

海洋性発光細菌および動物プランクトンを用いた 製鋼スラグ溶出水のバイオアッセイ

三 木 理* 加 藤 敏 朗* 楠 井 隆 史**

Bioassay Test on Steelmaking Slag Leachate using *Vibrio fischeri* and *Tigriopus japonicus*

Osamu MIKI*, Toshiaki KATO* and Takashi KUSUI**

* Technical Development Bureau, Nippon Steel Corp., 20-1 Shintomi, Futtsu, Chiba 293-8511, Japan

** Toyama Prefectural University, 5180 Kurokawa, Imizu, Toyama 939-0398, Japan

Abstract

The use of steelmaking slag as a recycled material is being progressed in coastal waters for marine environment improvement, by exploiting the characteristics of steelmaking slag. However, regarding its use in coastal waters, there are as yet no criteria for determining which bioassay should be used for assessing its effect on marine organisms. As a method of voluntary quality control of steelmaking slag, we selected a suitable battery of bioassays. The acute toxicity of steelmaking slag leachate on a copepod (*Tigriopus japonicus*) and a luminescent bacterium (*Vibrio fischeri*) was evaluated. As a result of the bioassay tests on some types of steelmaking slag, the leachate from the steelmaking slag with the pH preadjustment carbonation process showed smaller pH increases and no inhibitory effect on the marine organisms evaluated. On the other hand, the leachate from the steelmaking slag without carbonation showed an inhibitory effect on both organisms, as shown by an increase in its pH up to 12. This inhibitory effect was observed only in *T. japonicus* even when the pH was reduced to 8. The inhibitory factors of such leachate on *T. japonicus* and luminescent *V. fischeri* were examined. No hazardous substances were detected in the leachate. However, the calcium and magnesium concentrations of the leachate markedly changed compared with those of seawater. When the calcium concentration of the leachate was adjusted to that of seawater, the inhibitory effect on *T. japonicus* almost disappeared. Therefore, calcium concentration changes brought about by pH changes were considered to be the main inhibitory factors in the leachate. When bioassays with marine organisms are used to evaluate a recycled material such as steelmaking slag, the calcium and magnesium concentrations of the leachate should be carefully considered.

Key words: steelmaking slag, *Vibrio fischeri*, *Tigriopus japonicus*, calcium, magnesium

1. はじめに

製鋼スラグは製鋼炉（転炉，電気炉）において，銑鉄やスクラップを用いて鋼を製造する際に発生するスラグの総称である。本論文で使用する製鋼スラグは，転炉系の製鋼スラグである（以下，製鋼スラグと述べる）。製鋼スラグは，安定した生産量と製品の品質や安全性を保持できるリサイクル製品であり，道路用路盤材などの陸上用途に広く用いられてきた。さらに，近年，製鋼スラグの成分特性（Ca, Fe, Si が主成分）に着目して，製鋼スラグを富栄養化した海域底質に活用し，リンの溶出防止材として用いたり，Fe 欠損の貧栄養海域に施肥材として供給するなど，海域環境改善のための有用資材としての適用検討もなされている¹⁻⁴⁾。著者らも，これまでに，製鋼スラグと炭酸ガスを接触させ，製鋼スラグ表面に炭酸カルシウムを生成させ，中性化を進めた製鋼スラグ（以下，炭酸化製鋼スラグと述べる）を用い，室内

実験によって，炭酸化製鋼スラグが汚濁の進んだ海域底質からのリンの溶出を長期にわたって防止できる可能性を示した^{5,6)}。

一方で，製鋼スラグのようなりサイクル製品を有用資材として海域に適用する場合には，溶出試験によって有害成分の溶出の有無を確認するばかりでなく，バイオアッセイ試験により海産生物への影響を事前に確認しておくことも考えられる。例えば，中村らは，浚渫土砂やスラグなどの再生材料を海域へ有効に利用する際には，化学的特性の把握に加え，バイオアッセイ試験を用いて事前に評価することを推奨している⁷⁾。また，浚渫土砂の海洋投棄処分時，化学物質が一定レベルの場合，複数のバイオアッセイ試験による評価を義務付け，化学分析と複数のバイオアッセイを組み合わせて評価するオランダの事例が紹介されている⁷⁾。カナダにおいても，廃棄物の海洋投棄において化学物質のスクリーニング基準を超過した場合，許可申請の一部に複数のバイオアッセイ

* 新日本製鐵技術開発本部 〒293-8511 千葉県富津市新富 20-1

** 富山県立大学 〒939-0398 富山県射水市黒河 5180

を用いることが提唱されている⁸⁾。しかし、スラグなどの再生材料を海洋で有効利用する際には、どのような海産生物を用いた試験方法の組み合わせで評価すべきかその課題については明確にはなっていない。

著者らは製鋼スラグを海域適用する際のバイオアッセイ手法として、製鋼スラグ溶出水に対し、海洋性発光細菌試験、藻類生長阻害試験、ワムシ急性毒性試験、動物プランクトン試験、ウニ卵受精試験、二枚貝急性毒性試験、多毛類急性毒性試験を選択し、適切な評価手法の組み合わせを検討してきた。この結果、検討した7種類のバイオアッセイのうち、感受性、結果の安定性、操作性、試料必要量などを考慮すると、製鋼スラグ溶出水に対しては、海洋性発光細菌試験、藻類生長阻害試験、動物プランクトン試験、ウニ卵受精試験の4種類が優れていると判断した⁹⁾。ただし、藻類生長阻害試験は、藻類種による計測手法の影響、また、ウニ卵受精試験では人工海水が阻害効果を示す可能性があることも認められた。ここでは、とくに、簡易毒性スクリーニング手法として世界的に用いられている海洋性発光細菌 (*Vibrio fischeri*) および(財)海洋生物環境研究所で室内飼育技術が確立され水産庁が手法を検討した海産種の動物プランクトン (*Tigriopus japonicus*) の2種類について、製鋼スラグ溶出水を対象としてバイオアッセイを実施した結果とバイオアッセイ手法で溶出水を評価する際の課題について検討した結果を報告する。

2. 方法

2.1 供試海水

実験にはキレート剤が含まれず、比較的組成が簡易で各種の海産生物のバイオアッセイで実績のある Lyman & Fleming の人工海水¹⁰⁾を用いた。Table 1 にその性状を示す。

2.2 供試試料

溶出試験方法はスラグ類の化学物質試験方法 (JISK0058-1)、土壤汚染調査のための溶出試験方法 (環境庁告示第46号) に準拠した。粒径2 mm 以下の3種類のスラグ (炭酸化製鋼スラグ、2種類の製鋼スラグ) および砂を用い、上記溶出方法の溶媒を純水から人工海水に変えた6時間の溶出操作によって、4種類の溶出水 (以下、溶出水 A~D と表示) を得た。また、各溶出水 (A~D) の総水銀、カドミウム、鉛、六価クロム、ヒ素、シアン、亜鉛、銅、セレン、ボロンを測定し、いずれも「水底土砂に係る判定基準」や「土壤環境基準」以下であることを確認した。さらに、各溶出水 (A~D) の pH を 7.5~8.0 に希塩酸を用いて調整した溶出水を4種類 (以下、溶出水 E~H と表示) 作成した。また、各溶出水 (A~

H) の pH, Ca, Mg, 電気伝導度 (EC) を測定した。以上の計8種類の溶出水 (A~H) と対照系として人工海水系(I)を設定し、バイオアッセイ試験に使用した。

2.3 バイオアッセイ試験方法

2.3.1 発光細菌試験方法^{11~14)}

海洋性発光細菌 (*Vibrio fischeri*) を用いた試験方法について説明する。供試生物としては市販の海洋性発光細菌の凍結乾燥菌体 (SDI 社製) を用いた。また、乾燥菌体から発光細菌液 (以下、発光細菌液) の調整は SDI 社の再生液やマニュアルに準じて実施した。続いて、100% 溶出水および人工海水で希釈した系列 (0.32~33%) を 96 穴マルチプレートに 100 μ L ずつ分注した。さらに、前記発光細菌液を 10 μ L 注入した後、ATTO 社製ルミネセンサー (モデル JNR II) を用いて、1 分間隔で 30 分間発光量を測定した。測光時間は 0.1 秒とした。1 濃度区について n=4 で測定し、平均値を測定値とした。相対発光度 (%) を、各溶出水の 30 分後発光量と人工海水の 30 分後発光量の相対値から算出した。なお、発光細菌に有意な影響が認められた場合は、100% 溶出水を人工海水で所定の割合に希釈した系列の相対発光度 (%) から Probit 法で EC₅₀ (半数影響濃度) を算出した¹⁵⁾。

2.3.2 動物プランクトン試験方法¹⁶⁾

動物プランクトンとして海洋性ミジンコ (*Tigriopus japonicus*, 以下、チオグリプス) を用いた試験方法について説明する。チオグリプスの親を Table 1 に示す Lyman & Fleming の人工海水で飼育し、卵嚢を有する雌から孵化後 24 時間未満のノープリウス幼生を得た。各 100% 溶出水 (A~H) を 20 mL ガラスシャーレに 10 mL ずつ入れ、チオグリプス幼生を 5 尾収容した。1 濃度区に対して 4 連、計 20 尾として評価した。また、対照区として、人工海水系(I)を設けた。試験は 1 濃度区あたり 3 反復 (n=3) で実施した。恒温室内にガラスシャーレを収容し、24 時間、明暗周期 (16 L/8 D) のもとで放置した。24 時間後に実体顕微鏡下で各ガラスシャーレ内の遊泳活動が阻害されている個体数を測定した。対照区において、チオグリプスの遊泳阻害率が 10% を超えた試験はデータとして採用しなかった。さらに有意な影響が認められた場合は、100% 溶出水を人工海水で所定の割合に希釈し、Probit 法または Binominal 法で EC₅₀ (半数影響濃度) を算出した¹⁵⁾。

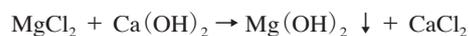
2.4 分析方法

各溶出水の Ca イオン、Mg イオンは、30% 硝酸を添加した後、ICP 発光分析装置 (島津製作所, ICPE-9000) を用い測定した。

3. 結果および考察

3.1 溶出水の硬度成分の濃度変化

各 8 種類の溶出水 (A~H) と対照系の人工海水(I)の溶出水の pH, Ca, Mg, 電気伝導度 (EC) を測定した結果を Table 2 に示す。製鋼スラグから溶出する Ca(OH)₂ が過剰にあると、人工海水中の MgCl₂ と以下の反応が進行する。



このため、製鋼スラグ溶出水 (B, C, F, G) では人工海水と比較し、pH, Ca 濃度, Mg 濃度, EC が大きく

Table 1 Composition of artificial seawater

Items	Content
NaCl	23.477 g·L ⁻¹
MgCl ₂	4.981 g·L ⁻¹
Na ₂ SO ₄	3.912 g·L ⁻¹
CaCl ₂	1.120 g·L ⁻¹
KCl	0.66 g·L ⁻¹
pH	8.0~8.1

変動した。一方、炭酸化製鋼スラグ溶出水 (A, E) の場合は、 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ の溶解量が小さく、pH, Ca 濃度, Mg 濃度, EC は砂溶出水 (D, H) や人工海水(I)と大きな差は生じなかった。

3.2 発光細菌試験による溶出水評価

Fig. 1, Fig. 2 に 100% 溶出水 (A~H) を人工海水で希釈した系列の相対発光度 (%) を示す。I は対照系の人工海水である。

炭酸化製鋼スラグ系溶出水 (A, E), 砂系溶出水 (D, H) および人工海水(I)は、いずれも 100% 溶出水で発光阻害は認められなかった。

一方、高 pH の製鋼スラグ系溶出水 (B, C) は、発光阻害が明白に認められ、溶出水 (B, C) の EC₅₀ は、それぞれ 2.4±0.7%, 2.5±0.8% と推定された。しかし、製鋼スラグ系溶出水 (B, C) の pH を 7.7~7.8 に調整した溶出水 (F, G) では、発光阻害は完全に消失した。このことから、発光阻害の要因は pH であることが強く推定された。

また、試験時の各溶出水の pH は、発光細菌液を各溶出水に添加することにより低下するため、発光細菌液を各溶出水に所定の割合で添加した後の pH を測定し、この pH と相対発光度 (%) の関係を求めた。この結果を Fig. 3 に示す。100% 製鋼スラグ系溶出水 (B, C) は、発光細菌液を加えても pH が 12 から 11 程度に低下する程度であり、またその希釈系列も大半が 8 を超過していたため、発光阻害が生じたと考えられる。市販されている代表的な発光細菌試験法である Microtox による評価法でも至適 pH は 6~8 とされており、また、発光強度が pH が 8 以上で急速に低下する Svenson and Zhang¹⁷⁾ の

結果ともほぼ一致した。以上の結果から、製鋼スラグ系溶出水 (B, C) の発光細菌への阻害要因は pH であり、炭酸化製鋼スラグのように pH 上昇を抑制すれば発光阻害は消失するものと考えられる。

3.3 発光細菌試験への硬度成分の影響

発光阻害が認められないスラグ溶出水の発光度が人工海水よりも高くなる傾向が見られた。この要因として Table 2 に示すように溶出水中の硬度成分である Ca 濃度, Mg 濃度の変化が影響していることが推定された。このため、発光細菌試験への硬度成分の影響を明確化するため、Lyman & Fleming の人工海水の Ca 濃度を 0~4,000 mg·L⁻¹, Mg 濃度を 0~2,600 mg·L⁻¹ に変化させた人工海水を作り、発光度との関係を調査した。

Fig. 4 に各人工海水の総硬度 (Ca 濃度と Mg 濃度を CaCO_3 濃度に換算) と相対発光度の関係を示す。また、Fig. 5 には Ca 濃度が海水並のもとでの Mg 濃度と相対発光度の関係を示す。さらに、Fig. 6 には Mg 濃度が海水並のもとでの Ca 濃度と相対発光度の関係を示す。この結果、総硬度、あるいは、Mg 濃度と相対発光度には必ずしも明確な正の相関は得られなかった。一方、Ca 濃度と相対発光度は明らかに正の相関が得られた。例えば、Ca 濃度が通常の海水の 1/20 程度の低濃度 (20 mg·L⁻¹) では相対発光度は 30% 程度低下した。一方、Ca 濃度が通常の海水の 2 倍程度 (800 mg·L⁻¹) では、相対発光度は 30% 以上上昇した。したがって、スラグ溶出水の発光度が人工海水を上回った要因として Ca 濃度が

Table 2 Hardness, EC and pH of leachate (A~H) and artificial seawater (I)

Leachate	pH (-)	Ca (mg·L ⁻¹)	Mg (mg·L ⁻¹)	EC (S·m ⁻¹)
A	9.3	484	1160	5.0
B	12.5	3070	<0.5	5.6
C	12.5	3240	<0.5	5.5
D	8.2	344	1300	5.0
E	7.5	501	1160	4.9
F	7.8	3120	<0.5	5.2
G	7.7	3220	<0.5	5.3
H	8.0	397	1310	5.0
I	8.1	400	1330	5.1

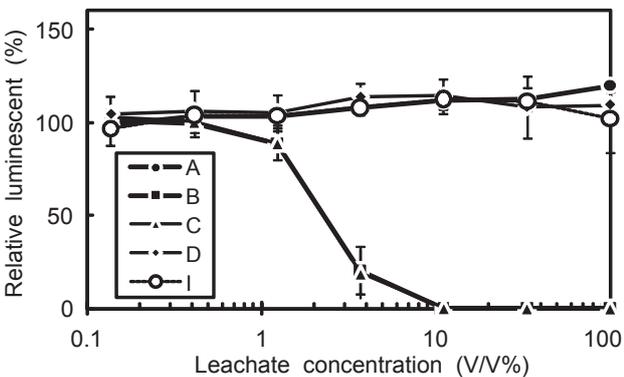


Fig. 1 Comparison of relative luminescent curves for *Vibrio fischeri* by leachate (A~D) and artificial sea water (I) (Mean±S.D., n=4)

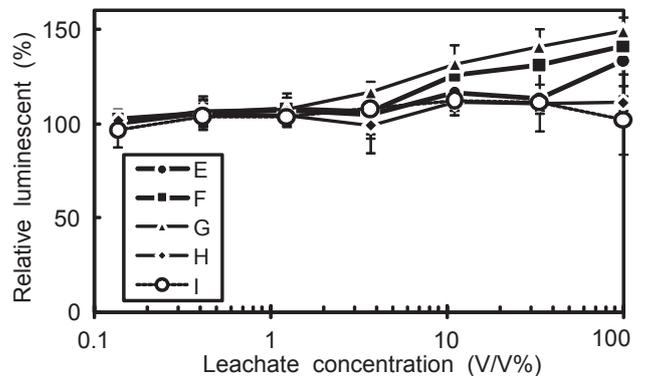


Fig. 2 Comparison of relative luminescent curves for *Vibrio fischeri* by leachate (E~H) and artificial sea water (I) (Mean±S.D., n=4)

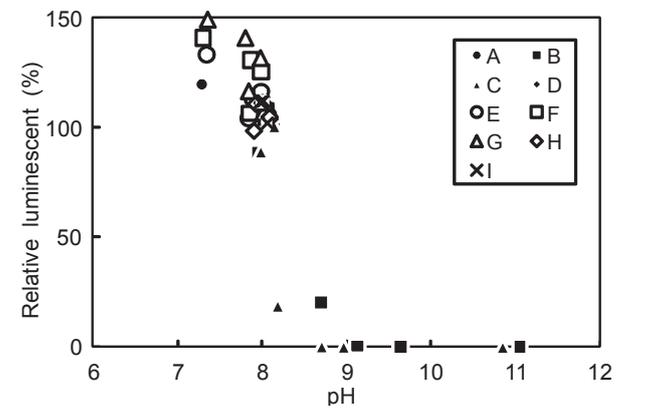


Fig. 3 Relationship between relative luminescent for *Vibrio fischeri* and pH of each leachate after the bacterial solution addition

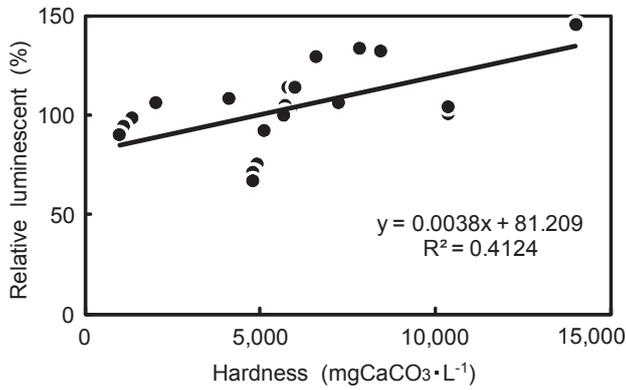


Fig. 4 Effect of total hardness on relative luminescent for *Vibrio fischeri* (Mean±S.D., n=4)

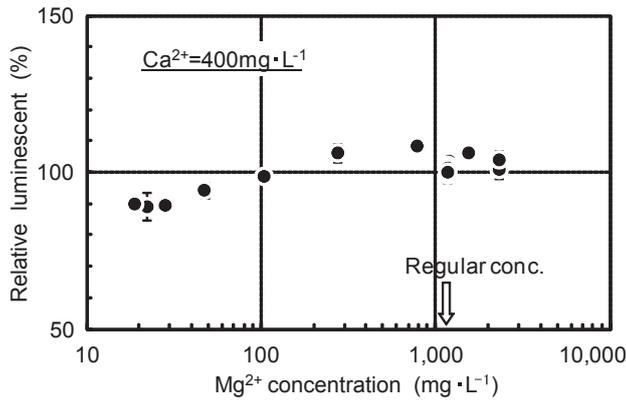


Fig. 5 Effect of hardness(Mg) on relative luminescent for *Vibrio fischeri* (Mean±S.D., n=4)

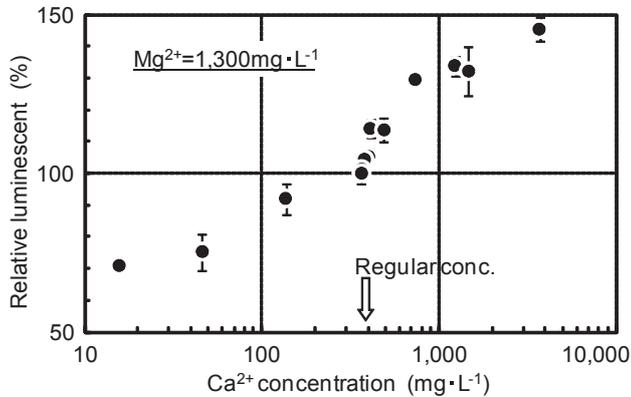


Fig. 6 Effect of hardness(Ca) on relative luminescent for *Vibrio fischeri* (Mean±S.D., n=4)

増加したことによるものと考えられる。また、ISOでは希釈水として2% NaClが使用されているが¹²⁾、このような2% NaCl液を用いた溶出水を希釈すると、溶出水のCa濃度が低下し、海水を希釈水として用いた場合と比較して発光量が低下してしまう可能性がある。このように発光細菌を用いて溶出水の評価をする際には、Ca濃度によって発光細菌の発光度が強く影響を受けるため、サンプル希釈液の選択を含め、溶出水のCa濃度の変化に十分に留意しておく必要がある。

3.4 動物プランクトン試験による溶出水評価

チオグリプスを用いた溶出水の評価結果をTable 3に示す。

炭酸化製鋼スラグ系溶出水 (A, E), 砂系溶出水 (D, H) および人工海水 (I) は、いずれも100%溶出水でチ

Table 3 Average immobilization ratio for *Tigriopus japonicus* by each leachate (n=3)

Leachate	Concentration			
	100V/V%	33V/V%	11V/V%	3.7V/V%
A	0%	0%	0%	0%
B	100%	100%	100%	100%
C	100%	100%	100%	100%
D	0%	-	-	-
E	0%	-	-	-
F	100%	40%	1.7%	0%
G	100%	40%	3.3%	0%
H	0%	-	-	-
I	0%	-	-	-

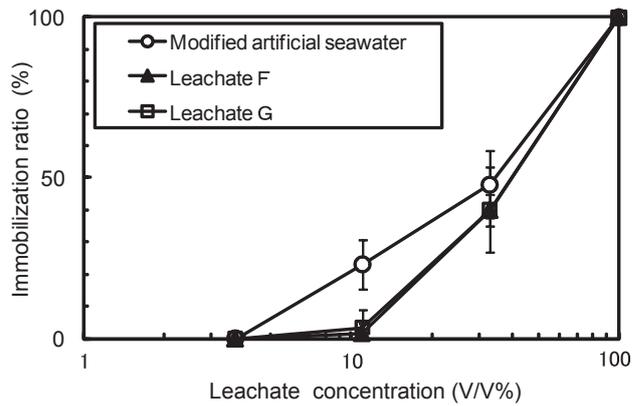


Fig. 7 Comparison of immobilization ratio for *Tigriopus japonicus* by leachate(E,F) and modified artificial seawater (Mean±S.D., n=3)

Table 4 24hr- EC₅₀ for *Tigriopus japonicus* by leachate(F,G) and modified artificial seawater

Leachate	RUN1	RUN2	RUN3
F	38%	40%	32 (24~43)%
G	44%	33%	30 (23~41)%
Modified Artificial Seawater	21 (15~30)%	29 (21~40)%	25 (19~34)%

():95% confidential limit

オグリプスの遊泳阻害は認められなかった。

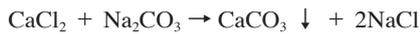
一方、高pHの製鋼スラグ系溶出水 (B, C) は、チオグリプスに遊泳阻害が認められた。なお、溶出水 (B, C) のEC₅₀は、最低試験濃度区 (3.7V/V%) においても100%阻害であったため、算出していない。さらに、発光細菌の場合とは異なり、製鋼スラグ系溶出水 (B, C) のpHを7.7~7.8に調整した製鋼スラグ系溶出水 (F, G) でも、チオグリプスに遊泳阻害が残存した。人工海水による希釈により、遊泳阻害は低下したものの、これらの結果から、チオグリプスの遊泳阻害の要因は、高pHばかりでなく、pH以外にも阻害要因があることが推定された。

3.5 動物プランクトン試験への硬度成分の影響

前述したようにpH調整した製鋼スラグ溶出水 (F, G) にもチオグリプスの遊泳阻害が残存した。この要因として、Table 2に示すように溶出水中の硬度成分であるCa濃度、Mg濃度の変化が影響していることが推定された。金子も淡水性のミジンコ試験において、廃棄物の毒性評価を行う場合、毒性成分ではない塩類が試験結果に

影響を及ぼすことを指摘している¹⁸⁾。このため、まず、Lyman & Fleming の人工海水の Ca 濃度を 3,750 mg・L⁻¹、Mg 濃度を 0 mg・L⁻¹、pH=7.7 に変化させた人工海水を作成し、この人工海水とチオグリプスの遊泳阻害との関係を調査した。硬度調整した人工海水の硬度成分の濃度は製鋼スラグ溶出水 (F, G) とほぼ一致している。試験結果を Fig. 7 に示す。硬度調整した 100%人工海水は、製鋼スラグ溶出水 (F, G) と同様にチオグリプスへの遊泳阻害が明白に認められた。また、硬度調整した人工海水を通常の人工海水で希釈していくと、製鋼スラグ溶出水 (F, G) と同様に遊泳阻害が改善された。また、Table 4 に 24 hr-EC₅₀ の比較を示す。24 hr-EC₅₀ を比較しても、硬度調整した 100%人工海水は、製鋼スラグ溶出水 (F, G) と類似の結果となった。これらの結果から、チオグリプスの遊泳阻害の要因は、硬度成分の変化であることが強く推定された。

次に、Table 5 に示すように、阻害が生じた製鋼スラグ溶出水(F)に炭酸ナトリウムを所定量添加し、Ca イオンを CaCO₃ として除去し、Ca 濃度を変化させた溶出水を作成し、チオグリプスの遊泳阻害が改善されるかを検討した。また、各溶出水には MgCl₂ を添加し、Mg 濃度を海水並の濃度とした。



このようにして、Ca と Mg の濃度を調整した 100%溶出水 (F-②~F-⑤) と人工海水(I)を用いて、チオグリプスの遊泳阻害との関係を調査した。この結果を Fig. 8 に示す。製鋼スラグ溶出水(F)から Ca 濃度を減少させると、海水で希釈をしなくても、チオグリプスの遊泳阻害は段階的に低下し、Ca 濃度と遊泳阻害率には正の相

Table 5 Hardness, EC and pH of leachate (F~F-⑤) and artificial seawater(I)

Leachate	pH (-)	Ca ²⁺ (mg・L ⁻¹)	Mg ²⁺ (mg・L ⁻¹)	EC (S・m ⁻¹)
F	7.8	3120	<0.5	5.2
F-②	7.5	2510	1120	5.9
F-③	7.7	1860	1160	6.6
F-④	7.7	940	1160	6.2
F-⑤	7.8	492	1180	6.0
I	8.1	400	1330	5.1

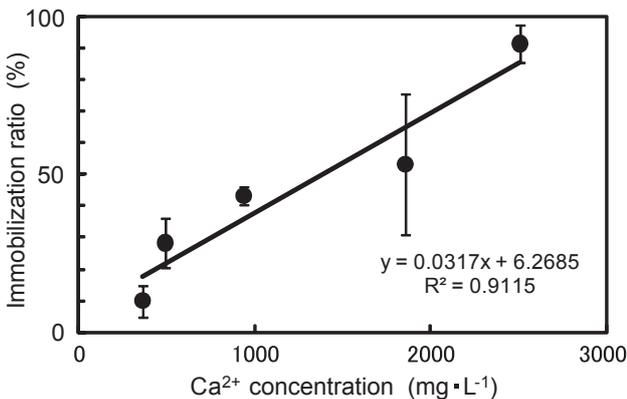


Fig. 8 Effect of hardness(Ca) on immobilization ratio for *Tigriopus japonicus* (Mean±S.D., n=3)

関があることが確認された。一方で、Fig. 9 に示すように総イオンの指標である電気伝導度と遊泳阻害率には明確な関係が得られなかった。

したがって、pH 調整をした製鋼スラグ溶出水 (F, G) にもチオグリプスの遊泳阻害が残存した要因は、硬度成分の中の Ca 濃度が増加したことによるものと考えられた。また、逆に、希釈水として海水を用いず、NaCl 液などを用いて溶出水を希釈すると、溶出水の Ca 濃度が海水並の場合には Ca 濃度が必要以上に低下してしまう可能性もある。今回、Ca 濃度が 400 mg・L⁻¹ を下回る場合の検討は行っていないが、低濃度となってもチオグリプスに遊泳阻害が生ずることも考えられる。

いずれにせよ、チオグリプスは Ca 濃度の変化の影響を強く受けることが明らかになった。このため、希釈液の選択を含め、溶出水の Ca 濃度の変化に十分に留意しておく必要がある。

4. まとめ

製鋼スラグを海域適用する際のバイオアッセイ手法として、海洋性発光細菌 (*Vibrio fischeri*) および海産種の動物プランクトン (*Tigriopus japonicus*) を選択し、製鋼スラグ溶出水のバイオアッセイを実施し、海産生物への影響の有無やバイオアッセイ手法で評価する際の課題について検討し、以下の知見を得た。

1) スラグ溶出水のバイオアッセイ試験の結果、3種類の製鋼スラグ溶出水のうち、炭酸化処理をした製鋼スラグの溶出水は、pH 上昇が小さく、発光細菌、動物プランクトンともに阻害は認められなかった。

2) pH が 12 程度まで上昇した製鋼スラグ溶出水は、高 pH による阻害が発光細菌に認められた。さらに、上記の溶出水の pH を 8 に下げたところ、阻害は消失し、発光度が人工海水よりも高くなった。この要因を検討したところ、海水中の硬度成分である Ca 濃度の増加が発光細菌の発光度の上昇に影響したことが明らかになった。

3) pH が 12 程度まで上昇した製鋼スラグ溶出水は、高 pH による阻害が動物プランクトンに認められた。さらに、pH を下げても遊泳阻害が残存し、pH 以外の要因があることが推定された。この要因を検討したところ、海水中の硬度成分である Ca 濃度の増加が動物プランクトンの遊泳阻害に影響を及ぼしており、Ca 濃度を低下

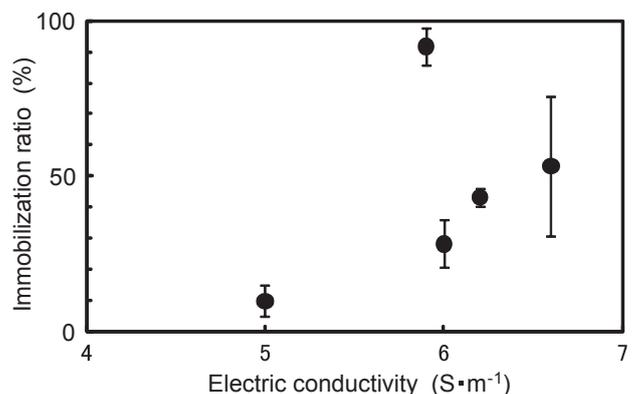


Fig. 9 Effect of electric conductivity on immobilization ratio for *Tigriopus japonicus* (Mean±S.D., n=3)

させると、阻害は低減した。

4) 溶出水中の有害成分による影響の有無を海産生物によるバイオアッセイ試験で評価する場合には、溶出水の pH ばかりでなく、pH 変化に伴う硬度成分、とくに、海水中の Ca 濃度の変化に十分留意して評価する必要がある。

(原稿受付 2010 年 3 月 31 日)

(原稿受理 2010 年 5 月 29 日)

参 考 文 献

- 1) 港湾・空港等整備におけるリサイクル技術指針 (2004) 港湾・空港等リサイクル推進協議会, **2**, 60-88.
- 2) 伊藤一明, 西嶋渉, 正藤英司, 岡田光正 (1996) 鉄鋼スラグ散布による沿岸海域でのリン除去の基礎的研究—室内実験と長期現場実験—, 水環境学会誌, **19** (6), 501-507.
- 3) 伊藤一明, 西嶋渉, 正藤英司, 岡田光正 (1997) 鉄鋼スラグ散布による沿岸海域底質からの硫化物の溶出抑制とアンモニア性窒素の溶出の検討, 水環境学会誌, **20** (10), 670-673.
- 4) 加藤敏朗, 相本道宏, 三木理, 中川雅夫 (2008) 製鋼スラグ等の海域施肥試験における海域 Fe 濃度分布に関する検討—転炉系製鋼スラグ等を用いた藻場造成技術開発 (2), 第 20 回海洋工学シンポジウム.
- 5) 堤直人, 田中誠 (2005) 製鋼スラグ中可溶性石灰の炭酸化速度に及ぼす相対湿度や温度等の影響, CAMP-ISIJ, **18**, 1117.
- 6) 三木理, 加藤敏朗, 堤直人 (2009) 炭酸化製鋼スラグを活用した海域底質からのリンの溶出防止, 水環境学会誌, **32** (1), 33-39.

- 7) 中村由行 (2006) 底質汚染評価のためのバイオアッセイ, 水環境学会誌, **29** (8), 14-19.
- 8) 独立行政法人土木研究所水循環研究グループ (2004) 環境毒理学における単一種試験の適用と解釈に関する指針文書, 土木研究所資料第 3921 号.
- 9) Kusui, T., Kato, T. and Miki, O. (2009) Suitable battery of bioassays for assessing the use of steel-making slag in coastal waters, Proceedings of 14th International symposium on toxicity assessment, 148.
- 10) Lyman, J. and Fleming, R.H. (1940) Composition of Seawater, *Journal of Marine Research*, **III** (2), 134-146.
- 11) 楠井隆史 (2003) 1.2 簡易試験法, 「生態影響試験法ハンドブック」(日本環境毒理学学会編著), pp.12-22, 朝倉書店, 東京.
- 12) ISO (1998) Water quality-Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (Luminescent bacteria test), ISO11348-1,2,3:1988 (E).
- 13) Microbics (1992) Microtox Manual, Microbics Corporation.
- 14) 荒川豊, 坂口慶 (2006) 発光バクテリアを用いた有害物質のスクリーニング手法, 工業用水, **578** (11), 15-20.
- 15) Peltier, W. H. and Weber, C. I. (1985) Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents to Freshwater and Marine Organisms Appendix E, Toxdat Multi-Method Program, USEPA 600/4-85/013.
- 16) 水産庁 (2000) 魚介類水質環境基準検討調査総合報告書 (海産生物毒性試験指針).
- 17) Svenson, A. and Zhang, L. (1995) Acute aquatic toxicity of protolyzing substances studied as the Microtox effect, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **30**, 283-288.
- 18) 金子英廣 (1996) 溶出試験による廃棄物の毒性評価—バイオアッセイの適用を考える—, 廃棄物学会誌, **7** (5), 394-402.