guillardii* の増殖に必要な鉄濃度の閾値が ESAW 培地の規定最終鉄濃度の 1/1000 から 1/100 にあたる 6.6 nM から 66 nM の間に存在することや、規定最終鉄濃度の 1/10 にあたる 0.66 μM 以上の有用な鉄の存在により、*T. guillardii* は規定最終濃度 (6.6 μM) の鉄が存在する場合と同様に増殖できるといった結論は前報<sup>1)</sup>と同じであった。

#### 3.2 アンモニア態窒素存在下におけるスラグ由来元素の有効性

実験2において PSi 1.5 培地、P 0 培地および Si 0 培地を用いて、アンモニア態窒素存在下におけるスラグ由来の鉄、りんおよび珪素の有効性をそれぞれ確認した結果を Fig. 2 に示す。

PSi 1.5 培地 (Fig. 2(a)) に鉄源としてスラグを添加した Slag 20 区および Slag 50 区の蛍光値は、それぞれ 500 (9日目) および 570 (10日目) まで増加し、FeEDTA を添加した Control 区の蛍光値 (470, 7日目) を上回った。この結果と実験1の結果から、前報<sup>1)</sup>と同様、ESAW 培地の規定最終鉄濃度の 1/10 にあたる 0.66 μM 以上の鉄がスラグから供給されていたことは明らかである。さらに、その添加量とともにわずかながらも最大蛍光値が増加して Control 区を上回ったこともあわせて考えると、アンモニア態窒素存在下においてスラグは鉄源としてより有効である可能性が示された。このことから、スラグ由来のりんおよび珪素の有効性については、各元素無添加の培地 (P 0 培地および Si 0 培地) におけるスラグ添加区と FeEDTA 区 (スラグ無添加区) の増殖曲線を比較することで確認することができる。

P 0 培地 (Fig. 2(b)) における FeEDTA 区の蛍光値が4日目にかけて4倍程度まで増加したのは、前報<sup>1)</sup>と同様、前培養時に細胞内に蓄積されていたりんによるものと考えられた。一方、Slag 20 区および Slag 50 区の蛍光値はともに6日目に 140 および 220 まで増加した。PSi 1.5 培地の結果

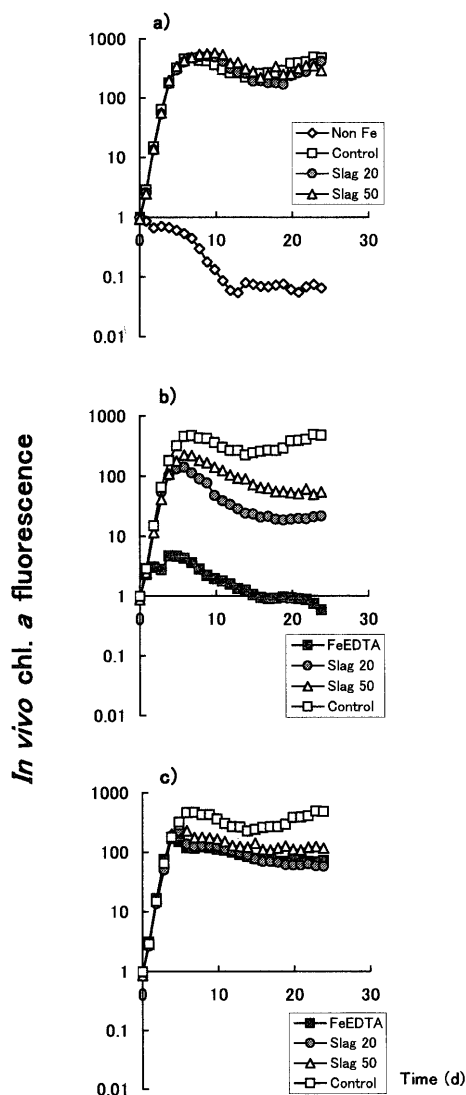


Fig. 2. Expt. 2: Variations of *in vivo* chlorophyll *a* fluorescence of *Thalassiosira guillardii* in modified ESAW media containing three different concentrations of phosphorus and silicon with addition of two different amounts of decarburization steelmaking slag or FeEDTA. (a) PSi 1.5 medium with 30  $\mu\text{M}$  of phosphorus, 158.4  $\mu\text{M}$  of silicon and 549.1  $\mu\text{M}$  of ammonium; (b) P 0 medium with no phosphorus, 158.4  $\mu\text{M}$  of silicon and 549.1  $\mu\text{M}$  of ammonium; (c) Si 0 medium with no silicon, 30  $\mu\text{M}$  of phosphorus and 549.1  $\mu\text{M}$  of ammonium.

(Fig. 2(a)) から、この培地においても鉄はスラグから十分に供給されていると考えられるので、スラグ添加により鉄制限とともにりん制限も解除されたと理解できる。そしてそのスラグからのりん供給効果は、添加量に伴い増大したことがわかる。ただし、両スラグ添加区における増殖は Control 区にはおよばなかったことから、スラグから供給されたりん濃度は 30  $\mu\text{M}$  (Control 区のりん濃度) 未満であり、再びりんが律速したと考えられる。以上の結果から、アンモニア態窒素存在下においてもスラグを鉄源として添加すれば、同時にりんも供給されることが確認された。ただし、検討したスラグ添加量では、鉄律速は解除されるもののりん制限となることが示された。

Si 0 培地 (Fig. 2(c)) における FeEDTA 区の蛍光値が 4 日

目にかけて 170 まで増加したことから、前報<sup>1)</sup>と同様、実験の過程で使用した様々なガラス器具からの珪素のコンタミを防ぐことはできなかった。珪素について定量的な評価をするためには対策が必要ではあるが、*T. guillardii* の増殖を蛍光値により簡便にモニタリングするためにガラス製のキュベットを使用することは避けられない。したがって、今後は培地調製時に使用する器具をポリカーボネート製にするなどの配慮が必要であると考えられた。しかしこのようなコンタミの影響を受けながらも、Slag 20 区および Slag 50 区の蛍光値はともに 5 日目に 230 および 300 まで増加して FeEDTA 区を上回り、スラグ添加量に伴う珪素供給効果が示された。ただし、両スラグ添加区における増殖は Control 区にはおよばなかったことから、スラグから供給された珪素濃度は 158.4  $\mu\text{M}$  (Control 区の珪素濃度) 未満であり、再び珪素が律速したと考えられる。以上の結果から、アンモニア態窒素存在下においてもスラグを鉄源として添加すれば、同時に珪素も供給されることが確認された。ただし、検討したスラグ添加量では珪素律速を回避するには至らなかった。

以上実験 2 の結果をまとめると、鉄無添加の培地に鉄源としてスラグを 20 mg/l 以上になるように添加すると、硝酸態窒素存在下と同様にアンモニア態窒素存在下においても、スラグ由来鉄により鉄律速が解除されると同時にりんおよび珪素も供給されることが明らかとなった。さらに、アンモニア態窒素存在下においてスラグは鉄源としてより有効である可能性も示された。一方、りんおよび珪素が律速している場合には、検討したスラグ添加量ではそれぞれの律速を回避するには至らず再び制限を受けてしまうことが示された。ところで、スラグを 50 mg/l 添加した場合にその組成と添加量から供給が期待されるりんおよび珪素濃度は、それぞれ 14.8  $\mu\text{M}$  および 116.2  $\mu\text{M}$  である。これに対して Control 区のりんおよび珪素濃度は、それぞれ 30  $\mu\text{M}$  および 158.4  $\mu\text{M}$  である。したがって、りんはスラグからすべて溶出したとしても Control 区の約 50% のため律速は避けられない。一方、珪素はすべて溶出した場合には Control 区の約 70% にまでおよぶ。さらにコンタミした珪素により増殖可能であったこともあわせて考えると、スラグからの珪素溶出率が低いために律速を回避するには至らなかったと理解される。これらの結論は前報<sup>1)</sup>と一致しており、窒素条件が異なってもりんおよび珪素供給源としてのスラグの有効性に大きな変化はみられないことが示された。

### 3.3 栄養源としての処理廃水の有効性

実験 3 において窒素源として処理廃水を添加した PSi 1.5 培地、P 0 培地および Si 0 培地を用いて、その窒素の有用性および同時に添加されることになる鉄、りんおよび珪素の有用性をそれぞれ確認した結果を Fig. 3 に示す。

PSi 1.5 培地 (Fig. 3(a)) における窒素無添加区 (Non N-FeEDTA 区) の蛍光値は 3 日目にかけて 10 まで増加したが、Control 区と比較すると窒素が律速していることは明らかであった。一方、窒素源として処理廃水を添加した

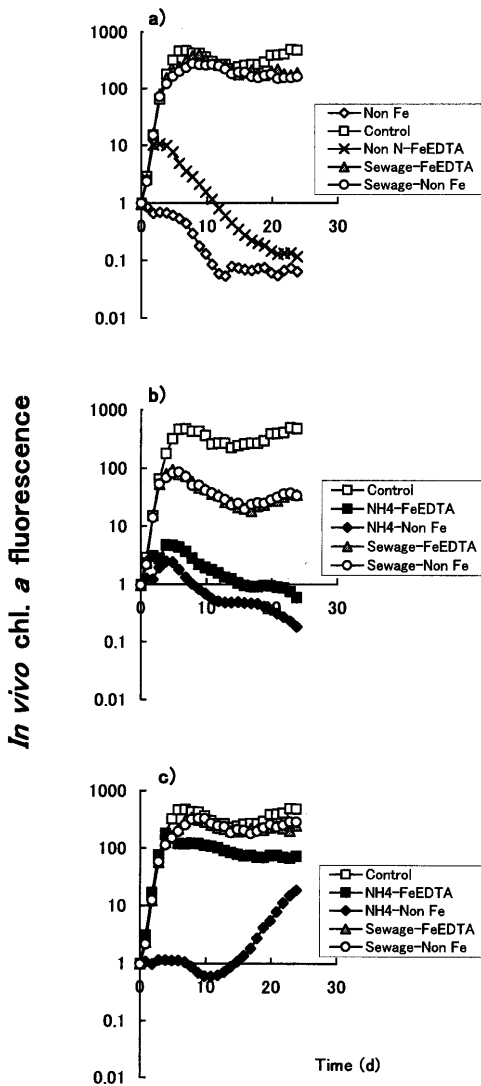


Fig. 3. Expt. 3: Variations of *in vivo* chlorophyll *a* fluorescence of *Thalassiosira guillardii* in modified ESAW media containing treated urban sewage at amount of 40% (v/v). (a) Modified PSi 1.5 medium with no ammonium; (b) modified P 0 medium with no ammonium; (c) modified Si 0 medium with no ammonium.

Sewage-FeEDTA 区の蛍光値は9日目に410に達した。すなわち、Control 区(7日目, 470)とほぼ同程度にまで増加したことから、処理廃水の添加により窒素制限が解除されたと理解できる。よって、処理廃水は窒素源として有効であることが明らかとなった。ただし、Sewage-FeEDTA 区においてみられた対数増殖期後期の延長は、高濃度のアンモニア態窒素による増殖阻害<sup>5)</sup>の可能性は否定できない。なぜなら処理廃水添加区のアンモニア態窒素濃度は、*T. guillardii*を馴化させたアンモニア態窒素濃度にあたるControl 区の濃度よりも約50 μM(全窒素濃度では約70 μM)高い濃度であったからである。

また、鉄無添加区(Non Fe 区)の蛍光値は一貫して減少したのに対して、Sewage-Non Fe 区の蛍光値は8日目に270まで増加した。このことから、処理廃水の添加により窒素とともに鉄が供給され、鉄制限が解除されたと理解できる。しかし、Control 区(7日目, 470)や Sewage-

FeEDTA 区(9日目, 410)にはおよばなかったことより、処理廃水由来の鉄だけでは不十分だったことがわかる。以上の結果から、処理廃水は窒素源として有効であり、同時に *T. guillardii*の増殖に有用な鉄も供給できることが明らかとなった。

P 0培地(Fig. 3(b))における処理廃水添加区(Sewage-FeEDTA 区)の蛍光値は、5日目に93にまで増加した。この結果をりん無添加区(NH<sub>4</sub>-FeEDTA 区)と比較すると、処理廃水の添加によりりん制限が解除されたことは明らかであり、窒素源として添加した処理廃水に由来するりんもまた有用であることを示している。ただし、添加した処理廃水中のりん濃度は1.8 μM程度(Table 6)なので、Control 区(30 μM P)にはおおよそ再びりんが律速したと考えられる。

また、鉄無添加区(NH<sub>4</sub>-Non Fe 区)の蛍光値は4日目に2.4まで増加したのち、減少したのに対して、鉄無添加・処理廃水添加区(Sewage-Non Fe 区)の蛍光値は6日目に85まで増加した。これは Sewage-FeEDTA 区(5日目, 93)と同程度の増殖であり、前述のPSi 1.5培地の結果(Fig. 3(a))もあわせて考えると、処理廃水自体は鉄制限ではなくりん制限であると理解された。以上の結果より、窒素や鉄とともに処理廃水に由来するりんもまた *T. guillardii*の増殖に有効であることが明らかとなったが、他の2元素に比べ相対的に不足していることが示された。

Si 0培地(Fig. 3(c))における処理廃水添加区(Sewage-FeEDTA 区)および鉄無添加・処理廃水添加区(Sewage-Non Fe 区)の蛍光値は、それぞれ340(8日目)および330(9日目)まで増加した。これらはともにControl 区(7日目, 470)にはおおよばないまでも、それぞれ珪素無添加区(NH<sub>4</sub>-FeEDTA 区)および鉄無添加区(NH<sub>4</sub>-Non Fe 区)を上回った。したがって、処理廃水の添加により珪素制限が解除されたことは明らかであり、窒素源として添加した処理廃水に由来する珪素もまた有用であることを示している。また、PSi 1.5培地(Fig. 3(a))における Sewage-FeEDTA 区(9日目, 410)および Sewage-Non Fe 区(8日目, 270)と比較すると、鉄だけではなく珪素の再律速もほとんどみられないことがわかる。これは、添加した処理廃水中の珪素濃度が91.9 μM(Table 6)であることから、Control 区の珪素濃度(158.4 μM)との差分がコンタミした珪素によって補われたものと理解され、前報<sup>1)</sup>においてそのコンタミを50 μM程度と見積もったこととも良く一致する。

以上実験3の結果をまとめると、処理廃水中に含まれる窒素、鉄、りんおよび珪素は、*T. guillardii*の増殖に有効であることが明らかとなった。ただし、今回検討した40%という添加量の場合、その窒素の大半を占めるアンモニア態窒素による高濃度障害がおこる危険性が示された。一方、その他の3元素は窒素に比べて相対的に不足する傾向がみられ、とりわけりん濃度が低く、その濃度であれば鉄が律速することはないと理解された。また、珪素に関してはコンタミの効果を排除すれば律速する可能性が示された。

### 3・4 スラグおよび処理廃水の同時添加時における各由来元素の有用性

実験4において、スラグおよび処理廃水をそれぞれ鉄源および窒素源として同時に添加した P Si 1.5 培地、P 0 培地および Si 0 培地を用いて、両者に由来し重複する鉄、りんおよび珪素の有用性について確認した結果を Fig. 4 に示す。

P Si 1.5 培地 (Fig. 4(a)) においては、同時添加区の Sewage-Slag 20 区および Sewage-Slag 50 区の蛍光値はともに 10 日目に 360 および 390 に達した。したがって、同時添加時においても処理廃水由来の窒素が有効であり、また、スラグ添加量に伴い最大蛍光値の増加がみられたことからスラグ由来の鉄もまた有効であることが示された。さらに、同時添加区の最大蛍光値は、実験3 (Fig. 3(a)) の Sewage-Non Fe 区 (270, 8日目) よりも大きく Sewage-FeEDTA 区 (410, 9日目) に近い値であることから、処理廃水のみでの添加では不十分だった鉄が同時添加によりスラグから補われることも明らかとなった。

一方で、両同時添加区の最大蛍光値は、実験2 (Fig. 2(a)) の NH<sub>4</sub>-Slag 20 区 (9日目, 500) および NH<sub>4</sub>-Slag 50 区 (10日目, 570) の最大蛍光値よりも小さく Control 区 (7日目, 470) にもおおよばなかった。このことから、スラグ由来鉄の有用性が低下しているとも考えることができる。しかしながら、同時添加区の増殖曲線は、Control 区やスラグ添加区 (Fig. 2(a)) よりもむしろ処理廃水添加区 (Fig. 3(a)) に似た形であり、最大蛍光値も実験3の Sewage-FeEDTA 区 (410, 9日目, Fig. 3(a)) に近いことから、スラグ由来鉄の有用性の低下ではなく実験3と同じように処理廃水を窒素源とした結果であると考えられた。

以上の結果から、スラグ由来の鉄と処理廃水由来の窒素および鉄の有用性は、同時添加時においても維持されており、さらに鉄については同時添加することにより相乗効果が得られるということが示された。

P 0 培地 (Fig. 4(b)) における Sewage-Slag 20 区および Sewage-Slag 50 区の蛍光値はともに 5 日目に 120 に達した。この値は実験3 (Fig. 3(b)) の Sewage-FeEDTA 区 (93, 5日目) を上回るものの、スラグ添加量による差はみられないことから、スラグ添加効果は少なかったと理解することができる。しかし、実験2 (Fig. 2(b)) においては、Slag 20 区 (6日目, 140) および Slag 50 区 (6日目, 220) という結果が得られており、スラグ添加量に伴いりんが供給されることは示されている。さらに、同時添加区の最大蛍光値はこれらのスラグ添加区よりも低い値であることから、スラグと処理廃水を同時添加することによりスラグ由来のりんの有用性が低下したものと判断できる。また、先の P Si 1.5 培地 (Fig. 4(a)) における同時添加区は P 0 培地に試薬によりりんを添加したことに相当する。その実験区においてはより良い増殖が示されたことから、同時添加により増殖が阻害されたわけではないことは明らかである。

以上の結果より、処理廃水のみでは不足していたりんが同時添加によりスラグから補われたと考えられる。しかし、

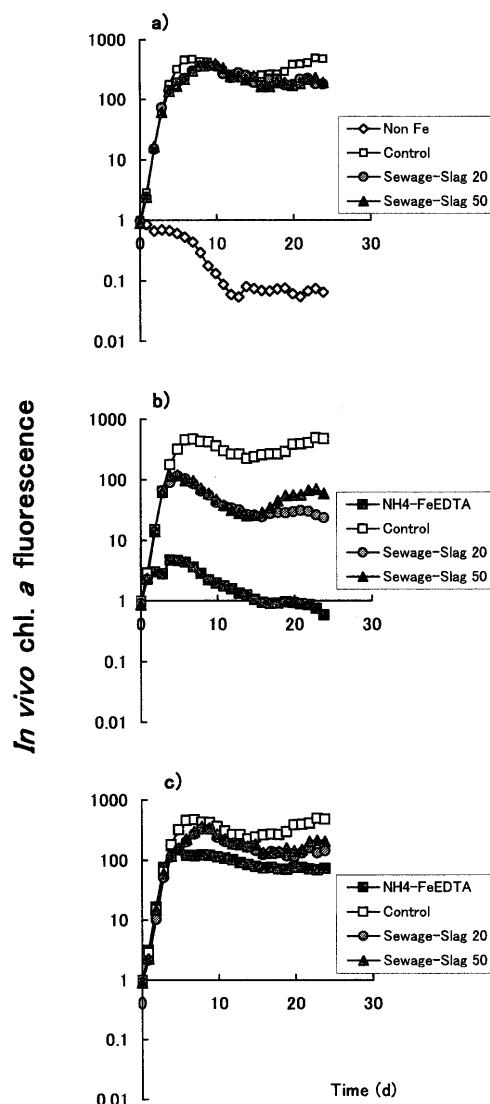


Fig. 4. Expt. 4: Variations of *in vivo* chlorophyll *a* fluorescence of *Thalassiosira guillardii* in modified ESAW media containing treated urban sewage at amount of 40% (v/v) with addition of two different amounts of decarburization steelmaking slag. (a) Modified P Si 1.5 medium with no ammonium; (b) modified P 0 medium with no ammonium; (c) modified Si 0 medium with no ammonium.

スラグと処理廃水を同時に添加した場合にはスラグ由来のりんの有用性が低下する可能性が示された。ただし、この有用性の低下がスラグからのりん溶出が阻害された結果なのか、もしくは溶出したりんが処理廃水中の成分により沈殿除去された結果なのかは明らかではない。また、植物プランクトンの存在によりさらに複雑な現象が起きている可能性もあるので、解明するためには材料工学分野と生物学分野の両面から検証する必要があると考えられる。

Si 0 培地 (Fig. 4(c)) における Sewage-Slag 20 区および Sewage-Slag 50 区の蛍光値は、ともに 8 日目に 330 および 360 に達した。この値は、Si 0 培地に試薬により珪素を添加したことに相当する P Si 1.5 培地 (Fig. 4(a)) における両同時添加区の最大蛍光値 360 および 390 (ともに 10 日目) と大差はなかった。また、それぞれの増殖曲線と最大蛍光

値は、実験3 (Fig. 3(c)) における Sewage-FeEDTA 区 (340, 8日目) に近いものである。さらに、実験2 (Fig. 2(c)) における Slag 20区 (230, 5日目) および Slag 50区 (300, 5日目) をそれぞれ上回っていた。以上のことから、同時添加区においてはスラグ由来の珪素よりもむしろ処理廃水中の珪素の影響が大きかったものと判断される。ただしこれらはコンタミした珪素をふまえた結果である。

以上実験4の結果をまとめると、スラグと処理廃水の同時添加時においてもスラグ由来鉄および処理廃水由来窒素の有効性は保たれていた。しかし、相乗効果を期待したりんについてはスラグ由来りんの有用性が低下する可能性が示された。また、珪素に関してはコンタミの影響を排除することができるかとする、珪素源としては処理廃水がより有効であると判断できた。ただし本研究では、処理廃水を培地の40%も添加するという特殊な条件を設定したため、実海域で行う併用が今回のような結果を招くことを示唆しているとは限らない。また、2004年度からは、従来のCOD(化学的酸素要求量)を基準にした閉鎖水域における水質保全対策を見直した窒素およびりんの総量規制が環境省により施行される。その結果、より高度な廃水処理が行われるようになり、処理廃水中に残存する元素の量や割合も変化すると考えられる。以上のことから、将来、本研究のスキームを実用化する際には、それぞれの条件にあわせた方法の検討がその都度必要になると考えられる。

#### 4. 結言

植物プランクトンの栄養源として脱炭スラグと処理済都市廃水を併用することを想定して、海洋浮游性珪藻 *Thalassiosira guillardii* を用いて両者に由来する鉄、りん、珪素および窒素がその増殖に有効であるか否かを調べた。さらに実際に併用することで、これら元素の有用性の変化についても確認した。本研究で得られた主な結果を以下に示す。

(1) *T. guillardii* の鉄要求量は、窒素源の違いにより明確な違いはみられなかったが、アンモニア態窒素存在下において低濃度の鉄をより効率よく利用して増殖する可能性が示された。

(2) 処理廃水を窒素源として利用することを前提としたアンモニア態窒素存在下においても、前報<sup>1)</sup>の硝酸態窒素存在下と同様、スラグ由来の鉄、りんおよび珪素は *T. guillardii* の増殖に有効であった。

(3) 処理廃水中の窒素(主にアンモニア態窒素)は *T. guillardii* の増殖に有効であり、同時に鉄、りんおよび珪素の供給源としても処理廃水は有効であることが明らかとなった。ただしりんが相対的に不足していた。

(4) スラグおよび処理廃水の同時添加時には、処理廃水のみの添加では不足する鉄がスラグから補われることが示された。一方で、スラグ由来りんの有用性が低下したことから、併用することで必ずしも不足する元素を互いに効率よく補うものではないということが明らかになった。

以上、本研究で得られた結果は、必須の微量元素である鉄だけではなく、窒素、りんおよび珪素といったマクロ栄養塩が不足もしくは涸渇した水環境においては、製鋼スラグと処理済都市廃水を適宜使用することで、これらの栄養塩を供給しうることを示している。つまり、現在は藻類着生ブロック<sup>7,8)</sup> および消波ブロック<sup>9)</sup> などの原料としての価値が実証試験されている製鋼スラグを、植物プランクトンといった微細な水中懸濁藻類の増殖促進にも利用しうる可能性があるということになる。それらが海底生態系に負荷を与えることなく水柱(water column)中の生態系に組み込まれるのであれば、人間活動の影響を大きく受けて窒素過多となっている沿岸海洋環境を修復し、生物生産を増大させながら健全な生態系を回復する手段になりうる。

さらに植物プランクトンを水処理に応用することも可能になると思われる。処理廃水中に高濃度のアンモニア態窒素が残存している理由は、下水処理場の多くが広範囲の下水を一括処理するための流域下水処理場であるため、家庭雑排水以外にも様々な成分を含んだ廃水を同時処理しなければならず、その生物処理能力つまり活性汚泥法に限界が生じてきているためである<sup>10)</sup>。そこで、空隙率の高いポーラス状担体に加工した製鋼スラグに廃水を通水して溶出成分とともにプールし、そこで植物プランクトンを増殖させて大量収穫することが有効だと考えられる。その後の水は負荷の少ない廃水としてそのまま沿岸環境へ放流することが可能になる。回収された植物プランクトンが様々な利用されうる可能性は、すでに多くの研究によって示唆されている<sup>11,12)</sup>。

しかしながら実際の利用にあたっては、スラグからの元素溶出に加えて、様々な生物群集に対する影響の慎重な長期現場モニタリングが必須となる。本研究の結果はその基礎を提供するものである。

#### 文 献

- 1) K.Arita, Y.Umiguuchi and A.Taniguchi: *Tetsu-to-Hagané*, **89** (2003), 415.
- 2) 和田洋六: 水のリサイクル(応用編), 地人書館, 東京, (1992), 15.
- 3) P.J.Harrison, R.E.Waters and F.J.R.Taylor: *J. Phycol.*, **16** (1980), 28.
- 4) K.Haraguchi and A.Taniguchi: *Tetsu-to-Hagané*, **89** (2003), 430.
- 5) S.S.Bates, J.Worms and J.C.Smith: *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, **50** (1993), 1248.
- 6) M.T.Maldonad and N.M.Price: *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **141** (1996), 161.
- 7) M.Fukuhara and T.Takahashi: *Materia Jpn.*, **39** (2000), 594.
- 8) NKK: <http://www.nkk.co.jp/steel/slag/>, (accessed 26 Feb., 2003).
- 9) 松永久宏, 高木正人, 小菊史男, 谷敷多穂, 櫻谷敏和: 社会鉄鋼工学会 2001年度春季シンポジウム論文集「鉄鋼スラグ利用拡大に関するシンポジウム」, 日本鉄鋼協会, 東京, (2001), 16.
- 10) 宇井 純: 日本のはよみがえるか, NHK出版, 東京, (1996), 317.
- 11) H.Sakamoto, H.Torada, K.Goto, Y.Nakamura, T.Nakano, T.Yamaguchi, M.Sato, T.Saito, A.Taniguchi, T.Yokoyama, N.Kan-no and E.Nagahisa: *Tetsu-to-Hagané*, **89** (2003), 475.
- 12) M.Hata: *Tetsu-to-Hagané*, **89** (2003), 472.