

創価大学  
プランクトン工学研究

Soka University

Bulletin of Plankton Eco-Engineering Research



## 第1号（2021年6月）目次

### ◆「プランクトン工学研究」発刊にあたり

古谷研 ..... 1

### ◆総説

光合成能を有するプランクトンを利用した次世代省エネルギー型  
廃水処理技術の研究動向

秋月真一・ヘルマン クエバス - ロドリゲス ..... 2

### ◆原著論文

Preparation and characterization of poly(vinyl alcohol)/sodium  
alginate/TEMPO-oxidized cellulose nanofiber hydrogel for dye removal  
Wing Shan Chan, Yuichi Shibata, Kento Nishi, Tatsushi Matsuyama,  
Junichi Ida ..... 14

抱卵型カイアシ類 *Oithona oculata* のバイオリアクターを用いた試験的培養  
高山佳樹・山本翼・戸田龍樹 ..... 22

Magnesium-modified biochars for nitrate adsorption and removal  
in continuous flow system

Joo Yun Qi, Shinjiro Sato ..... 32

間欠的な曝気攪拌が海産珪藻 *Chaetoceros gracilis* の生産性に与える影響  
大竹正弘・家後幸一・平原南萌・ファティマ ユソフ・戸田龍樹 ..... 48

メタン発酵消化液を用いた微細藻類培養とバイオガス精製同時プロセス  
岸正敏・尾内秀美・田中健児・吉田あかり・戸田龍樹 ..... 58

---

# 「プランクトン工学研究」編集委員

秋月真一（プランクトン工学研究所）

岸 正敏（プランクトン工学研究所）

桑原ビクター伸一（教育学部）

佐々木諭（看護学部）

伴 修平（滋賀県立大学）

古谷 研（大学院理工学研究科・プランクトン工学研究所）編集委員長

---

## 「プランクトン工学研究」投稿規定

創価大学プランクトン工学研究所紀要「プランクトン工学研究」は原著論文、総説、短報、研究情報、その他編集委員会が認めた原稿を掲載する。このうち原著論文、総説、短報は他の学術誌に印刷されたことがなく、また印刷予定のないものとし、責任ある研究活動の成果について研究倫理を遵守してとりまとめられたものでなければならない（参考「科学の健全な発展のために—誠実な科学者の心得—」日本学術振興会 (2015)、<https://www.jsps.go.jp/j-kousei/data/rinri.pdf>）。すでに印刷された図表ならびに本文 200 語以上の引用にあたっては著者の責任において著作権所有者の許諾を得るものとする。原稿は図表を含め編集委員長宛（古谷 研 [furuya@soka.ac.jp](mailto:furuya@soka.ac.jp)）に送付すること。掲載されたすべての報文の著作権は創価大学プランクトン工学研究所が所有する。

原稿（以降テキスト部分を原稿と呼ぶ）の用語は和文とするが英文も受け付ける。和文論文では、要旨と図表の説明文には必ず英語を用いる。その他の原稿の図表の説明文はこの限りではない。A4 判で作成し、行間を 1.5 行とし、全ページにページ番号と行番号を付する。本文のフォントは明朝体系フォント 12 ポイントを、英文、学名、数値、単位、数式等については欧文用セリフ系フォント 12 ポイントを用いる。全角の英文フォントは用いない。

原稿第 1 ページ目には、表題、著者氏名、所属、住所を和英両文で書き、柱用の表題略語を和文 35 文字以下で指定する。また、責任著者の電子メールアドレスを書く。連名の著者が異なる所属である場合は、著者順に所属に連番を付して著者名の右肩に所属番号を付して区別する。

第 2 ページ目には要旨を書く。要旨には必ず英語を用い、報文全体の概要がやや詳しく示されるように 500 語程度にする。要旨の下に 5 つ以内のキーワード（英語）をアルファベット順に併記する。

本文はページを改めて書き始める。原著論文では緒言（序言、はじめに等）材料と方法、結果、考察、謝辞、引用文献、図の説明の順とし、総説では必要に応じて章立てを行い、短報では緒言から謝辞までをわけずに書く。

学名は斜体とし、その表記は藻類においては最新の国際藻類・菌類・植物命名規約、動物においては最新の国際動物命名規約に従う。属名は緒言、材料と方法、結果、考察のそれぞれの初出、および文頭では略さず表記する。

単位は原則として SI 単位（第 9 版）を用いる。慣例により非 SI 単位を用いることがある。単位は次のように表記することとする： $m^2$ 、 $m^3$ 、 $L$ 、 $L^{-1}$ 、 $mL$ 、 $mL^{-1}$ 、 $ind$ 、 $L^{-1}$ 、 $inds$ 、 $m^2$ 、 $mM$ 、 $\mu M$ 、 $nM$ 、 $cm\ s^{-1}$ 、 $cm\ min^{-1}$ 、 $km\ h^{-1}$ 、 $\mu g\ C\ m^{-2}\ d^{-1}$ 、 $g\ C\ m^{-2}\ y^{-1}$ 、 $\mu mol\ (photons)\ s^{-1}\ m^{-2}$  など。単位と数値の間、演算記号の前後、単位の積における単位同士の間は半角スペース空ける。

表は一つずつページを改め、上欄にそれぞれの説明文（英文に限る）を付した後、番号順に引用文献の次におく。確率等の説明は説明文に入れる。例外的な事項の説明には、表中に肩記号を付して脚注に補足説明を置くことができる。図の説明文（英文に限る）は、本文を参照することなくそれ自体で一応の意味がわかるように書き、表の次にページを改めて一括して列挙する。図や写真は A4 版で受付ける。図中の説明は英文で作成する。図中の数字、記号、説明等のフォントは欧文用サンセリフ系フォントを用い、主要な文字や記号のサイズは 18 ポイント、最小でも 12 ポイント以上とすることを推奨する。

本文中の文献引用は、著者が複数で 2 名のときは佐藤・斉藤 (1980) または (Sato & Saito 1980)、3 名以上のときは（佐藤ほか 1980）または Sato et al. (1980) のようにする。カッコ内の著者名と出版年の間は半角スペースで区切る。複数の論文を引用するときは、（佐藤ほか 1980、山田ほか 2010）のように半角カンマと半角スペースで区切り、出版年、筆頭著者の姓のアルファベット順とする。投稿中の論文は引用できないが、（私信）または (personal comm.) か、（未発表）または (unpubl.) とすることができる。卒業論文、修士論文、学会講演要旨集は引用不可とする。

引用文献リストの書き方は別項を参照すること。その他の不明の事項については本紀要の最新号に掲載の報文を参考にするか、編集委員に問い合わせること。

表紙写真：相模湾に生息する内湾性カイアシ類 *Acartia steuerei*  
(撮影者：高山佳樹)

## 引用文献の書き方

引用文献表はページを改め、本文の次に入れる。文献の配列は著者名(姓)のアルファベット順と出版年順に従う。文献表の書き方は、( ), . : などの記号や書体に注意を払い、次の例にならう。引用文献表中では et al., Ditto, Ibid. などの語は使用しない。著者名や年号が不明なインターネット上の情報は本文中でその URL と参照年月日を記述する。

1. 筆頭著者が同じ場合、単著、共著の順とする。
2. 著者が 11 名を超える文献は、順に 10 名までを記述し、11 名以降は「～ほか」または「et al.」と表記する。
3. アルファベットの著者名は、Family name を先に、given name や middle name のイニシャルを後に記述する。(例：Smith KL Jr, van der Wal EJ, Marshall J-A)
4. 姓か名が漢字 1 文字の場合は、姓と名の間を全角 1 字あける(例：吉水 翔, 岸 正敏)。
5. 和文雑誌名は原則として省略しない。欧文雑誌名は CAS Source Index (CASSI) (<https://cassi.cas.org/search.jsp>) に登録された略称をピリオドを省いて記載する。CASSI に出ていないタイトルの略語については ISSN International Centre の List of Title Word Abbreviation (LTWA) (<http://www.issn.org/services/online-services/access-to-the-ltwa/>) に準拠する。例外的に Nature 誌は Nature, Science 誌は Science と表記する。
6. 英語以外の外国語で書かれた文献は末尾に (in Chinese) のようにし、英文要旨がある場合は、(in Greek with English abstract) のように記載する。

### [ 例 ]

#### 論文

- 中尾賢志 (2019) 閉鎖性水域における栄養塩類管理を目的とした下水高度処理の運転管理。用水と廃水 61: 655–661.
- Cervantes-Avilés P, Keller AA (2021) Incidence of metal-based nanoparticles in the conventional wastewater treatment process. Water Res 189: 116603. (論文番号のみの場合)
- Wangpraseurt D, You S, Azam F, Jacucci G, Gaidarenko O, Hildebrand M, Kühl M., Smith AG et al. (2020) Bionic 3D printed corals. Nat Commun 11: 1748. (著者が 8 人以上の場合)
- Bakraoui M, Karouach F, Ouhammou B, Aggour M, Essamri A, El Bari H (2020). Biogas production from recycled paper mill wastewater by UASB digester: Optimal and mesophilic conditions. Biotechnol Reports 25: e00402, doi.org/10.1016/j.btre.2019.e00402 (電子版のみの場合)

#### 単行本

- 小久保清治 (1932) 浮游生物分類学。恒星社厚生閣、東京、394 pp, 34 pls.
- 高原義昌 (編著) (1980) 廃水の生物処理。地球社、東京、384 pp.
- Speece RE (1996) Anaerobic Biotechnology for Industrial Wastewaters. Archae Press, Tennessee, 393 pp.
- Pimental DR (ed) (2002) Biological Invasions: Economic and Environmental Costs of Alien Plant, Animal, and Microbe Species. CRC Press, Boca Raton, 369 pp.

#### 単行本の章

- 田中剛・嶋田礼迪 (2020) “海洋微細藻による燃料・化成品生産技術。” 脱石油に向けた CO2 資源化技術—化学・生物プロセスを中心に— (湯川英明編)。シーエムシー出版、東京、pp. 293–309.

#### 学位論文

- 阿部憲一 (2012) 生物膜型廃水処理における亜硝酸化の制御。長岡技術大学大学院工学研究科学学位論文。
- Katayama T (2015) Photoprotective acclimation of xanthophyll pigments to high light in marine diatoms. PhD thesis, Soka University, Japan.

#### 報告書

- 水産庁九州漁業調整事務所 (1993) 平成 4 年九州海域の赤潮。水産庁、67 pp.
- United Nations World Water Assessment Programme (WWAP) (2017) The United Nations World Water Development Report 2017. Wastewater: The Untapped Resource. UNESCO, Paris, 180 pp.

#### インターネット上の公開データベース等の引用

- WoRMS Editorial Board (2019) World Register of Marine Species. <http://www.marinespecies.org> (2019 年 6 月 10 日アクセス)

2021 年 6 月 28 日発行



発行所 創価大学プランクトン工学研究所  
〒192-8577 東京都八王子市丹木町 1-236  
E-mail: plankton-eco-eng@soka.ac.jp  
URL: <https://www.soka.ac.jp/perc>

印刷所 (株)プリンテック  
〒193-0835 東京都八王子市千人町 2-8-20  
Tel: 042-629-9231

# Bulletin of Plankton Eco-Engineering Research

**No. 1**

June 2021

## Contents

Preface Ken Furuya .....	1
<b>Review</b>	
Next-generation energy-saving wastewater treatment technologies based on photosynthetic capacity of phytoplankton Shinichi Akizuki and Germán Cuevas-Rodríguez .....	2
<b>Original papers</b>	
Preparation and characterization of poly(vinyl alcohol)/sodium alginate/TEMPO-oxidized cellulose nanofiber hydrogel for dye removal Wing Shan Chan, Yuichi Shibata, Kento Nishi, Tatsushi Matsuyama and Junichi Ida .....	14
Experimental cultivation of the egg-carrying copepod <i>Oithona oculata</i> in a pilot bioreactor Yoshiki Takayama, Tsubasa Yamamoto and Tatsuki Toda .....	22
Magnesium-modified biochars for nitrate adsorption and removal in continuous flow system Joo Yun Qi and Shinjiro Sato .....	32
Effect of intermittent agitation on the productivity of the marine diatom <i>Chaetoceros gracilis</i> Masahiro Ohtake, Kouichi Yago, Minamo Hirahara, Fatimah Md. Yusoff and Tatsuki Toda .....	48
Simultaneous microalgal culture and biogas upgrading using anaerobic digestion effluent Masatoshi Kishi, Hidemi Onouchi, Kenji Tanaka, Akari Yoshida and Tatsuki Toda .....	58

## 「プランクトン工学研究」発刊にあたり

限られた資源を効率よく使い、循環的な利用を図ることは持続可能な社会をつくるための第一歩です。自然界では様々な物質が多様な生物の間を循環して安定な生態系が形作られており、絶えず物質は循環してそこには廃棄物はありません。一方、人間社会では不要物は経済的価値が無いものとして廃棄され、自然の浄化作用に委ねるがままにされてきました。このため、人間活動が巨大化して自然の浄化力が追いつかなくなり環境を大きく圧迫する今日では、自然が浄化できない人工物の問題も重なり、循環技術の開発が様々な分野で急務となっています。

プランクトン工学はプランクトンがもつ様々な機能を適切に組み合わせて廃棄物から有価物を生産したり環境問題を解決するための技術開発とそれに関連した基礎研究を行う新しい学問分野です。創価大学では、プランクトン工学を推進するために学内共同利用施設としてプランクトン工学研究開発センターを2018年5月に立ち上げました。その後、センターの機能をさらに充実させるためにセンターを発展的に改組して、2020年9月にプランクトン工学研究所を設立しました。研究所の発足に伴い、その成果を公表する場として紀要「プランクトン工学研究」を刊行することになりました。当研究所の成果を原著論文、短報あるいは総説として刊行いたします。一般学術誌での公表、図書の刊行とともに本研究所の活動の成果をご覧いただければ幸いです。プランクトン工学は多くの要素技術が関連しますので、直接プランクトンを扱わない論文も掲載の対象になります。また、プランクトン工学に含まれるのは生物系、理工系分野だけではなく、生物の機能を社会実装に結びつけるためには、社会のニーズを把握し、生産システムを社会制度に適合させることが不可欠であり、また、経済的合理性がなければ持続性は担保されません。このため、人文・社会科学分野も掲載対象となります。

こうした多様な分野がプランクトンという生物群をキーにして循環型社会の構築に向けて協働いたします。これからの社会のあり方に関わるビジョンの形成に本誌が貢献することを願っています。皆様のご理解とご支援をお願いする次第です。

「プランクトン工学研究」編集委員長  
古谷 研

## 総説

# 光合成能を有するプランクトンを利用した 次世代省エネルギー型廃水処理技術の研究動向

秋月真一<sup>1)\*</sup>, ヘルマン クエバス - ロドリゲス<sup>2)</sup>

1) 創価大学プランクトン工学研究所 〒192-8577 東京都八王子市丹木町 1-236

2) グアナファト大学工学部 36000 メキシコ合衆国グアナファト州グアナファト市フアレス通り 77

## Next-generation energy-saving wastewater treatment technologies based on photosynthetic capacity of phytoplankton

Shinichi Akizuki<sup>1)\*</sup>, Germán Cuevas-Rodríguez<sup>2)</sup>

1) *Institute of Plankton Eco-engineering, Soka University, 1-236, Tangi-cho, Hachioji, Tokyo, 192-8577, Japan*

2) *Division of Engineering, University of Guanajuato, Av. Juárez 77, CP 36000, Guanajuato, GTO, México*

\* *Corresponding author: s-akizuki@soka.gr.jp*

2021年4月17日受付, 2021年4月30日受理

**Abstract** Over the last century, wastewater treatment technologies have evolved greatly along with demographic expansion and in accordance with the development of legislation. Plankton, defined as organisms that drift in aquatic environments, play an important role in wastewater treatment systems. For example, diverse types of bacterio-plankton have the ability to stabilize pollutants in wastewaters. Wastewater treatment technologies have been developed mainly in advanced economies such as in Europe and North America to address environmental pollution in aquatic ecosystems near human populations. Conventional wastewater treatment is primarily based on the activated sludge process and its modifications, which require high energy consumption for aeration and high cost for sludge disposal. These processes are not appropriate in emerging economies where the budget allocated for environmental protection is limited.

Recently, wastewater treatment based on phototrophic plankton, including microalgae and cyanobacteria (purple phototrophic bacteria), have attracted increasing attention because they can utilize natural sunlight as an energy source, and carbon and nutrients, *e.g.* ammonium and phosphate, as their biomass increases. In addition, many types of phototrophic plankton can produce useful metabolic products such as protein, carbohydrate, polyhydroxyalkanoate and carotenoids from wastewater.

In this paper, we focus on the current status and prospects of phototrophic plankton-based wastewater treatment technologies. We focus first on the history of the development of wastewater treatment technologies during the last century and several key technologies including activated sludge, trickling filter, denitrification-nitrification, anaerobic digestion and upflow anaerobic

sludge blanket processes (Section 1). Thereafter, the contents are organized as follows: current status and bottlenecks of conventional plankton-based wastewater treatment technologies (Section 2), research trends of wastewater treatment technologies based on microalgal-bacterial consortium (Section 3), case study one (1) treatment of anaerobic digestion effluent by microalgal-nitrifying bacterial consortium (Section 4), research trends of wastewater treatment technologies based on purple phototrophic bacteria (Section 5), case study two (2) treatment of slaughterhouse wastewater by purple phototrophic bacteria (Section 6), and towards implementation in sunbelt regions (Section 7). The case study sections (Sections 4 and 6) include our recent published and unpublished works to facilitate better understanding of the current status and the effectiveness of phototrophic plankton-based wastewater treatment technologies.

**Keywords:** biological wastewater treatment; microalgal-bacterial consortium; purple phototrophic bacteria; sunbelt region; high-strength wastewaters

## 1. はじめに

水の流れに逆って、自らの位置を保てない生物を総じてプランクトンと呼ぶ。プランクトンには、クラゲのように比較的大きな生物から、ウイルスのようにナノメートルスケールの極めて小さな生物まで対象として含まれるが、概ね顕微鏡的な大きさである。プランクトンの中には、適切な環境下で管理することで、水中に含まれる汚濁物質を効果的に除去できる種が多く存在し、人類は古くからその恩恵を受けてきている。例えば、1900年代初頭にイギリス・マンチェスター州 Davyhulme 下水道研究所の Arden & Lockett (1914) により提案された活性汚泥法では、*Zoogloea* 属、*Bucillus* 属、*Pseudomonas* 属等の好気性のバクテリオプランクトンを利用して廃水中の有機汚濁物質を除去している。これは、槽底部から散気管を通じて空気を供給する曝気槽内に好気性バクテリアを高濃度で生育させ、そこに廃水を供給して、廃水中の有機物と一部の無機栄養塩類を除去する手法である。活性汚泥法は、現在に至るまで、都市下水処理を担う主要な技術の一つとして世界各地で利用され続けている。他にも、プランクトンを用いた廃水処理法には以下の手法が例として挙げられる

(Lofrano & Brown 2010) :

- 散水ろ床法：廃水をろ過材に散布し、ろ過材表面に形成された微生物膜との接触反応により、有機性汚濁物質を除去する手法 (1890 年頃～)。
- 硝化—脱窒素法：廃水中のアンモニア成分を、硝化関連バクテリアにより好気環境下で窒素酸化物に酸化する硝化反応と、窒素酸化物を脱窒素関連バクテリアにより無酸素環境下で窒素ガスまで還元する脱窒素反応の組み合わせにより除去する手法 (1950 年頃～)。
- 嫌気性消化法 (メタン発酵)：嫌気性環境下で働く加水分解菌、酸生成菌、メタン生成菌等のバクテリアおよび古細菌 (以下、アーキア) の連続代謝により、高濃度有機性汚濁物質を、メタンを含むバイオガスに転換可能な手法 (1900 年頃～導入開始、初期は Travis Tank, Imhoff Tank の呼称が有名)。
- 上向流嫌気性汚泥床 (Upflow anaerobic sludge blankt: UASB) 法：メタン発酵に関与する嫌気性バクテリアおよびアーキアの持つ自己凝集機能を利用して沈降性の優れた数 mm 程度の顆粒状凝集態 (グラニュール) を形成し、槽内にバイオマスを高濃度で保持することで、高有機物負荷での処理を可能とする手法 (1970 年頃～)



人間の活動と廃水の発生は分かち難い関係で、適切な廃水処理は、周辺環境の水質汚染と富栄養化を防ぐために不可欠である。プランクトンは、我々人類が安全で豊かな生活を維持するための重要な役割を担っている。

近年、従来のバクテリアに代わり、微細藻類や紅色光合成バクテリア等の光合成能を有するプランクトンを利用した廃水処理が注目を集め、国内外を問わず活発な研究活動が行われている (Muñoz & Guieysse 2006, Hülsen et al. 2014, Capson-Tojo et al. 2020)。プランクトンの光合成能を利用した廃水処理に関する研究は、その起源を辿ると 1960 年前後にまで遡る。当時も一部の研究者の間で関心が集められていたが、後述するように従来の廃水処理法の常識からくる誤解や失敗も多く (嶋田・高市 2020)、廃水処理のメインストリームにはならなかった。現代は、人類社会の急激な拡大により、地球上の資源の有限性が世界の共通認識となりつつある。その中で、光合成能を利用した廃水処理は、太陽光という無限に近いエネルギーを利用できるため、数十年の時を経て再び関心が高まってきた。本論文では、“光合成能を有するプランクトンを利用した省エネルギー型廃水処理”に焦点を当て、その研究動向について著者らの研究成果を交えて紹介し、合わせて今後の展望を報告する。

## 2. プランクトンを利用した廃水処理の現状と課題

先述の活性汚泥法を皮切りとして、20 世紀はバクテリアやアーキアの機能を利用した廃水処理法の開発と普及が進められてきた。これまでに、異なるバクテリアとアーキアの汚濁物質除去能を明らかにするために、温度、pH、溶存酸素濃度、酸化還元電位等の環境要因と処理性能の関係、流入有機物負荷速度の許容範囲とショック応答、反応槽構造の最適化等に関する基礎的な知見が集積され、都市下水から産業廃水に至るまでの多様な廃水の処理効果が実証された。しかし、既存の廃水処理技術は、経済的基盤が安

定し、環境保全対策に費用を投じられる先進国を中心に普及したものであり、環境保全よりも経済成長が喫緊の課題となっている開発途上国にそのまま導入することが難しい。そのため、多くの開発途上国では、未だ廃水処理施設の普及率が乏しいのが現状である。例えば、Liao et al. (2021) は、2010 年の国民一人当たりの平均 GDP と廃水処理普及率の間に強い正の相関が見られることを示し、日本、シンガポール、米国等の 45000 US ドルを超える高 GDP 国では 70% 以上の普及率である一方で、ベトナム、フィリピン等の低 GDP 国の普及率は 15% にも満たないと報告している。2030 年に向けて国連で定めた SDGs (Sustainable Development Goals: 持続可能な開発目標) では、“未処理の廃水の割合半減 (目標 6.3)” が掲げられている。開発途上国でも効果的かつ持続的に利用可能な廃水処理技術は、今後益々重要性が増すと考えられる。

従来の廃水処理法の多くは、好気的な環境下で働くバクテリアを利用する手法であり、浄化機能を最大限活用するためには機械的な曝気が必要であった。この曝気動力は非常に膨大で、廃水処理施設全体のエネルギー消費量の 45 ~ 75% を占めるとも報告されている (Rosso et al. 2008)。さらに、処理過程で生成したバイオマス (余剰汚泥) が有機性廃棄物となり、別途処分が必要になることも課題である。嫌気性環境下で働くバクテリアとアーキアを利用するメタン発酵では、曝気動力が不必要であり、汚泥生成量が少なく、加えてメタンを高濃度に含むバイオガスが回収できる利点がある。しかし、栄養塩類 (窒素、リン等) の除去が行われず二次処理が必要であることや、都市下水等の低濃度有機性汚濁物質の処理では効果的な処理が見込まないこと等のネガティブな特徴を持ち、従来の好気性処理の代替とはならない。そのため、従来の廃水処理法とは異なる視点からのアプローチが必要である。

### 3. 微細藻類—バクテリア共存系による 廃水処理技術の研究動向

カリフォルニア大学バークレー校の Oswald の研究グループは、1957年に発表した論文“Photosynthesis in sewage treatment”の中で、微細藻類と好気性バクテリアの共存系による下水処理法を提案した (Oswald & Gotaas 1957)。共存系による処理システム内では、廃水中の有機物を好気性バクテリアにより分解し、二酸化炭素 ( $\text{CO}_2$ )、無機栄養塩 ( $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ ) と水へと変換され、これらは全て微細藻類の光合成で利用できる。微細藻類—バクテリア共存系による廃水処理に関する網羅的な文献調査に基づき Muñoz & Guieysse (2006) は、有機物量の指標である生物化学的酸素要求量 (BOD) と、栄養塩類の除去に加え、廃水中の多様な重金属類 (Zn, Cr, Cd, Co, Al 等) の吸着または吸収や、病原菌の除去能について整理されている。異なる研究者により、これまで湖沼・河川等の身近な水圏環境に生息する微細藻類の多くが廃水処理に利用できることが明らかとなっている。代表的な属に限っても、*Chlorella* 属、*Scenedesmus* 属、*Dunaliella* 属、*Neochloris* 属、*Chlamydomonas* 属、*Nitzschia* 属、*Cosmarium* 属、*Oedogonium* 属等の有用性が示されている (Muñoz & Guieysse 2006, Mehrabadi et al. 2015, Gonçalves et al. 2017, Udaiyappan et al. 2017)。特に *Chlorella* 属は幅広い pH・温度環境で生育可能で、溶存態有機物への耐性も高いことから、廃水処理に頻繁に用いられている。

微細藻類—バクテリア共存系による廃水処理の実用化に向けた試みは、一部の廃水を対象とし進められつつある。例えばスペインでは Aqualia 社を中心とした All-Gas Project が立ち上げられ、HRAP (High rate algal pond) と呼ばれる共存系培養槽を用いたデモプラント施設により、現在日量  $2000 \text{ m}^3$  の規模での都市下水処理が行われている (All-Gas Project 2019)。デモプラントは、地中海性気候で比較的温暖なスペイン南部のカディスに建設され、年間を通じて安定した処理が

行われている。さらに、培養槽から排出される余剰バイオマスはメタン発酵によって嫌氣的に分解・バイオガス化し、濃縮したメタンは車両を動かすバイオ燃料として有効利用されている。

2010年以降、Karya et al. (2013) を始めとして、微細藻類—バクテリア共存系による高濃度アンモニア含有廃水処理に関する研究が数多く報告されている (Vargas et al. 2016, Kwon et al. 2019, Sepehri et al. 2020)。アンモニアは、食品製造業に加えて、電子部品製造業、化学薬品・医薬品製造業、メタン発酵施設等の多様な産業施設で発生する廃水に高濃度に含まれ、富栄養化を引き起こす主要な要素であるため、特に適正処理が求められるものの一つである。現状では硝化—脱窒素法による処理が主流であるが、硝化反応に膨大な曝気動力を要し、脱窒素反応にはメタノール等の有機炭素剤の添加が必要となるため、持続的に利用可能な手法ではない (Fig. 1a)。微細藻類—バクテリア共存系において、バクテリア源として硝化関連菌を豊富に含む播種源を利用することで、微細藻類と硝化反応を担う硝化菌との共存系が形成できる。播種源としては、硝化—脱窒素法の好気性汚泥に加え、廃水処理工程の中に硝化反応を組み込んでいる嫌気無酸素好気 (Anaerobic-Anoxic-Oxic:  $\text{A}_2\text{O}$ ) 法 (Mishima et al. 1996) やオキシデーションディッチ (OD) 法 (Rittmann & Langeland 1985) の好気性汚泥等が挙げられる。この微細藻類—硝化関連バクテリア共存系においては、機械的な曝気の代わりに、微細藻類の光合成による酸素供給により硝化反応が進行し、曝気動力が大幅に削減できる。また、光合成に伴う微細藻類による部分的な栄養塩除去が進み、脱窒素反応時の窒素負荷を軽減できることから、有機炭素剤の削減も期待できる (Fig. 1b)。

ここで、従来の微細藻類—バクテリア共存系と微細藻類—硝化関連バクテリア共存系におけるアンモニア耐性の違いについて述べたい。従来の共存系では、従属栄養性バクテリアが主要なバクテリア構成員を占めることが多く、廃水中の有機物の無機化と炭素分の除去が得意とされていた。一方で、有機物濃度が低く、無

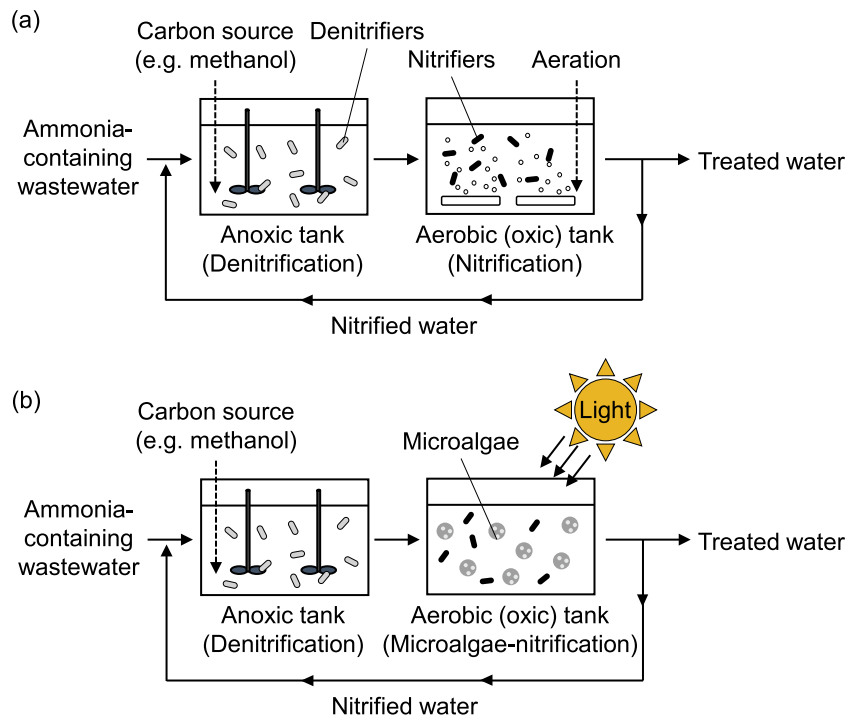


Fig. 1. Conventional nitrification-denitrification processes (a) and consortium of microalgae and nitrifying bacteria (b) for ammonia-containing wastewater treatment.

機化されたアンモニアが高濃度に含有される廃水を対象とした場合、しばしば処理が破綻することが報告されている (Collos & Harrison 2014, Gutierrez et al. 2016, Xia & Murphy 2016)。これは、Anthonisen et al. (1976) による以下の式 (1) で表される遊離アンモニア ( $\text{NH}_3$ ) 濃度が一定レベルに達すると、葉緑体における光リン酸化反応の脱共役阻害が生じ (Crofts 1966)、微細藻類の活性が低下するためである。

$$\text{NH}_3\text{-N} = \frac{\text{NH}_4^+\text{-N} \times 10^{\text{pH}}}{\exp\left(\frac{6344}{273+\text{Temp}}\right) + 10^{\text{pH}}} \quad (1)$$

光合成が進むと、重炭酸イオン ( $\text{HCO}_3^-$ ) の減少に伴い pH が上昇し、 $\text{NH}_3$  濃度が増加することで、結果として微細藻類の活性が低下し共存系の崩壊に繋がる。従属栄養性バクテリアの代わりに硝化関連バクテリアを利用することで、アンモニウムイオンが硝化反応を経て硝酸 ( $\text{NO}_3^-$ ) に酸化される。さらに硝化反応ではプロトンが生成するため pH が減少する。そのため、微

細藻類—硝化関連バクテリア共存系では、例え廃水中のアンモニア濃度が高い場合でも、共存系内で  $\text{NH}_3$  濃度が増加せず、安定した廃水処理が見込める。

#### 4. ケーススタディー (1) : 微細藻類—硝化関連バクテリア共存系によるメタン発酵消化液処理

メタン発酵は、下水処理過程で発生する余剰汚泥、家畜糞尿、生ごみ、醸造廃水等の多様な高濃度有機性廃棄物と廃水からバイオガスを回収できる技術として成熟し、既に先進国・開発途上国を問わず、各地で導入が進められている (Pike Research 2012, Lora Grando et al. 2017)。しかし、発酵槽から排出される消化液中には、栄養塩類 (特にアンモニア) が高濃度に残存するため、別途、硝化—脱窒素法による後段処理を施す必要がある。著者らはこれまで、消化液を対象とした微細藻類—硝化関連バクテリア共存系の有用性評価に関する研究を進めてきた (Akizuki et al.

2019, Akizuki et al. 2020a, Akizuki et al. 2021)。既存の微細藻類—硝化関連バクテリア共存系の研究では、温度・pH・光照射強度といった環境要因を制御した実験室内での研究例が大部分を占めている (Karya et al. 2013, Vargas et al. 2016, Rada-Ariza et al. 2017)。しかし、実際の廃水処理は屋外環境下で行うことが想定され、これらの環境要因は季節と時間帯によって大きく変動する。本手法の確立には、屋外環境下で共存系がどのように機能するのかについて知見の集積が必要である。そのため、著者らは屋外環境下における共存系の消化液処理性能を評価し、課題点の抽出と改善策の検討を行った。ここでは、これまでに得られた主要な研究成果について紹介する。

2016年と2017年の夏に、メキシコ・グアナフアト大学工学部の研究施設において、微細藻類—硝化関連バクテリア共存系によるメタン発酵消化液処理実験を実施した。消化液には、事前に孔径  $0.45 \mu\text{m}$  のフィルターでろ過後、純水で希釈したものを用いた。実験の播種試料として混合藻類 (*Chlorella* sp., *Scenedesmus* sp. および珪藻) とオキシデーションディッチ法の好気性汚泥を用い、 $0.5 \text{ L}$  のガラス製三角フラスコを用いた回分処理を実施した。温度  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  と光照射強度  $140 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  に制御した実験室内と屋外環境下での処理性能を比較した。その結果、実験室内では7割を超える高いアンモニア除去率が得られ、 $\text{NO}_3^-$  の生成が確認された。一方屋外環境下ではアンモニアが高濃度で残存し、 $\text{NO}_3^-$  の生成もほとんど見られなかった (Akizuki et al. 2019)。これは、硝化関連バクテリアが光照射に脆弱であり、太陽光照射下で活性が著しく低下したことが主要な原因と考えられる。例えば、Merbt et al. (2012) は、硝化関連バクテリアである *Nitrosomonas europaea* と *Nitrospira multififormis* の活性が、 $500 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  の光照射強度下でほとんど100% 阻害を受けたことを報告している。メキシコのように太陽光が豊富に降り注ぐ地域では、日中の光照射強度は高く、夏場では  $2000 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  を越える (Fig. 2)。そのため、屋外環境下で安定し

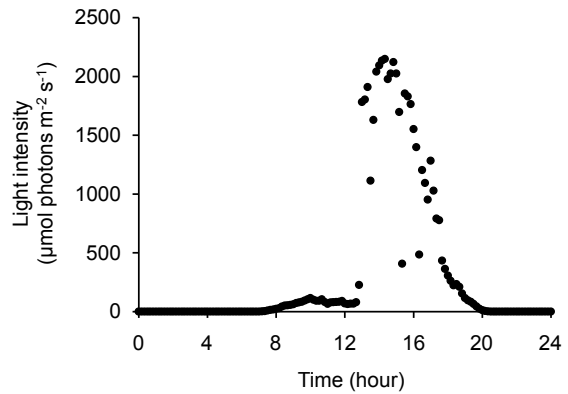


Fig. 2. Diurnal variation in light intensity (photosynthetically active radiation:PAR) at laboratory of Division of Engineering, University of Guanajuato (August, 2017).

て硝化反応を進行させるためには、硝化菌への光阻害を軽減できる何らかの手法を検討する必要がある。

著者らは、硝化関連バクテリアへの光阻害を緩和させるために、微生物固定化担体が利用できるのではないかと考えた (秋月ほか 2020)。微生物固定化担体は、一般的に水に近い比重の材質で空隙構造を取り、微生物がその表面・内部に高密度で付着することで高い廃水処理能力を示す。例えば人間であれば、日差しが強い場合は、カーテンを閉めたり、木陰に隠れたり、家の中にいることで直射日光を避けることができる。バクテリアの場合は、担体が言わばこのような木陰・住処のような役割を持つと期待した (Fig. 3)。そこで、直径  $10 \text{ mm}$  程度のポリウレタン製スポンジを担体として用い、 $0$  から  $1600 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  の異なる光照射強度条件下で、回分実験による硝化活性評価を行った。

その結果、通常分散状硝化関連バクテリアを用いた系列では光照射強度の増加と共に硝化活性が著しく低下した一方で、担体を利用した系列では、 $1600 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  の条件でも暗所と同程度の活性を維持した。

次に、微細藻類と硝化関連バクテリアを固定化した担体を有効容積  $35 \text{ L}$  (深さ  $10 \text{ cm}$ ) のパドル攪拌型培養槽に投入し、メタン発酵消化液の連続処理を実験室内と屋外環境下で実施した (Akizuki et al. 2021)。

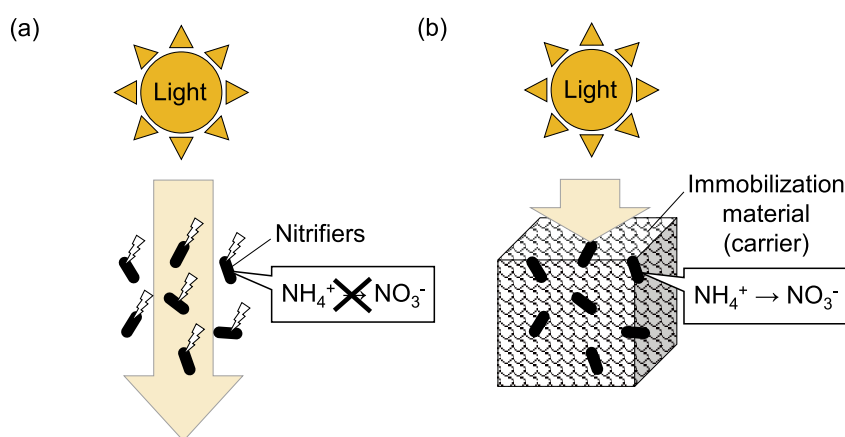


Fig. 3. Light stress on nitrification process (a) and mitigation of light stress by immobilization materials (b).

メタン発酵消化液には、脱水後の上澄みを純水で希釈したものを用いた。実験室内での入射光照射強度を  $1000 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$  とし、明暗周期 12 時間、温度  $25 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$  で運転を行った。水理的滞留時間 (HRT) を 5 日とし、担体を投入した系列と、通常の分散状硝化関連バクテリアを投入した系列での処理性能を比較した。その結果、担体投入系列では安定した硝化が見られ、最終的に投入窒素の約 4 割が  $\text{NO}_3^-$  へと変換された。一方で、分散状系列では、硝化反応の中間体生成物である亜硝酸 ( $\text{NO}_2^-$ ) が高濃度に蓄積した。硝化反応は、 $\text{NH}_4^+$  を  $\text{NO}_2^-$  まで酸化するアンモニア酸化細菌 (Ammonia oxidizing bacteria: AOB) と  $\text{NO}_2^-$  を  $\text{NO}_3^-$  まで酸化する亜硝酸酸化細菌 (Nitrite oxidizing bacteria: NOB) の連続代謝によって進む。NOB は AOB と比較して光照射による阻害を強く受けることが知られており (Diab & Shilo 1988)、分散状系列では NOB に対する光阻害が顕著に表れたと考えられる。結果として、担体投入系列では分散状系列と比較して約 10 倍の高い硝化活性を示し、担体による光阻害の緩和効果が確認された。

担体投入により培養槽内の光照射強度がどの程度減衰するかを明らかにするために、ランベルト・ベールの法則を元に、担体投入系列と分散状系列における槽深度毎の光照射強度を算出する以下の式を設定した。

$$I_x = I_0 \exp \left\{ - \left( N_{\text{carrier}} \times \alpha_{\text{carrier}} + C_{\text{algae}} \times \alpha_{\text{algae}} + C_{\text{nitrifiers}} \times \alpha_{\text{nitrifiers}} \right) \times \text{depth} \right\} \quad (2)$$

$$I_x = I_0 \exp \left\{ - \left( C_{\text{algae}} \times \alpha_{\text{algae}} + C_{\text{nitrifiers}} \times \alpha_{\text{nitrifiers}} \right) \times \text{depth} \right\} \quad (3)$$

ここで、 $I_x$  は培養槽の各深度における光強度 (単位:  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )、 $I_0$  は入射光強度、 $N_{\text{carrier}}$  は培養槽の単位容積 ( $\text{cm}^3$ ) あたりの理論的担体存在量、 $C_{\text{algae}}$  と  $C_{\text{nitrifiers}}$  はそれぞれ培養槽内の微細藻類と硝化バクテリア濃度、 $\alpha_{\text{carrier}}$ 、 $\alpha_{\text{algae}}$  および  $\alpha_{\text{nitrifiers}}$  はそれぞれ担体、微細藻類および硝化バクテリアの光減衰係数、depth は培養槽深度を示す。両系列の槽深度毎の光照射強度を算出した結果、分散状系列では槽底部でも  $985 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$  の光照射強度となり、入射光強度がほとんど減衰せずに底まで到達していた。一方で、担体投入系列では、槽底部の光照射強度は  $64 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$  であり、担体が光を遮る役目を果たしていたことが明らかとなった (Fig. 4)。このような光阻害の緩和効果は、担体だけに限らず、硝化関連バクテリアのグラニュール化 (Akizuki et al. 2020b) や、ブラックカーボンを添加した遮光ゲルによる固定化 (Nishi et al. 2020) によっても得られることが明らかとなっている。

次に、屋外実験を 2019 年の夏場 (7 月 ~ 9 月) に創

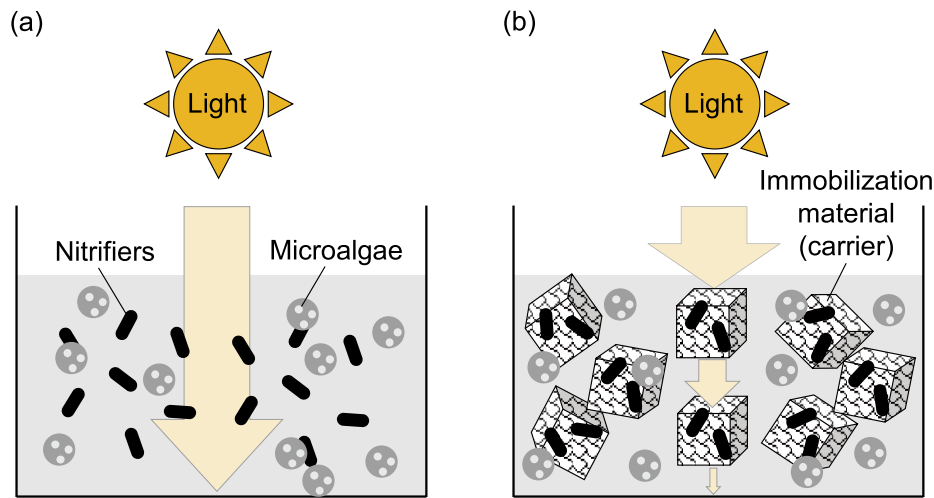


Fig. 4. Penetration of incident light in microalgae-dispersed nitrifiers reactor (a) and microalgae-immobilized nitrifiers reactor (b).

銚子大学工学部棟の一角で実施した。屋内実験と同型の培養槽に担体を投入し、メタン発酵消化液の連続処理を実施した。光照射強度が  $1500 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$  を越える快晴日が続いたが、実験期間後半には安定した  $\text{NO}_3^-$  の蓄積が見られ、屋外環境下でも安定した硝化の進行が確認された (Akizuki et al. 2020a)。一方で、屋外環境下で半年～1年以上の長期的に運転した際のプロセス安定性や、温度・光照射強度等の環境要因の変動と処理性能の関係性に関する知見は少なく、今後はこれらについての研究に取り組む必要がある。

## 5. 紅色光合成細菌を利用した廃水処理の研究動向

紅色光合成細菌は光合成細菌に含まれ、嫌気または好気的環境下において、特に赤外光波長域の光を照射することで有機性廃水中の炭素、窒素、リンを同時に除去する機能を持つ。さらに、廃水処理過程で生成するバイオマス中には、高濃度のタンパク質、炭水化物、脂質や、微生物産生プラスチック成分 (ポリヒドロキシアルカン酸エステル: PHA)、カロテノイド等の有用物質を蓄積することも可能である (Capson-Tojo et

al. 2020)。紅色光合成細菌を利用した廃水処理に関する研究は、近年オーストラリア・クイーンズランド大学 Hülsen らの研究が発端となり火が付き、これまでに都市下水、養鶏場廃水、酪農場廃水、製薬工場廃水等の多様な廃水処理への有用性が報告されている (Hülsen et al. 2014, 2016, 2018, Lu et al. 2019)。

実は紅色光合成細菌を用いた廃水処理は、世界に先駆けて1960～70年代にかけて日本で開発が進められてきた技術であり (Kobayashi et al. 1966, Kobayashi & Tchan 1973)、1980年代には、国内で10か所近い実処理施設が稼働していた (嶋田・高市 2020)。しかし、当時主流であった活性汚泥法の経験により培われた生物学的廃水処理技術の常識から運転管理に関する誤解が生じ、紅色光合成細菌を用いた廃水処理技術がその後広がりを見せることはなかった。嶋田・高市 (2020) はその一つとして、高有機物濃度廃水を活性汚泥法の経験に合わせて意図的に希釈し低有機物濃度にして処理を続けることで、槽内に紅色光合成細菌バイオマスが維持できなかった点を挙げている。1980年代から現在に至るまで廃水処理技術は急速に発展し、活性汚泥法以外の様々な手法が社会に広く普及した。その過程で、廃水処理に関与する多種多様なプランクトンの機能に対する知見と

理解が飛躍的に深まり、先のような誤解による失敗も起き難くなったと考えられる。紅色光合成細菌は光合成能を持つプランクトンとして、今後微細藻類と同様に、廃水処理のメインストリームの一つになる可能性を秘めている。

## 6. ケーススタディー (2) :

### 紅色光合成細菌による屠殺場廃水処理

人口増加に伴い食肉の需要は高まることは必然であり 1970 年代から現在にかけて、世界の食肉消費量は約 3 倍に増加している (FAO 2017)。食肉需要の増加は、屠殺場での屠畜解体作業に伴い発生する、血液や残渣を含む廃水の発生量増加に直結する。屠殺場廃水は、有機物に加えて、窒素やリン等の栄養塩類、ウイルス、病原菌を含むため、適正な処理を施す必要がある。しかし、中南米・東南アジア・アフリカ等の地域では、未処理か粗放的な処理に留まる事例が多い。例えばメキシコでは、年間 800 万トンの屠殺場廃水が発生しているが、その約 7 割は未処理で下水管や河川に直接放流されている (Hernández et al. 2018)。紅色光合成細菌は、屠殺場廃水のような栄養塩類を高濃度を含む有機性廃水の処理に適すると報告されている (Hülse et al. 2016)。しかし、これまで紅色光合成細菌を利用した屠殺場廃水処理に関する研究報告例は無かった。

そこで著者らは、グアナファト大学工学部の実験室で事前に培養した紅色光合成細菌を播種試料として、グアナファト州の食肉処理施設の屠殺場廃水処理を行った。温度  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  で、培養槽側面から波長 850 nm の赤外光を照射した系列と暗所系列の 2 系列を比較する回分処理を実施した。その結果、赤外光照射系列では、処理開始から 5 日程度で化学的酸素要求量 (Chemical oxygen demand: COD)、リン酸 ( $\text{PO}_4^{3-}$ )、溶存態窒素が効果的に除去され、最終的な除去率は COD と  $\text{PO}_4^{3-}$  で 9 割、溶存態窒素で 7 割を超える結果が得られた。暗所系列では、8 割前後の

COD と  $\text{PO}_4^{3-}$  除去は見られたものの、除去速度は赤外光照射系列と比較して約 1/5 であり、赤外光照射により紅色光合成細菌の廃水処理性能が飛躍的に向上することが示された (未発表)。暗所系列でも一定の COD と  $\text{PO}_4^{3-}$  除去が得られた理由として、紅色光合成細菌の多様な代謝経路が挙げられる。実験で用いた紅色光合成細菌は、元々実廃水 (ビール工場廃水のメタン発酵消化液) に太陽光を照射し長期に渡り順養したものであり、複数の紅色光合成細菌種が混在していたと考えられる。紅色光合成細菌には光合成従属栄養性以外にも、光合成独立栄養性、化学合成従属栄養性等の異なる代謝を取る種が存在し、暗所系列では、播種試料に内在していた化学合成従属栄養性の紅色光合成細菌種が機能したと推察された。

実処理を屋外環境下で実施する場合、夜間の光照射の有無は、エネルギー消費量の増減に関わる重要な要素である。本実験により、暗所下においても一定の割合で屠殺場廃水中の汚濁物質処理は進むが、その処理性能は光照射下と比較して低下することが明らかとなった。屋外環境下において自然光のみで廃水処理を行う場合は、夜間の処理水質が劣化する可能性がある。そのため夜間は、(1) 処理槽への廃水供給速度を低下する、(2) 赤外光照射装置を用いて別途光エネルギーを供給する、等の対策が必要と考えられる。

## 7. サンベルト地域での導入を目指して

光合成能を有するプランクトンを利用した廃水処理は、従来の機械的な曝気を伴う好気性細菌を主流とした廃水処理と比較し、省エネルギーでかつ有用物質を生産可能な技術として今後さらに重要性が高まると期待される。このような光エネルギーを利用した技術は、特に地球上の北緯 35 度から南緯 35 度の範囲に位置する比較的温暖で太陽光が豊富な“サンベルト地域”での利用に最も適している。サンベルト地域には、廃水処理施設の普及率が低い東南アジア、中南米、ア

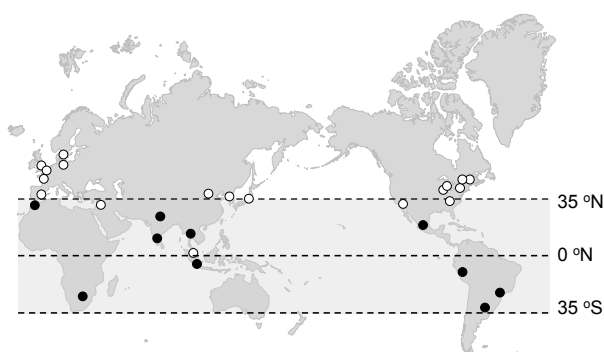


Fig. 5. Sewage treatment coverage levels in different cities around the world (Year: 2014). White symbols: high coverage city (>85%); black symbols: low coverage city (<70%). Data source: UESI (2021).

フリカ等の開発途上国が集約している (Fig. 5)。本技術に関する研究を進め、知見とノウハウを蓄積することで、経済的基盤の有無に関わらず導入可能な次世代型廃水処理技術として成熟する可能性がある。

今後は、これまでモデル地域として研究を進めてきたメキシコに加え、現在、本学が科学技術振興機構 (JST) および国際協力機構 (JICA) による地球規模環境課題対応国際科学技術協力プログラム (SATREPS) の支援を受けて国際共同研究を進めているエチオピアをモデル地域の一つとして選定し、本技術に関する共同研究開発に積極的に取り組みたいと考えている。

## 謝辞

本研究の一部は、日本学術振興会の科学研究費助成事業 (若手研究 (B) 17K12851) および矢崎科学技術振興記念財団の国際交流援助 (2017 年度 共同研究 (前期)) の支援により実施された。研究で用いたバクテリア試料は、横浜市北部汚泥資源化センターおよびグアナファト市下水処理場から提供を受けたものであり、関係者の皆さまに厚く御礼申し上げます。

## 引用文献

Akizuki S, Cuevas-Rodríguez G, Toda T (2019) Microalgal-nitrifying bacterial consortium for ener-

gy-saving ammonia removal from anaerobic digestate of slaughterhouse wastewater. *J Water Process Eng* 31: 100753.

Akizuki S, Cuevas-Rodríguez G, Toda T (2020a) Anaerobic digestion effluent treatment using microalgae and nitrifiers in an outdoor raceway pond with fluidized carriers. *Water Sci Technol* 82(6): 1081–1091.

Akizuki S, Natori N, Cuevas-Rodríguez G, Toda T (2020b) Application of nitrifying granular sludge for stable ammonium oxidation under intensive light. *Biochem Eng J* 160: 107631.

Akizuki S, Cuevas-Rodríguez G, Toda T (2021) Nitrification of anaerobic digestate using a consortium of microalgae and nitrifiers in an open photobioreactor with moving bed carriers. *Chemosphere* 263: 127948.

秋月真一・西健斗・戸田龍樹・井田旬一 (2020) 硝化菌の光阻害緩和を目的とした固定化技術. *ケミカルエンジニアリング* 65(1): 19–24.

All-Gas Project (2019) Project website information. <http://www.all-gas.eu/en/> (2021 年 4 月 16 日アクセス)

Anthonisen et al. (1976) Inhibition of nitrification by ammonia and nitrous acid. *J Water Pollut Control Fed* 57: 835–852.

Arden E, Lockett WT (1914) Experiments in the oxidation of sewage without the aid of filters. *J Soc Chem Ind* 33: 523–539.

Capson-Tojo G, Batstone DJ, Grassino M, Vlaeminck SE, Puyol D, Verstraete W, Kleerebezem R, Oehmen A, Ghimire A, Pikaar I et al. (2020) Purple phototrophic bacteria for resource recovery: Challenges and opportunities. *Biotechnol Adv* 43: 1075657.

Collos Y, Harrison PJ (2014) Acclimation and toxicity of high ammonium concentrations to unicellular algae. *Mar Pollut Bull* 80: 8–23.

Crofts AR (1966) Uptake of ammonium ion by chloroplasts, and the mechanism of amine uncoupling. *Biochem Biophys Res Commun* 24: 127–134.

Diab S, Shilo M (1988) Effect of light on the activity and survival of *Nitrosomonas* sp. and *Nitrobacter* sp. isolates from fish ponds. *Bamidgeh* 40: 50–56.

Food and Agricultural Organization of the United Nations (FAO) (2017) The future of food and agriculture: Trends and challenges. FAO, Rome, Italy, 180 pp.



- Gonçalves AL, Pires JCM, Simões M (2017) A review on the use of microalgal consortia for wastewater treatment. *Algal Res* 24: 403–415.
- Gutierrez J, Kwan TA, Zimmerman JB, Peccia J (2016) Ammonia inhibition in oleaginous microalgae. *Algal Res* 19: 123–127.
- Hernández SC, Jiménez LD, Bueno García JA (2018) Potential of energy production from slaughterhouse wastewater. *Interciencia* 43: 558–565.
- Hülßen T, Barry EM, Lu Y, Puyol D, Keller J, Batstone DJ (2016) Domestic wastewater treatment with purple phototrophic bacteria using a novel continuous photo anaerobic membrane bioreactor. *Water Res* 100: 486–495.
- Hülßen T, Batstone DJ, Keller J (2014) Phototrophic bacteria for nutrient recovery from domestic wastewater. *Water Res* 50: 18–26.
- Hülßen T, Hsieh K, Tait S, Barry EM, Puyol D, Batstone DJ (2018) White and infrared light continuous photobioreactors for resource recovery from poultry processing wastewater – A comparison. *Water Res* 144: 665–676.
- Karya NGAI, van der Steen NP, Lens PNL (2013) Photo-oxygenation to support nitrification in an algal-bacterial consortium treating artificial wastewater. *Bioresour Technol* 134: 244–250.
- Kobayashi M, Matsumoto H, Okuda A (1966) Distribution and significance of photosynthetic bacteria. *J Sci Soil Manure* 37: 447–450.
- Kobayashi M, Tchan YT (1973) Treatment of industrial waste solutions and production of useful by-products using a photosynthetic bacterial method. *Water Res* 7: 1219–1224.
- Kwon G, Kim H, Song C, Jahng D (2019) Co-culture of microalgae and enriched nitrifying bacteria for energy-efficient nitrification. *Biochem Eng J* 152: 107385.
- Liao Z, Chen Z, Wu Y, Xu A, Liu J, Hu H-Y (2021) Identification of development potentials and routes of wastewater treatment and reuse for Asian countries by key influential factors and prediction models. *Resour Conserv Recy* 168: 105259.
- Lofano G, Brown J (2010) Wastewater management through the ages: A history of mankind. *Sci Total Environ* 408: 5254–5264.
- Lora Grando R, de Souza Antune AM, de Fonseca FV, Sánchez A, Barrena R, Font X (2017) Technology overview of biogas production in anaerobic digestion plants: A European evaluation of research and development. *Renew. Sustain. Energy Rev* 80: 44–53.
- Lu H, Zhang G, Zheng Z, Meng F, Du T, He S (2019) Bio-conversion of photosynthetic bacteria from non-toxic wastewater to realize wastewater treatment and bioresource recovery: A review. *Bioresour Technol* 278: 383–399.
- Mehrabadi A, Craggs R, Farid MM (2015) Wastewater treatment high rate algal ponds (WWT HRAP) for low-cost biofuel production. *Bioresour Technol* 184: 202–214.
- Merbt SN, Stahl DA, Casamayor EO, Martí E, Nicol GW, Prosser JI (2012) Differential photoinhibition of bacterial and archaeal ammonia oxidation. *FEMS Microbiol Lett* 327: 41–46.
- Mishima K, Nishimura T, Goi M, Katsukura N (1996) Characteristics of nitrification and denitrification of the media-anaerobic-anoxic-oxic process. *Water Sci Technol* 34: 137–143.
- Muñoz R, Guieysse B (2006) Algal-bacterial processes for the treatment of hazardous contaminants: A review. *Water Res* 40: 2799–2815.
- Nishi K, Akizuki S, Toda T, Matsuyama T, Ida J (2020) Development of light-shielding hydrogel for nitrifying bacteria to prevent photoinhibition under strong light irradiation. *Process Biochem* 94: 359–364.
- Oswald W, Gotass H (1957) Photosynthesis in sewage treatment. *Trans Am Soc Civ Eng* 122: 73–105.
- Pike research (2012) Methane recovery and utilization in landfills and anaerobic digesters: Municipal solid waste, agricultural, industrial, and wastewater market report on analysis and forecasts. Pike Research, Boulder, USA, 87 pp.
- Rada-Ariza AM, Lopez-Vazquez CM, van der Steen NP, Lens PNL (2017) Nitrification by microalgal-bacterial consortia for ammonium removal in flat panel sequencing batch photo-bioreactors. *Bioresour Technol* 245: 81–89.
- Rittmann RE, Langeland WE (1985) Simultaneous de-

- nitrification with nitrification in single-channel oxidation ditches. *J Water Pollut Control Fed* 57: 300–308.
- Rosso D, Stenstrom M, Larson L (2008) Aeration of large-scale municipal wastewater treatment plants: state of the art. *Water Sci Technol* 57: 973–978.
- Sepehri A, Sarrafzadeh M-H, Avateffazeli M (2020) Interaction between *Chlorella vulgaris* and nitrifying-enriched activated sludge in the treatment of wastewater with low C/N ratio. *J Clean Prod* 247: 119164.
- 嶋田敬三・高市真一 (2020) 光合成細菌の利用. “光合成細菌—酸素を出さない光合成—”. 裳華房, 東京, pp. 261–272.
- Udaiyappan AFM, Hasan HA, Takriff MS, Abdullah SRS (2017) A review of the potentials, challenges and current status of microalgae biomass applications in industrial wastewater treatment. *J Water Process Eng* 184: 202–214.
- Urban Environment and Social Inclusion (UESI) (2019) Water and equity: results of pilot cities. <https://data-drivenlab.org/urban/issue-profiles/water/> (2021年4月17日アクセス)
- Vargas G, Donoso-Bravo A, Vergara C, Ruiz-Filippi G (2016) Assessment of microalgae and nitrifiers activity in a consortium in a continuous operation and the effect of oxygen depletion. *Electron J Biotechnol* 23: 63–68.
- Xia A, Murphy JD (2016) Microalgal cultivation in treating liquid digestate from biogas systems. *Trends Biotechnol* 23: 265–275.

# Preparation and characterization of poly(vinyl alcohol)/sodium alginate/TEMPO-oxidized cellulose nanofiber hydrogel for dye removal

Wing Shan Chan <sup>1)</sup>, Yuichi Shibata <sup>1)</sup>, Kento Nishi <sup>1)</sup>, Tatsushi Matsuyama <sup>2)</sup>, Junichi Ida <sup>2)\*</sup>

1) *Graduate School of Science and Engineering, Soka University, 1-236, Tangi-cho, Hachioji, Tokyo, 192-8577, Japan*

2) *Faculty of Science and Engineering, Soka University, 1-236, Tangi-cho, Hachioji, Tokyo, 192-8577, Japan*

\* *Corresponding author: ida@soka.ac.jp*

Received May 4 2021, Accepted May 7 2021

**Abstract** The composite hydrogel of poly(vinyl alcohol) (PVA)/sodium alginate (SA)/TEMPO-oxidized cellulose nanofiber (CNF) was prepared and employed as an effective adsorbent for dye removal. The effect of the weight ratio of incorporated SA and CNF components on the mechanical and dye removal properties of the hydrogel was examined in detail. While the PVA concentration and the SA + CNF concentration were maintained as constant (7.5 and 1.0 wt%, respectively), the weight ratios of SA:CNF were changed from 10:0 to 7:3. Cross-linking of PVA, SA, and CNF were carried out by using boric acid/borax and calcium chloride. The mechanical properties of prepared hydrogels were investigated by a compressive stress test and a durability test under severe agitation in a solution.

The PVA/SA hydrogel with no CNF addition (the 10:0 hydrogel) showed the highest compressive strength, and the elastic modulus is approximately 40 times greater than the highest reported value of the conventional PVA hydrogel cross-linked by glutaraldehyde (GA). The hydrogel prepared with SA:CNF ratio of 9:1 (the 9:1 hydrogel) showed the second-highest elastic modulus. In terms of durability, the 9:1 hydrogel was the highest. While the breakage ratio of the 9:1 hydrogel under very severe agitation condition of 2750 rpm was essentially negligible, it was reported that the conventional PVA hydrogel crosslinked with sodium sulfate was completely broken. Even under 3000 rpm, only 12% of the beads were broken for the 9:1 hydrogel.

Dye removal experiment was carried out by using methylene blue (MB) as a model dye. The result shows that the highest MB adsorption capacity of 243.9 mg g<sup>-1</sup> was obtained for the 9:1 hydrogel. The value was 1.4 times higher than that of the highest reported value for the conventional PVA-based adsorbent. With superior mechanical and dye adsorption properties, the developed PVA/SA/CNF hydrogel can be considered as a potential alternative for dye removal.

**Keywords:** cellulose nanofibers, composite hydrogel, dye removal, methylene blue, poly(vinyl alcohol)

## 1. Introduction

Synthetic dyes are generally used in various industries due to their easy application and inexpensive properties. However, dye effluents have become a growing concern due to their hazards to the environment and living things. Approximately 100 tones of dye effluent per year are discharged from the textile industry alone (Katheresan et al. 2018). Ingestion of dyes can cause serious health problems. For example, since cationic dyes (e.g. methylene blue) can interact with negatively charged cell membrane surfaces, these can enter cells easily, leading to long-lasting influences on the human organism (Li 2010). The adsorption dye removal method offers various advantages, such as the ability to treat a wide variety of dyes, easy operation, no formation of toxic by-products and secondary wastes (Katheresan et al. 2018). Therefore, it is one of the preferred techniques of dye removal.

Poly(vinyl alcohol) (PVA) hydrogels have been studied as dye adsorbents by many researchers due to their low cost, non-toxic, high chemical stability, and porous characteristics (Sinha & Chakma 2019). However, their poor mechanical strength and tendency to agglomerate are the main drawbacks in dye removal applications (Wu & Wisecarver 1991). Various modification methodologies have been tried to improve the physicochemical characteristics of PVA hydrogels. Dinh & Bach (2014) tried to change the surface properties of PVA hydrogel by incorporating sodium alginate (SA) and successfully suppressed the agglomeration of gel particles (Dinh & Bach 2014). To improve the mechanical strength of PVA hydrogel, nanocellulose is often used to synthesize composite hydrogels. Cellulose nanofiber (CNF) is a nanocellulose obtained from a plant cell wall in a form of filamentous fragments. It contains both amorphous and crystalline domains with dimensions of 5-30 nm

in width and an aspect ratio of over 50 (Nascimento et al. 2018). Moreover, oxidation of CNF using 2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxy (TEMPO) radical converts C6 primary hydroxyl groups into carboxylate groups, which introduces negative charges to the cellulose surface (Saito & Isogai 2006). Due to its high stiffness, high aspect ratio, and surface carboxylate groups, TEMPO-oxidized CNF can be a good candidate to be used as a reinforcing agent to improve the weak mechanical properties of the PVA hydrogel. Zhang et al. (2018) have prepared SA/CNF hydrogel using calcium chloride as a crosslinking agent and improved the mechanical stability of the hydrogel. Han et al. (2013) synthesized borax cross-linked PVA hydrogels with CNF and examined the effects of particle size, aspect ratio, crystal structure, and crystallinity of CNFs on the compression property of the hydrogels. The results showed that the compressive strength of CNF reinforced hydrogel was 21 times greater than that of the pure PVA hydrogel (Han et al. 2013). However, synthesis and application for dye removal of the composite hydrogel consisting of PVA, SA, and TEMPO-oxidized CNF have not been reported yet.

In this study, by incorporating both SA and TEMPO-oxidized CNF, the PVA/SA/CNF hydrogels were prepared and the effects of weight ratios of SA and CNF on the mechanical properties and dye adsorption performance were examined. The mechanical properties of prepared hydrogels were investigated by a compressive stress test and a durability test. Also, a dye adsorption experiment was performed by using methylene blue (MB) as a model dye.

## 2. Materials and Methods

### 2.1 Materials

Sodium alginate (SA) powder, boric acid, and calcium chloride were purchased from FUJIFILM Wako Pure

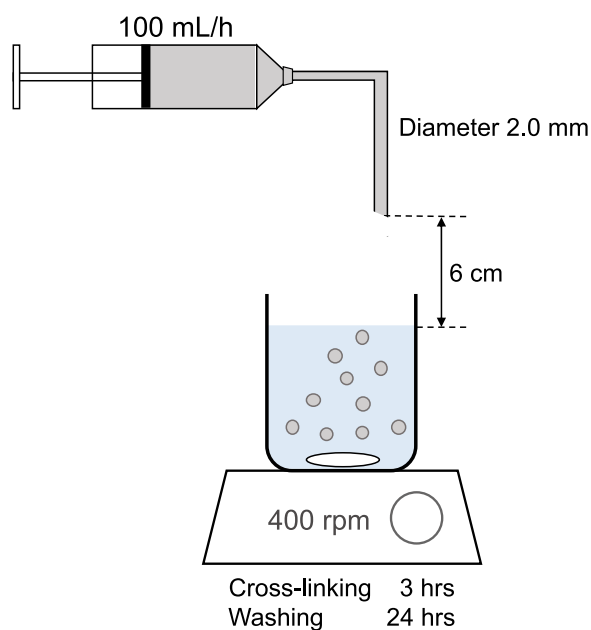


Fig. 1. Experimental set up for the preparation of PVA/SA/CNF hydrogels.

Chemical Corporation. Poly(vinyl alcohol) (PVA) (Kuraray, Japan), TEMPO-oxidized CNF dispersion (Nippon Paper Group, Japan), and borax (KENEI Pharmaceutical Co., Ltd.) were also used in the experiments.

## 2.2 Preparation of PVA/SA/CNF Hydrogel

Four different 50 mL of polymers solutions containing PVA, SA, and CNF were prepared by changing each component concentration as shown in Table 1. In this study, while the PVA concentration and the (SA + CNF) concentration were maintained as constant (7.5 and 1.0 wt%, respectively), the weight ratio of SA:CNF was changed from 10:0 to 7:3. Different amounts of SA powder (0.5, 0.45, 0.4, and 0.35 g) were dissolved in deionized water. After 0.75 g of PVA was added into the solution, the mixture was transferred to an autoclave (TOMY, SX-500). It was heated at 121°C for 20 min, followed by stirring at 80°C in a water bath for 50 min. Different amounts of 1 wt% CNF dispersion (0, 5, 10, and 15 g) were

Table 1. Compositions of PVA/SA/CNF hydrogels used in this study.

Sample name (SA:CNF)	PVA (wt%)	SA (wt%)	CNF (wt%)
10:0	7.5	1	0
9:1	7.5	0.9	0.1
8:2	7.5	0.8	0.2
7:3	7.5	0.7	0.3

added into the solution and stirred at 80°C for 10 min. Then, the suspension was mixed using a homogenizer (Ika T 25, Germany) for 3 min to obtain a homogeneous suspension. Air bubbles that remained in the suspension were removed using a centrifuge (HITACHI SCT 5B, Japan) at 3000 rpm for 10 min. By dripping the obtained PVA/SA/CNF mixture into 500 mL of cross-linking agent solution containing 5 wt% boric acid/borax and 3 wt% calcium chloride at a dripping rate of 100 mL h<sup>-1</sup>, hydrogel beads were obtained. The beads were washed with 400 mL of deionized water for 24 h with stirring and stored in 3 wt% calcium chloride solution. The prepared PVA/SA/CNF hydrogel samples are referred to as “SA weight ratio”:“CNF weight ratio”. For example, the sample prepared with the weight ratio of SA:CNF of 9:1 is referred to as the 9:1 hydrogel.

## 2.3 Mechanical Strength

### 2.3.1 Elastic modulus

The mechanical property of hydrogels was analyzed with a tabletop testing machine (A&D STB-1225S, Japan) using a 50 N load cell. The compressive strength tests were performed with a crosshead speed of 10 mm min<sup>-1</sup>. The elastic modulus was determined based on the data within 0-20% of the

strain range by using the following equation from the Hertz model:

$$F = \frac{4}{3}ED^{0.5}\Delta D^{1.5} \quad (1)$$

where  $F$  is the compressive load (N),  $E$  is the elastic modulus (MPa),  $D$  is the diameter of the hydrogel bead, and  $\Delta D$  is the displacement (mm). 5 specimens were tested for each sample and the average data was used.

### 2.3.2 Durability

The durability of the hydrogels was examined using a Tornado overhead stirring system (As One SM-101, Japan). 100 hydrogel beads were dispersed in 1.0 L of deionized water and stirred strongly at an agitating speed of 2250 to 3500 rpm for 5 min. Then, the number of hydrogel beads without any damage (unbroken hydrogel beads) was counted. The breakage ratio was calculated by the following equation:

$$\text{Breakage ratio} = \frac{N_a - N_u}{N_a} \times 100\% \quad (2)$$

where  $N_a$  is the number of hydrogel beads added and  $N_u$  is the number of unbroken hydrogel beads.

### 2.4 Dye Adsorption Experiment

Dye adsorption isotherms on the hydrogels were examined by using MB as a model synthetic dye in batch processes. MB is a cationic dye widely used in textile industries.

Twenty hydrogel beads were added into 40 mL of MB solutions with a concentration range of 100 to 1000 ppm. The MB concentration at adsorption equilibrium was measured after 6 days. The data were analyzed by the Langmuir isotherm model to investigate the adsorption mechanism.

## 3. Results

### 3.1 Elastic modulus

The elastic modulus of hydrogels determined based on the results of compressive stress tests was shown in Fig. 2. The compressive strength of hydrogels was high in the order of 10:0 > 9:1 > 8:2 > 7:3. The 10:0 hydrogel shows the highest elastic modulus of 1.0 MPa, and the value is approximately 1.8 times larger than that of the 7:3 hydrogel, showing the lowest value. The results indicate that the PVA/SA hydrogel with no CNF addition shows the greatest compressive strength, and the addition of CNF decreased the strength. It should be noted here that compared to the conventional PVA hydrogel cross-linked by glutaraldehyde (GA), the elastic modulus of the 10:0 hydrogel is approximately 40 times greater and even the lowest elastic modulus for the 7:2 hydrogel is approximately 22 times greater than that for the PVA hydrogel.

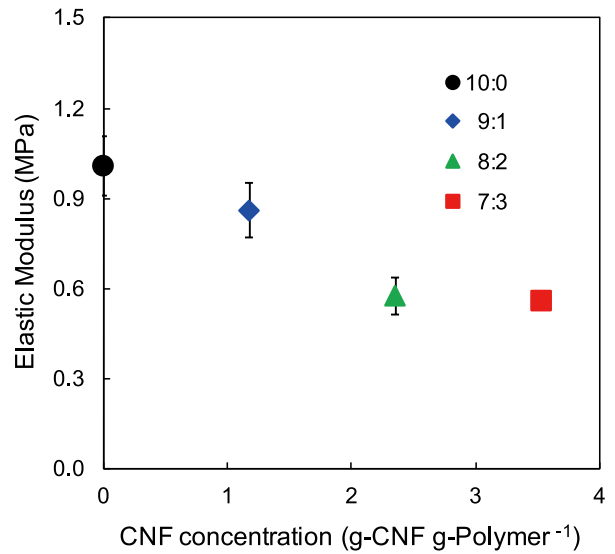


Fig. 2. Elastic modulus of the 7:3, 8:2, 9:1 and 10:0 hydrogels determined by a compressive stress test.

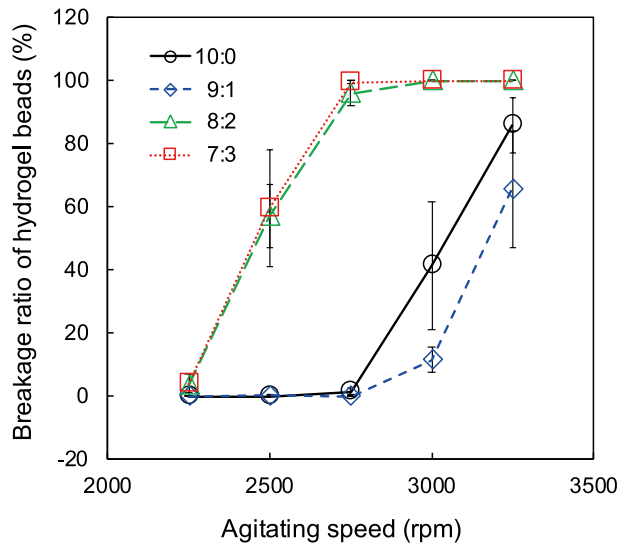


Fig. 3. Breakage ratio of hydrogel beads for the 7:3, 8:2, 9:1 and 10:0 hydrogels under severe agitation conditions of 2250-3250 rpm in a solution.

### 3.2 Durability

The breakage ratios of the hydrogels under severe agitation from 2250 to 3250 rpm in solution are shown in Fig. 3. According to the results at the maximum agitating speed of 3250 rpm, the durability of hydrogels is high in the order of 9:1 > 10:0 > 8:2 = 7:3. For the 8:2 and 7:3 hydrogels, all the hydrogel beads were broken after being agitated at 3000 rpm for 5 min. Under the same condition, approximately 42% of the beads were broken for the 10:0 hydrogel. On the other hand, only 12% of the beads were broken for the 9:1 hydrogel. The results indicate that to improve the durability of the PVA hydrogel for agitation, the addition of an appropriate ratio of SA and CNF is necessary and that is 9:1 under the condition used in this study.

For the later dye adsorption experiments, the 10:0 and the 9:1 hydrogels were selected since they exhibited high mechanical strength and durability.

### 3.3 Adsorption Isotherm Model

The adsorption isotherms of MB on the 10:0 and the

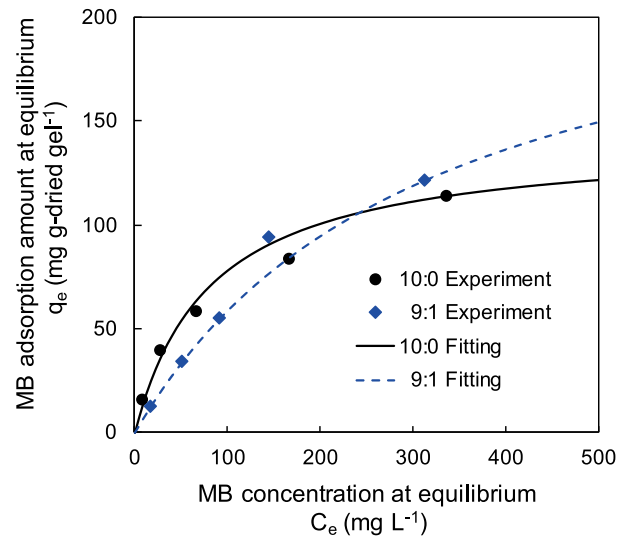


Fig. 4. Methylene blue adsorption isotherm on the 10:0 and the 9:1 hydrogel adsorbent at 25°C.

9:1 hydrogels were determined at 25°C and shown in

Fig. 4. The results were analyzed by the Langmuir Eq. (3).

$$q_e = \frac{q_m K_L C_e}{1 + K_L C_e} \quad (3)$$

where  $q_e$  and  $C_e$  are the amount of MB adsorbed ( $\text{mg g}^{-1}$ ) and the MB concentration ( $\text{mg L}^{-1}$ ) at equilibrium,  $q_m$  is the saturated adsorption capacity for MB adsorption ( $\text{mg g}^{-1}$ ),  $K_L$  is Langmuir isotherm constant ( $\text{L mg}^{-1}$ ).

Parameters obtained by each adsorption isotherm equation are shown in Table 3. The coefficients of determination for the Langmuir equation,  $R^2$  were > 0.996 for both samples, indicating the MB adsorption results are in good agreement with the Langmuir model. Therefore, the adsorption process can be described as monolayer adsorption on the surface of adsorbents with relatively homogeneous sites. The saturated adsorption capacity for the 9:1 hydrogel is  $243.9 \text{ mg g}^{-1}$ , which is approximately 1.7 times higher than that for the 10:0 hydrogel. However, since the MB concentration range used in this study is limited to less than  $350 \text{ mg L}^{-1}$  at equilibrium, the maximum adsorption

Table 2. Parameters of Langmuir isotherm model for the 9:1 and 10:0 hydrogels.

Adsorbent	Langmuir isotherm model			
	$q_m(\text{exp.})$ ( $\text{mg g}^{-1}$ )	$q_m$ ( $\text{mg g}^{-1}$ )	$K_L$ ( $\text{L mg}^{-1}$ )	$R^2$ (-)
10:0	161.19	140.85	0.012	0.9963
9:1	167.18	243.90	0.003	0.9982

Table 3. Adsorption characteristics of PVA-based polymer composite adsorbents for dye removal.

Adsorbent	Dye	$C_0$ ( $\text{mg L}^{-1}$ )	$q_m$ ( $\text{mg g}^{-1}$ )	Adsorption isotherm	Reference
PVA/SA/CNF hydrogel (9:1)	Methylene blue	1000	243.9	Langmuir	This study
Sodium alginate- polyacrylamide-(TEMPO)- oxidized cellulose nanofibers	Methylene blue	500	57.1	Langmuir	Yue et al. (2019)
Poly(vinyl alcohol)-sodium alginate-chitosan- montmorillonite	Methylene blue	70	137.2	Langmuir	Wang et al. (2018)
Poly(vinyl alcohol)/ carboxymethyl cellulose/ graphene oxide/bentonite	Methylene blue	250	172.4	Langmuir	Dai et al. (2018)
Poly(vinyl alcohol)	Methylene blue	25	13.8	Langmuir, Freundlich, Temkin	Umoren et al. (2013)

amounts observed for both hydrogels did not show a significant difference and were  $161.19 \text{ mg g}^{-1}$  and  $167.18 \text{ mg g}^{-1}$  for the 10:0 and the 9:1 hydrogels, respectively.

## 4. Discussion

### 4.1 Mechanical Strength

The results of the compressive strength tests show that the PVA/SA hydrogel with no CNF addition has the highest compressive strength, and the addition of CNF resulted in the decrease of the strength. The considered reason is that although the stiffness of CNF itself is remarkable, the interaction between CNF and calcium

ions is weaker than that between SA and calcium ions. For the PVA/SA, due to the “egg-box” structure formed by strong interaction between SA and calcium ions, the hydrogel matrix could exhibit very high stability for compression operation (Shivakumara et al. 2019). On the other hand, for the case of cross-linking between CNF and calcium ions, since a strong structure could not be formed, it leads to the low stability of the hydrogel for compression operation.

### 4.2 Durability

The results of durability tests under severe agitation showed the 9:1 hydrogel possessed the highest dura-



bility, different from the compressive strength results. The compressive strength defined by an elastic modulus represents the hardness of the hydrogel. Therefore, the increase of stronger crosslinking of SA and calcium ions simply resulted in the increase of the hardness. On the other hand, for the durability tests, to absorb collision energy during agitation, moderate softness is also required for the hydrogel beads while maintaining their shape with sufficient hardness. Therefore, a good balance between hardness and softness is important. Although the results need to be examined in more detail, the highest durability for the 9:1 hydrogel indicates that the addition of appropriate ratio of SA and CNF would contribute to afford the PVA hydrogel a balanced hardness and softness, and significantly improves both the compressive strength and the durability for PVA hydrogel. In addition, a comparison of our durability result with that of the highest reported value for the PVA/SA hydrogel cross-linked by sodium sulfate was made (Dinh & Bach 2014). Under the same experimental condition, although their hydrogels were completely broken at 2750 rpm, and the breakage ratios for 10:0 and 9:1 hydrogel were negligible. Since the higher durability under severe agitation conditions indicates the hydrogel could offer long-lasting usage for dye removal, the developed hydrogel can be considered as a potential alternative for dye adsorbent.

#### 4.3 Dye Adsorption Performance

Table 3 shows the comparison of dye adsorption performance between the 9:1 hydrogel and other reported PVA-based adsorbents (Dai et al. 2018, Umoren et al. 2013, Wang et al. 2018, Yue et al. 2019). Compared to the highest adsorption capacity reported by Dai et al. (2018), the 9:1 hydrogel exhibits approximately 1.4 times higher adsorption capacity ( $243.9 \text{ mg g}^{-1}$ ). The reason for the large adsorption capacity is probably due to the

abundant carboxyl groups in SA and CNF which have a high affinity for cationic dyes due to electrostatic interaction. In particular, since the CNF component used in this study is the TEMPO-oxidized CNF, it possesses a high surface area and high density of surface carboxyl groups (Saito & Isogai 2006). Normally, it is known that only hydroxyl groups exist on the surface of CNF. However, since the hydroxyl groups on the TEMPO-oxidized CNF were transformed into carboxyl groups by the TEMPO catalytic oxidation method, the surface density of the carboxyl group is very high. This also contributed to the increase of negative charge on the CNF and resulted in repulsion of each fiber of cellulose, leading to high dispersion and high surface area of each CNF component. These could be the reason for the high adsorption capacity of the developed adsorbent.

#### 5. Conclusion

In this study, the PVA/SA/CNF hydrogels were prepared by incorporating both SA and TEMPO-oxidized CNF and the effects of weight ratios of SA and CNF on the mechanical properties and dye adsorption performance were examined. The results showed that the addition of an appropriate ratio of SA and CNF is important to improve the durability of the PVA hydrogel for agitation and which is 9:1 under the condition used in this study. The 9:1 hydrogel also shows the highest saturated MB adsorption capacity of  $243.9 \text{ mg g}^{-1}$ , that is 1.4 times higher compared to the highest reported value for the conventional PVA-based adsorbent. These superior mechanical and dye adsorption properties indicate that the developed PVA/SA/CNF hydrogel can be considered as a potential alternative for dye removal adsorbent material.

## References

- Dai H, Huang Y, Huang H (2018) Eco-friendly polyvinyl alcohol/carboxymethyl cellulose hydrogels reinforced with graphene oxide and bentonite for enhanced adsorption of methylene blue. *Carbohydr Polym* 185: 1-11.
- Dinh PV, Bach LT (2014) Immobilized bacteria by using PVA (polyvinyl alcohol) crosslinked with sodium sulfate. *Internat J Sci Eng* 7: 41-47.
- Han J, Lei T, Wu Q (2013) Facile preparation of mouldable polyvinyl alcohol-borax hydrogels reinforced by well-dispersed cellulose nanoparticles: physical, viscoelastic and mechanical properties. *Cellulose* 20:2947-2958.
- Katheresan V, Kansedo J, Lau SY (2018) Efficiency of various recent wastewater dye removal methods: A review. *J Environ Chem Eng* 6: 4676-4697.
- Li S (2010) Removal of crystal violet from aqueous solution by sorption into semi-interpenetrated networks hydrogels constituted of poly(acrylic acid-acrylamide-methacrylate) and amylose. *Bioresour Technol* 101: 2197-2202.
- Nascimento DM, Nunes YL, Figueirêdo MCB, Azeredo HMC, Aouada FA, Feitosa JPA, Rosa MF, Dufresne A (2018) Nanocellulose nanocomposite hydrogels: technological and environmental issues. *Green Chem* 20: 2428-2448.
- Saito T, Isogai A (2006) Introduction of aldehyde groups on surfaces of native cellulose fibers by TEMPO-mediated oxidation. *Colloids Surf A: Physicochem Eng Aspects* 289: 219-225.
- Sinha V, Chakma S (2019) Advances in the preparation of hydrogel for wastewater treatment: A concise review. *J Environ Chem Eng* 7: 103295.
- Shivakumara LR, Demappa T (2019) Synthesis and swelling behavior of Sodium alginate/poly(vinyl alcohol) hydrogels. *Turk J Pharm Sci* 16: 252-260.
- Umoren SA, Etim UJ, Israel AU (2013) Adsorption of methylene blue from industrial effluent using poly (vinyl alcohol). *J Mater Environ Sci* 4: 75-86.
- Wang W, Zhao Y, Bai H, Zhang T, Valentin IG, Song S (2018) Methylene blue removal from water using the hydrogel beads of poly(vinyl alcohol)-sodium alginate-chitosan-montmorillonite. *Carbohydr Polym* 198: 518-528.
- Wu LY A, Wisecarver L D (1991) Cell Immobilization Using PVA Crosslinked with Boric Acid. *Biotechnol. Bioeng* 39: 447-449.
- Yue Y, Wanga X, Han J, Yu L, Chen J, Wu Q, Jiang J (2019) Effects of nanocellulose on sodium alginate/polyacrylamide hydrogel: Mechanical properties and adsorption-desorption capacities. *Carbohydr Polym* 206: 289-301.
- Zhang H, Yang C, Zhou W, Luan Q, Li W, Deng Q, Dong X, Tang H, Huang F (2018) A pH-responsive gel macrosphere based on sodium alginate and cellulose nanofiber for potential intestinal delivery of probiotics. *ACS Sustain Chem Eng* 6: 13924-13931.

# 抱卵型カイアシ類 *Oithona oculata* のバイオリアクターを用いた試験的培養

高山佳樹<sup>1)\*</sup>、山本翼<sup>2)</sup>、戸田龍樹<sup>1)</sup>

1) 創価大学理工学部 〒192-8577 東京都八王子市丹木町 1-236

2) 株式会社ワールドインテック R&D 事業部 〒530-0001 大阪府大阪市北区梅田 1-1-3-500

## Experimental cultivation of the egg-carrying copepod *Oithona oculata* in a pilot bioreactor

Yoshiki Takayama<sup>1)\*</sup>, Tsubasa Yamamoto<sup>2)</sup> and Tatsuki Toda<sup>1)</sup>

1) Faculty of Science and Engineering, Soka University, 1-236 Tangi-cho, Hachioji, Tokyo 192-8577, Japan

2) WORLD INTEC CO., LTD., 1-1-3-500 Kita Ward, Umeda, Osaka 530-0001, Japan

\* Corresponding author: ytakayama@soka.gr.jp

2021年4月1日受付, 2021年5月11日受理

**Abstract** In aquaculture and ornamental industries, copepods are recognized as preferred live feeds for marine fish larvae over commonly used organisms such as *Artemia* and rotifers. Marine fish larvae fed with copepods show better survival and growth. Despite obvious advantages of copepods as live feed, their use is still limited owing to low productivity and cost-efficiency when mass cultured.

Copepods can be divided into free-spawner and sac-spawner (egg-carrying) according to their spawning style. In cultivation of egg-carrying copepod, a simple nauplii collection/harvesting method with low labor has not been established, because females carry the egg-sac until hatching. Manual collection of nauplii using a siphon hose and mesh-filters is a common method in copepod cultivation, but automation is necessary to reduce labor costs if copepods are to be viably cultured at a commercial scale. Recently, we devised a zooplankton bioreactor for rapid separation of free-spawner copepod eggs from adults in a tank. The automation collects eggs on a mesh filter in a water flow system which can also function as water exchange device. In the present study, we apply this bioreactor to egg-carrying copepod, and report the results from cultivation at laboratory-scale for 45 days.

Species of *Oithona* are good candidates for live feed because their body size and biochemical composition are suitable for many marine fish larvae which have small gapes. *Oithona oculata* is widely distributed and a typical dominant species in coastal waters, and was chosen as target species of egg-carrying copepod in present study. 150 adult individuals of *O. oculata* were placed into a culture chamber which were immersed in a reproduction tank containing 3 L seawater. The culture chamber to retain the copepods has a 100- $\mu$ m nylon mesh placed 5 mm above the

bottom, while allowing passage of nauplii. The copepods were fed daily with a sufficient amount of *Thalassiosira weissflogii* and *Isochrysis galbana* and incubated at 28°C for 45 days. Produced nauplii in the reproduction tank were collected daily using water flow of 1.5 L min<sup>-1</sup>. The species abundance in each development, ovigerous rate and collected number of nauplii were measured daily.

In the semi-continuous culture, the collected nauplii were cultured in maturation vessels and returned to the production tank after their maturation, and 45 days cultivation (four generations) was achieved. Total abundance was gradually increased from day 4 to day 20 and reached at 500 inds. L<sup>-1</sup>. Ovigerous rate varied from 0 to 88% during the incubation period. The maximum number of collected nauplii was 380 nauplii L<sup>-1</sup> at day 5. The results obtained in present study suggest that the bioreactor can also be applied to egg-carrying copepod by optimization of the mesh size and the water flow velocity.

**Keywords:** sac-spawner, cannibalism, ovigerous rate, aquaculture

## 1. はじめに

カイアシ類は海洋において多くの仔稚魚の重要な餌資源であり、ときにその胃内容物の 80% を占めることが知られている (Mauchline 1998)。カイアシ類はエイコサペンタエン酸 (EPA) ・ドコサヘキサエン酸 (DHA) などの脂肪酸やカロテノイド色素を多く含有し、仔稚魚の餌料として適した体サイズを示すことから、水産養殖分野における仔稚魚の理想的な餌料と認識されている (Støttrup 2003)。そのためカイアシ類を仔稚魚の餌料として用いる実験が度々なされ、カイアシ類を給餌した仔稚魚はワムシやアルテミアといった生物餌料を給餌した仔稚魚と比べ、生存率や成長速度、体色や市場価値が向上することが報告されている (Shields et al. 1999, Toledo et al. 1999, Rajkumar & Vasagam 2006, Wilcox et al. 2006, Barroso et al. 2013)。このような背景から沿岸域や汽水池から採集されたカイアシ類が仔稚魚の餌料に用いられるが、収量が季節や海況によって変動し、同種・同サイズのカイアシ類を生産することが難しく、寄生生物や病原菌が仔稚魚培養槽へ混入するといった欠点がある (萩原 2014)。このような背景から、培養環境を制御した屋内で

の集約的なカイアシ類の大量生産が渴望されているが、ワムシといった既存生物餌料の培養と比べてその生産性は低く (Molejón & Alvarez-Lajonchère 2003)、未だ実利用には至っていない。

カイアシ類の集約的培養では、培養槽内で生産、成長した成体や幼生が収穫され魚類の餌料として利用されるが、一部は継代培養されることで培養系は連続的に維持される。そのため対象とする仔稚魚の口径にあったサイズを示す個体の選択的収穫や継代用に特定の発達段階の個体を選択的に回収する技術が不可欠である。*Acartia* 属に代表される自由放卵型 (Free-spawner) の種においては槽内に沈殿した卵をサイフォンホースを用いて選択的に回収する方法が確立されており、回収卵を保管・孵化させたのちに魚類餌料や培養槽の立ち上げ用の播種個体として利用するプロセスが提案されている (Støttrup et al. 1986, Marcus & Wilcox 2007, Drillet et al. 2011, Santhosh et al. 2018)。一方、*Pseudodiaptomus* 属 (Calanoida) や *Oithona* 属 (Cyclopoida)、*Tisbe* 属 (Harpacticoida) といった様々な分類群から構成される抱卵型 (egg-carrying) の種は卵が孵化するまで雌成体が卵嚢を保持するため卵の状態での回収が困難である。そのため培養槽内の全海水を排水

し、手作業で槽外に設置した目合いの異なる2種類のメッシュへ通過させることで成体とノープリウス幼生を分離する手法が一般的であり、その煩雑さに難点が残る (Santhosh et al. 2018)。カイアシ類の集約的な培養の実用化に向けては、生産性の向上に加えて、培養の簡便さや低労力化が欠かせないが、特に抱卵型ではその分離・回収法の簡便化が喫緊の課題である。

*Oithona* 属は世界中の河口域から沿岸域において優占する小型の浮遊性カイアシ類であり (Paffenhöfer 1993)、幅広い温度、塩分耐性を有するとされている (Santhosh et al. 2018)。本属のノープリウス幼生の体幅は 60  $\mu\text{m}$  程度と小さく、仔稚魚の口径が小さなハタ科やフエダイ科といった魚種の餌料としての利用が可能である。*Oithona oculata* Farran は高密度での培養が達成されたことから大量培養の候補種として期待され (Molejón & Alvarez-Lajonchère 2003)、本研究の試料採集場所である相模湾真鶴港では通年を通して出現し、冬季から春季を除いて高い個体密度で出現する優占種である (Natori 2018)。

近年、培養槽内にメッシュを設置することで低労力に卵の分離・回収を行うバイオリアクターが提案され、自由放卵型カイアシ類 *Acartia steueri* Smirnov の培養においてその有用性が示された (高山 2020)。本稿では自由放卵型の卵の分離・回収用に開発された本バイオリアクターを抱卵型カイアシ類へ応用し、半連続培養を行った結果を報告する。加えて、抱卵型カイアシ類のノープリウス幼生の選択的分離・回収を達成するために実施した分離メッシュの目合い並びに分離に用いた水流の流速検討の結果も併せて報告する。

## 2. 材料および方法

### 2-1. カイアシ類試料の採集

本研究で用いた動物プランクトン試料は 2018 年 11 月から 2019 年 11 月に相模湾真鶴港 (35°09'49"N, 139°10'33"E) において、目合い 180  $\mu\text{m}$  のプランクトンネット (口径 30cm, 長さ 100 cm) を用いて採集し

た。また、各実験で使用した海水には同港において表層海水をバケツで採水し、粒子保持能 0.7  $\mu\text{m}$  のグラスファイバーフィルター (Whatman, GF/F) で濾過したものを使用した。採集した動物プランクトン試料は直ちに実験室に持ち帰り、実体顕微鏡下 (WILD M10, Leica) で形態学的特徴をもとに *O. oculata* 成体を同定・選別し (千原・村野 1997)、各実験前に 24 時間の馴致培養を行った。本研究におけるすべての馴致培養及び実験での水温と餌料密度は、本種の卵嚢生産速度が最大となる水温 28°C (Ambler et al. 1999)、餌料密度  $2 \times 10^6$  cells mL<sup>-1</sup> (Molejón & Alvarez-Lajonchère 2003) とし、餌料には Molejón & Alvarez-Lajonchère (2003) によって推奨された *Isochrysis galbana* Parke と *Thalassiosira weissflogii* Grunow の混合餌料 (細胞数比 1:1) を用いた。両餌料藻類は f/2 培地にて水温 20°C、24 時間光照射条件で培養した。

### 2-2. バイオリアクター

本研究で用いた培養システムは成体を培養する沈殿槽型の生産槽(3 L)と、生産槽から分離・回収されたノープリウス幼生が一時的に集積する回収器、そして継代用のノープリウス幼生を成体まで培養する成熟槽からなり、生産槽は高山 (2020) によって開発されたものを本研究へ流用した (Fig. 1)。生産槽の内にはプラスチック筒が設置され、筒底部にはノープリウス幼生のみが通過でき、成体が通過できない目合いのナイロンメッシュが備わっており、筒内で成体を培養する。回収器内の海水を水中ポンプ (CompactOn 300 pump, EHEIM GmbH & Co KG, Germany) で生産槽上部へ流し、生産槽下部のコックを開放することで生産槽と回収器内の海水を循環し、生産槽内のノープリウス幼生は生産槽上部から下部へ流れる水流によって、回収器に設置したプラスチック筒に運ばれる。このプラスチック筒底部には、ノープリウス幼生が通過しない目合い 20  $\mu\text{m}$  のナイロンメッシュが張っており、低労力で生産槽内のノープリウス幼生を分離・回収することが可能である。本研究では生産槽内に設置した分離用メッシュの目合

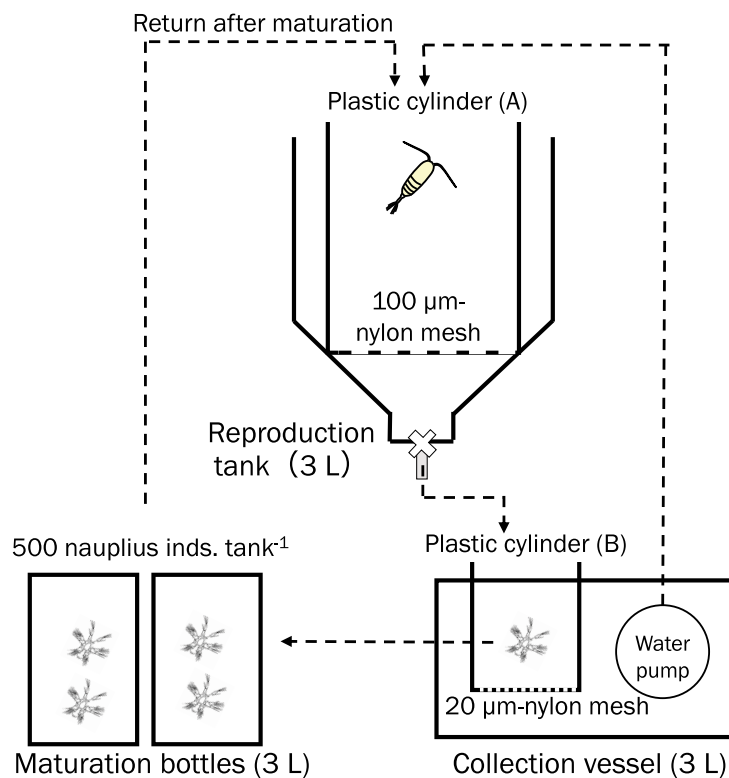


Figure 1. A reproduction tank (3 L) for incubation of adults copepods, a collection vessel (3 L) for collection of nauplii and maturation vessels for rearing nauplius used for semi-continuous culture of *Oithona oculata* in the present study. A reproduction tank has a plastic cylinder (A) with a 100  $\mu\text{m}$ -nylon mesh at the bottom, which retains adult copepods and allows passage of nauplii. A collection vessel has a plastic cylinder (B) with a 20  $\mu\text{m}$ -nylon mesh at the bottom, which retains nauplii. Sea water run from a collection vessel into a reproduction tank by a water pump, and from a reproduction tank into a collection vessel by gravity. Collected nauplii were reared in maturation vessels. Matured adults were returned from maturation vessels to a reproduction tank.

い、並びに水流の流速の検討を行った後に培養実験を実施した。

### 2-3. 分離用メッシュの目合い及び水流の流速の検討

成体が通過しない目合いを検討するため、4種類の目合いの異なるナイロンメッシュ (50、100、150、200  $\mu\text{m}$ ) を片面に張ったアクリル筒を 200 mL ビーカー内に設置し、筒内に *O. oculata* 成体 30 個体を収容後、暗所で 6 時間培養した後にナイロンメッシュを通過した個体数を計数した。

ノープリウス幼生の分離に用いる水流の適当な流速を検討するため、異なる流速条件における分離効率と

ノープリウス幼生の死亡率を測定した。目合い 100  $\mu\text{m}$  のナイロンメッシュを備えた生産槽内に 50 個体のノープリウス幼生を収容し、ホースを用いて生産槽上部から異なる流速で濾過海水を流し、回収器へ輸送された個体と死亡個体を 3 分毎に 1 時間計数した。水流の流速は、生産槽における水理的滞留時間がそれぞれ 3 分、2.5 分、2 分となる  $1.0 \text{ L min}^{-1}$ 、 $1.2 \text{ L min}^{-1}$ 、 $1.5 \text{ L min}^{-1}$  の 3 条件とした。

### 2-4. 半連続培養

現場より採集した *O. oculata* 成体 150 個体を生産槽へ播種し、45 日間の運転を行った。水温は 28℃、

明暗周期は12時間毎、餌料には *I. galbana* と *T. weissflogii* の混合餌料を選定し、十分量 ( $2 \times 10^6$  cells mL<sup>-1</sup>; Molejón & Alvarez-Lajonchère 2003) を海水の循環後に与え、ガラス管を用いて槽内下部から通気による弱い攪拌を行うことで餌料の沈殿を防いだ。生産槽のメッシュの目合いは100 μm、ノープリウス幼生回収時に生産槽上部から流す水流の流速は1.5 L min<sup>-1</sup> とし、一日に一回生産槽と回収器内の海水を1時間循環することで生産槽内のノープリウス幼生を回収、計数した。なお、培養期間中に生産槽内のメッシュに顕著な目詰まりが見られたため培養20日目に生産槽内のメッシュの交換を行った。回収したノープリウス幼生は500個体ごとに3Lプラスチックボトル内で培養し、成熟後に生産槽へ返送した。返送頻度は約3日に1度、16日目から20日目までは成体個体密度を増加させるため毎日返送を行った。返送された成体個体数は成体期までの生存率に依存し、返送された成体個体数は最大で232個体、最小で35個体、平均で  $142.3 \pm 66.7$  個体であった。

測定項目は水温、塩分、餌料藻類密度、ノープリウス幼生回収個体数、生産槽内の各成長段階の個体密度とし、水温は棒状水温計、塩分は屈折式塩分計 (S-10, Atago) を用いて計測し、餌料密度は光学顕微鏡 (OPTISHOT-2, Nikon) 下で血球計算盤を用いて計数し求めた。カイアシ類の発達段階毎の個体数は、生産槽内部を駒込ピペットで優しく攪拌した後に、槽上部から試水300 mLをビーカーで採取し、試水内の発達段階毎並びに卵嚢を有した雌成体の個体を実体顕微鏡下で計数することで求めた。なお、計数後の個体は直ちに培養槽へ戻した。この操作を5回繰り返し生産槽内の個体密度を推定した。ノープリウス幼生の生産数 (nauplii L<sup>-1</sup>) は以下の式により算出した。

$$NP = F \times OR \times SS \times HS \quad (1)$$

$F$  は雌成体の個体密度 (inds. L<sup>-1</sup>)、 $OR$  は雌成体における卵嚢を持つ個体の割合 (%)、 $SS$  は卵嚢サイズ

(eggs egg-sac<sup>-1</sup>)、 $HS$  は孵化率 (%) を示す。卵嚢サイズと孵化率は半連続培養実験中の測定が困難であるため、以下の方法で求めた値を使用した。卵嚢サイズは半連続培養と同様の条件で培養した雌個体を5%中性ホルマリン海水で固定し、実体顕微鏡下にてタングステン針を用いて卵嚢を解剖することで卵数を計数した。孵化率は Ambler et al. (1999) の方法に従い、稀に観察される雌成体から自然離脱した卵嚢を集め、培養することで孵化率を測定した。

### 3. 結果

実験に用いた目合い50、100、140、200 μmのメッシュの内、目合い50、100 μmではメッシュを通過した個体は皆無であった (Fig. 2)。目合い140 μmでは  $2.2 \pm 3.8\%$ 、目合い200 μmでは  $15.6 \pm 5.1\%$  の個体がナイロンメッシュを通過した。

ノープリウス幼生の回収効率も回収時間の経過とともに増加し、いずれの流速条件でも回収開始から1時間後には飽和した (Fig. 3)。回収開始から1時間後の

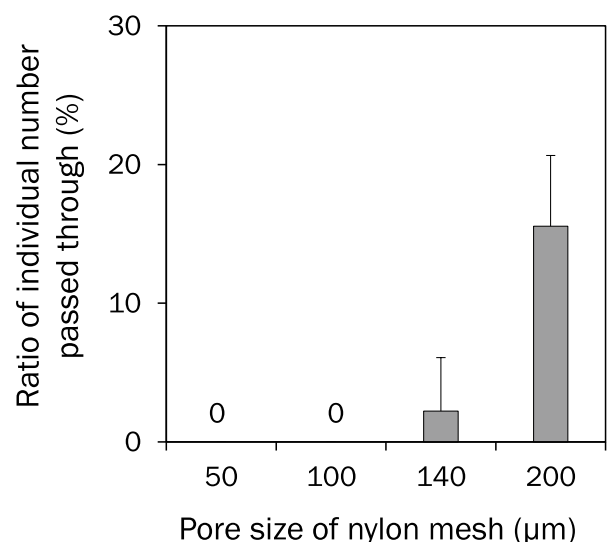


Figure 2. The ratio of individual number of adult female *Oithona oculata* passed through different pore size of nylon mesh for 6 hours at 28°C under dark condition. Error bars indicate standard deviations ( $n=3$ ).

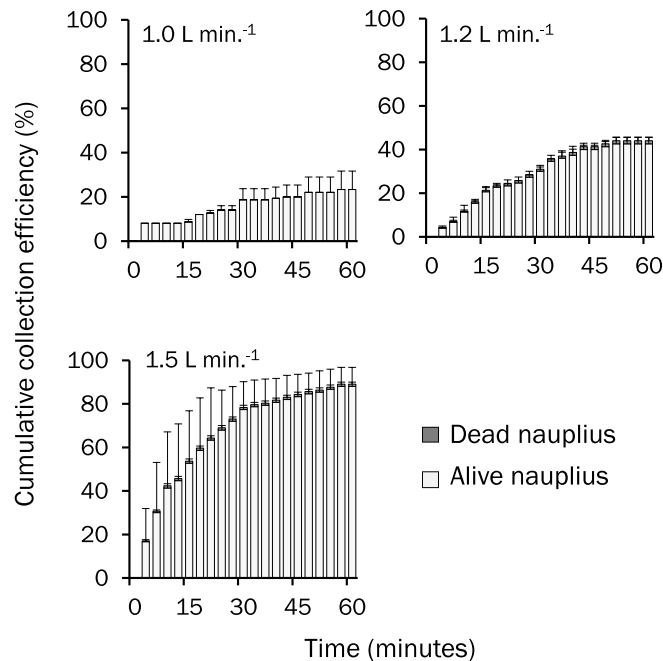


Figure 3. Cumulative collection efficiency of *Oithona oculata* nauplii reared in a reproduction tank (3 L) under three different flow rates as follows; 1.0, 1.2 and 1.5 L minutes<sup>-1</sup>. White and gray bars indicate the alive and dead nauplius, respectively. Error bars indicate standard deviations ( $n=3$ ).

ノープリウス幼生の回収効率は、1.5 L min<sup>-1</sup> の条件で 89.0% と他流速条件と比べ有意に高い値を示した (one-way ANOVA, Tukey-Kramer,  $p<0.01$ )。回収開始から 1 時間後の死亡個体の割合は流速 1.0 L min<sup>-1</sup> 条件で 0.0%、1.2 L min<sup>-1</sup> の条件で  $4.0 \pm 2.8\%$ 、1.5 L min<sup>-1</sup> の条件では  $2.0 \pm 2.0\%$  であり、統計的な有意差は認められなかった。

半連続培養における生産槽内の水温、塩分は培養期間を通しておおよそ一定の値を示した (Fig. 4A, B)。餌料藻類の細胞密度は培養初期から培養後期にかけて上昇する傾向を示した (Fig. 4C)。総個体密度は最小で  $44.0 \text{ inds. L}^{-1}$  (4 日目)、最大で  $508.3 \text{ inds. L}^{-1}$  (10 日目) を示し、培養期間中大きく変動した (Fig. 5)。雌成体の個体密度は培養 19 日目に  $182.6 \text{ inds. L}^{-1}$  と最大値を示した後に減少し、培養最終日まで増減を繰り返した。雌成体の内、卵嚢を有した雌成体の割合を示す携卵率は、0.0% (45 日目) から 87.9% (7 日目) の間で変動し、平均で  $44.2 \pm 20.9\%$  であった (Fig. 6)。回収されたノープリウス幼生数は培養 5 日目に  $381.0 \text{ inds. L}^{-1}$  と最大値を

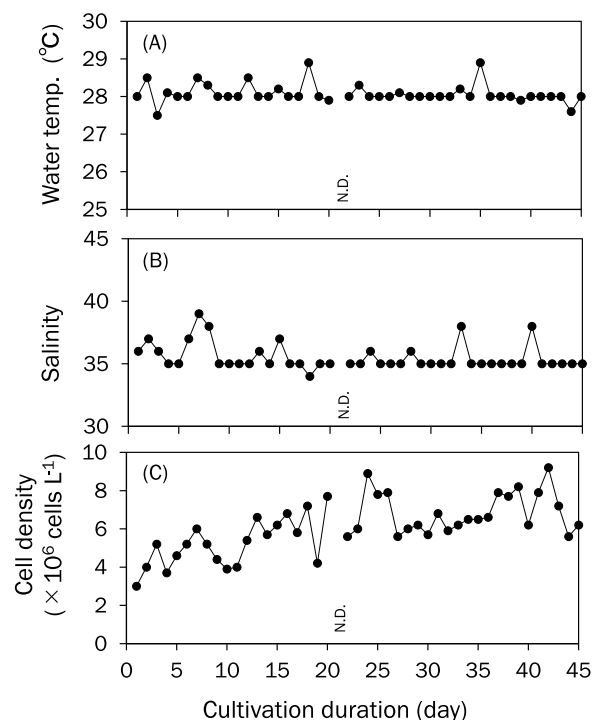


Figure 4. Temporal variations of water temperature, salinity and cell concentration of microalgae in a reproduction tank in semi-continuous culture for 45 days. Cell concentration is the sum of concentrations of *Isochrysis galbana* and *Tharassiosira weissflogii*.



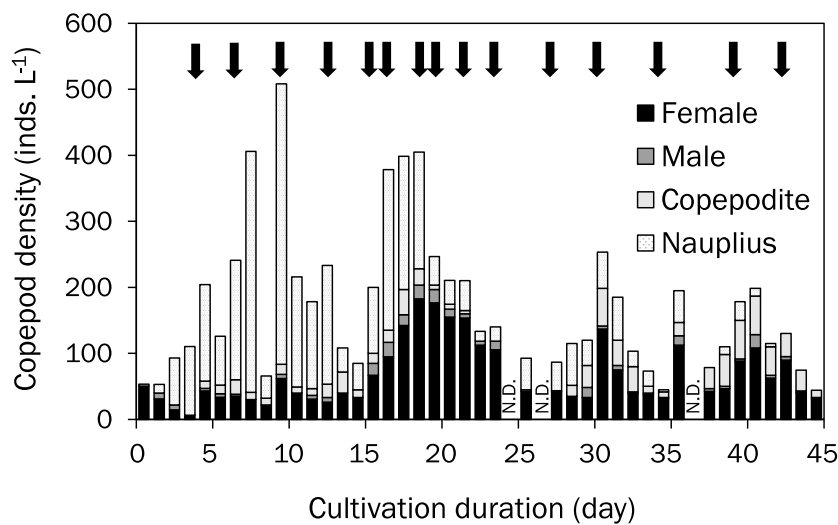


Figure 5. Temporal variations of density in different growth stage of *Oithona oculata* in semi-continuous culture for 45 days using a reproduction tank. The arrows indicate the date of return of matured adults from maturation vessels.

示し、その後培養最終日まで緩やかに減少を続けた (Fig. 7)。推定されたノープリウス幼生の生産数は培養中期にかけて増加し、培養 31 日目に  $1523.0 \text{ nauplii L}^{-1}$  と最大値を示し、培養期間中の平均値は  $450.0 \pm 384.2 \text{ nauplii L}^{-1}$  であった (Fig. 7)。培養期間中に推定されたノープリウス幼生生産数と回収されたノープリウス幼生数の関係について回帰分析を行った結果、回帰式 ( $y = 0.106x, y$ ; 回収されたノープリウス幼生数 ( $\text{nauplii L}^{-1}$ ),  $x$ ; 推定されたノープリウス生産数 ( $\text{nauplii L}^{-1}$ ):  $r^2=0.3676$ ) を得た ( $p<0.01$ , Fig. 8)。

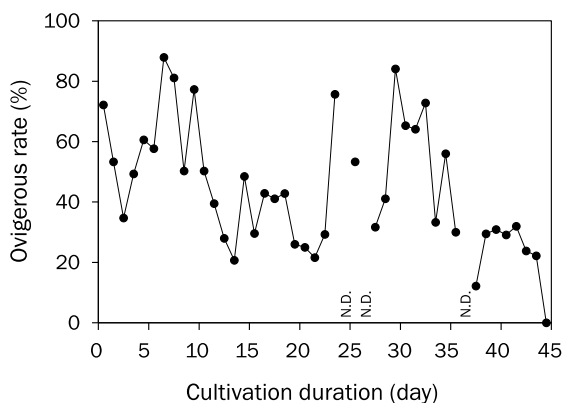


Figure 6. Temporal variation of ovigerous rate of *Oithona oculata* female in semi-continuous culture for 45 days.

#### 4. 考 察

ナイロン製のプランクトンネットを用いた動物プランクトンの採集においては網目の伸長や生物体の圧縮により網目の大きさよりも体サイズが大きなカイアシ類でも網目を通過することが古くから知られている (Vannucci 1968, 上田 1993)。本研究においても  $140 \mu\text{m}$  と

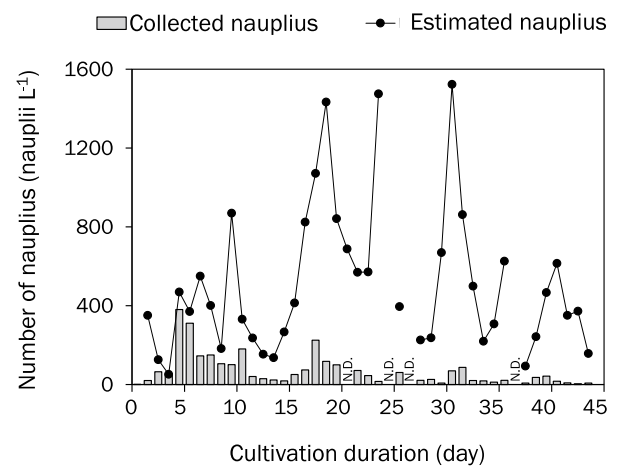


Figure 7. Temporal variations of nauplius number collected and estimated in semi-continuous culture of *Oithona oculata* for 45 days using a reproduction tank.

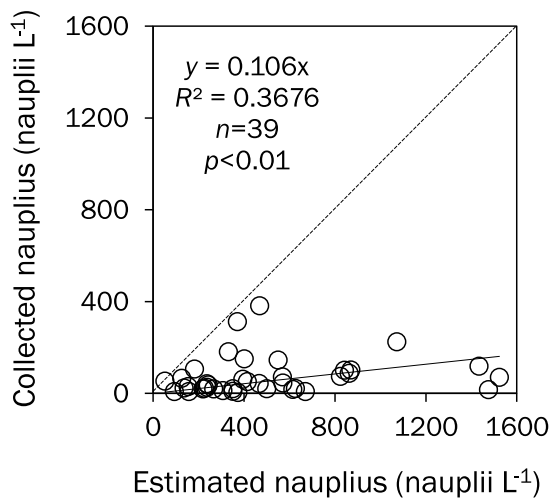


Figure 8. Relationship between estimated number of total produced nauplii and number of collected nauplii. The dotted line in the figure represents a 1:1 relationship.

*Oithona oculata* 成体の体幅 ( $234 \pm 9.8 \mu\text{m}$ ) よりも小さな目合いのメッシュであっても個体の通過が観察された。100  $\mu\text{m}$  の目合いのメッシュでは成体が通過しなかったことから、本種の成体を槽内に留めるためには成体の体幅の40%程度の目合いを選択する必要があることが示唆された。成体と卵・ノープリウス幼生の分離には自由放卵型の *Acartia tonsa* Dana、*A. tsuensis* Ito Tak、*A. steuerei* においては体幅の45–60% (Toledo et al. 2005, Drillet et al. 2015, Sarkisian et al. 2019, 高山 2020)、抱卵型の *Gladioferens imparipes* Thomson (Payne & Rippingale 2001) においては50%の目合いのメッシュが使用されている。そのため、およそ体幅の半分程度がこれら浮遊性種成体を保持する目合いの目安となると考えられるが、対象種の形態等の差異によって最適な目合いも変化すると予測されるため、対象種ごとに目合いの検討実施が推奨される。

ナイロンメッシュと水流を用いたノープリウス幼生の分離において、ノープリウス幼生の積算死亡率は全条件通して0–4%程度であったことから、本研究で検討した流速条件の範囲では流速によるノープリウス幼生の死亡は考慮する必要がないことが明らかとなった。培養槽内の激しい攪拌はカイアシ類の卵生産性や生存

率を低下させることが知られている (Payne & Rippingale 2001)。本研究では検討できなかったより高い流速条件では、更なるノープリウス幼生の回収効率の向上が期待されるが、同時に生産槽内に保持される成体の卵生産や生存率を低下させる可能性がある。今後、更なるノープリウス幼生の回収効率の向上のためには、本研究で検討した流速よりもより高い流速における、ノープリウス幼生の回収効率と生産槽内に保持される成体の卵生産、生残率の関係を明らかにする必要がある。

本研究ではナイロンメッシュと水流を用いることで、抱卵型カイアシ類におけるノープリウス幼生の選択的分離並びに回収技術の確立を試みた。その結果、生産槽内のおよそ90%のノープリウス幼生を水中ポンプを使用することで半自動的に回収することが出来た。また、半連続培養では回収したノープリウス幼生を培養し、成熟後に生産槽に返送することで45日間の運転が行われ4世代の継代が達成された。本研究の半連続培養では生産槽の連続運転中におけるノープリウス幼生の回収効率能を評価するため、生産槽内におけるノープリウス幼生生産数を推定し、回収されたノープリウス幼生数と比較を行った (Fig. 7, 8)。推定されたノープリウス幼生生産数と回収されたノープリウス幼生数は有意な正の相関を示し、推定値に対する回収数の関係から得られた回帰式の傾きは0.1であったことから (Fig. 8)、生産槽内で生産されたノープリウス幼生の10%程度しか回収されなかった可能性が考えられる。半連続培養中における、このような回収効率の顕著な低下の要因として2つの可能性が考えられる。第一に生産槽内に設置したメッシュの目詰まりによるノープリウス幼生の回収効率の低下である。使用後のメッシュにはバイオフィームが形成され、餌料藻類やカイアシ類の遺骸、糞粒等の付着が観察された、長期使用によるメッシュの目詰まりがノープリウス幼生の回収効率低下の一要因かもしれない。但し、培養20日目にメッシュを新たなものに交換したが、培養20日目以降に推定値と回収数の差が縮まる傾向はみられないため (Fig. 7)、メッシュの目詰まりは本事象の主な原因ではない

と考えられる。第2の要因としては成体によるノープリウス幼生の捕食(共食い)である。カイアシ類培養において共食いは収穫量の損失に加え、次期個体群の喪失を招くため培養系へ致命的な影響をあたえると認識されている(Drillet et al. 2014)。肉食性、雑食性を問わず多くの種で共食いをすることが知られており(Hada & Uye 1991, Drillet et al. 2011)、*O. oculata*においてもその存在が確認されているため(高山 未発表)、共食いは本研究における回収効率の顕著な低下の一要因であるかもしれない。本研究と同様の生産槽を用いて自由放卵型の *A. steueri* を培養した際には、卵は沈降によって10分以内に成体から分離されたが生産卵数の15%が共食いによって消費されたと推定されている(高山 2020)。メッシュを生産槽内に設置した場合、自由放卵型の種の場合は被捕食者である卵が捕食者である成体から分離されるまでの時間は卵自体の沈降速度と槽の水深に依存する一方で、抱卵型の種では被捕食者であるノープリウス幼生は水中内を遊泳し捕食者と混在するため、水流を用いた回収操作の頻度に依存する。本研究での回収頻度は1日1回であり、孵化後のノープリウス幼生は最大で24時間共食いの可能性に晒される。従って、1日に複数回の回収操作を行うことで捕食者と被捕食者間の遭遇率を低下させることができると考えられるが、複数回の回収操作が成体の卵生産や生存率へ与える影響や、実用段階では人的労力や電力コストの増加が想定されるため、最適な回数の検討が今後必要である。

## 謝辞

本研究を行うにあたって、試料採集にご協力いただきました横浜国立大学臨海環境センターの皆様へ感謝申し上げます。本研究の一部はJICA/JST SATREPS-COSMOS プロジェクト<JPMJSA1509>、JSPS 科研費<JP19H03035>による助成を受け実施された。

## 引用文献

- Ambler JW, Ferrari FD, Fornshell JA, Buskey EJ (1999) Diel cycles of molting, mating, egg sac production and hatching in the swarm forming cyclopoid copepod *Dioithona oculata*. *Plankton Biol Ecol* 46: 120–127.
- Barroso MV, De Carvalho CVA, Antoniassi R, Cerqueira VR (2013) Use of the copepod *Acartia tonsa* as the first live food for larvae of the fat snook *Centropomus parallelus*. *Aquaculture* 388: 153–158.
- 千原光雄・村野正昭(編)(1997)日本産海洋プランクトン検索図説. 東海大学出版, 東京, 1574 pp.
- Drillet G, Frouël S, Sichlau MH, Jepsen PM, Højgaard JK, Joarder AK, Hansen BW (2011) Status and recommendations on marine copepod cultivation for use as live feed. *Aquaculture* 315: 155–166.
- Drillet G, Maguet R, Mahjoub MS, Roullier F, Fielding MJ (2014) Egg cannibalism in *Acartia tonsa*: effects of stocking density, algal concentration, & egg availability. *Aquaculture* 22: 1295–1306.
- Drillet G, Rais M, Novac A, Jepsen PM, Mahjoub MS, Hansen BW (2015) Total egg harvest by the calanoid copepod *Acartia tonsa* (Dana) in intensive culture-effects of high stocking densities on daily egg harvest and egg quality. *Aquac Res* 46: 3028–3039.
- 荻原篤志(2014)仔魚の餌料生物としての動物プランクトン.“養殖の餌と水一塗の主役たち”(杉田治男編). 恒星社厚生閣, 東京, pp.75–115.
- Hada A, Uye S (1991) Cannibalistic feeding behavior of the brackish water copepod *Sinocalanus tenellus*. *J Plankton Res* 13: 155–166.
- Marcus NH, Wilcox JA (2007) A guide to the meso-scale production of the copepod *Acartia tonsa*. Technical publication - Florida Sea Grant 27.
- Mauchline J (1998) The biology of calanoid copepods. *Advances in Marine Biology*. Academic Press, New York, 709 pp.
- Molejón OG, Alvarez-Lajonchère L (2003) Culture experiments with *Oithona oculata* Farran, 1913 (Copepoda: Cyclopoida), and its advantages as a food for marine fish larvae. *Aquaculture* 219: 471–483.
- Natori N (2018) Ecological role of copepod nauplii in the microbial food web in temperate embayment waters. PhD thesis, Soka University, Japan.

- Paffenhöffer GA (1993) On the ecology of marine cyclopoid copepods (Crustacea, Copepoda). *J Plankton Res* 15: 37–55.
- Payne MF, Rippingale RJ (2001) Intensive cultivation of the calanoid copepod *Gladiferens imparipes*. *Aquaculture* 201: 329–342.
- Rajkumar M, Vasagam KP.K (2006) Suitability of the copepod, *Acartia clausi* as a live feed for seabass larvae (*Lates calcarifer* Bloch): Compared to traditional live-food organisms with special emphasis on the nutritional value. *Aquaculture* 261: 649–658.
- Santhosh B, Anil MK, Anzeer FM, Aneesh KS, Mijo V, Abraham GG, Rani MG, Gopalakrishnan A, Unnikrishnan C (2018) Culture Techniques of Marine Copepods. ICAR-Central Marine Fisheries Research Institute, Kochi, Kerala, India, 144 pp.
- Sarkisian BL, Lemus JT, Apeitos A, Blaylock RB, Sailant EA (2019) An intensive, large-scale batch culture system to produce the calanoid copepod, *Acartia tonsa*. *Aquaculture* 501: 272–278.
- Shields RJ, Bell JG, Luiz FS, Gara B, Bromage NR, Sargent JR (1999) Natural copepods are superior to enriched *Artemia* nauplii as feed for halibut larvae (*Hippoglossus hippoglossus*) in terms of survival, pigmentation and retinal morphology: relation to dietary essential fatty acids. *J Nutr* 129: 1186–1194.
- Støttrup JG, Richardson K, Kirkegaard E, Pihl NJ (1986) The cultivation of *Acartia tonsa* Dana for use as a live food source for marine fish larvae. *Aquaculture* 52: 87–96.
- Støttrup JG (2003) Production and nutritional value of copepods. In: *Live Feeds in Marine Aquaculture* (eds Støttrup JG, Mcevoy LA.). Blackwell Publishing, Oxford, pp. 145–205.
- 高山佳樹 (2020) 海産浮遊性カイアシ類 *Acartia steueri* の集約的培養技術の確立. 創価大学大学院工学研究科学位論文.
- Toledo JD, Golez MS, Doi M, Ohno A (1999) Use of copepod nauplii during early feeding stage of grouper *Epinephelus coioides* larvae. *Fish Sci* 68: 478–483.
- Toledo JD, Golez MS, Ohno A (2005) Studies on the use of copepods in the semi-intensive seed production of grouper *Epinephelus Coiodes*. In: *Copepods in Aquaculture*. (eds Lee CS, O'Bryen PJ, Marcus NH.), Blackwell Publishing, Oxford, pp. 11–24.
- 上田拓史 (1993) 内湾における浮遊性カイアシ類の量的変動に関する研究. 京都大学大学院学位論文.
- Vannucci M (1968) Loss of organisms through the meshes. In: *Zooplankton Sampling*, (eds Tranter DJ, Fraser JH.), The Unesco Press, Paris, pp. 77–86.
- Wilcox JA, Tracy PL, Marcus NH (2006) Improving live feeds: effect of a mixed diet of copepod nauplii (*Acartia tonsa*) and rotifers on the survival and growth of first-feeding larvae of the southern flounder, *Paralichthys lethostigma*. *J World Aquac Soc* 37: 113–120.

# Magnesium-modified biochars for nitrate adsorption and removal in continuous flow system

Joo Yun Qi and Shinjiro Sato\*

*Graduate School of Science and Engineering, Soka University, 1-236 Tangi-machi, Hachioji-shi, Tokyo, 192-8577, JAPAN*

*\* Corresponding author: ssato@soka.ac.jp*

Received April 30 2021, Accepted May 14 2021

**Abstract** Excess utilization of chemical fertilizers in agriculture has caused nitrate pollution to groundwater and watershed, which has raised urgent need for effectively removing nitrate from water. Biochar has been suggested as one of the most promising adsorbent materials to remove nitrate from aqueous solution. However, adsorption capacity of pristine biochar is limited; therefore, several modification methods have been proposed to improve the adsorption capacity of biochar for nitrate. Therefore, the objectives of this study were to evaluate effects of magnesium (Mg)-modified biochars on the adsorption capacity for nitrate and removal efficiency as the sole filter media in a continuous flow system (biofilter). Pristine biochars were pyrolyzed at 550°C from oak sawdust (OS) and water hyacinth (WH), and Mg-modified biochars were produced by soaking feedstock in MgCl<sub>2</sub> solution followed by pyrolysis at the same temperature as the pristine biochars (OS/Mg and WH/Mg, respectively). Mg-modified biochars showed 84%–89% greater adsorption capacity for nitrate than pristine biochars. The highest adsorption capacity for nitrate was 19.1 mg g<sup>-1</sup> obtained from WH/Mg biochar. Flow direction in the biofilter did not affect nitrate removal efficiency of biochar, but slower flow speed was more efficient because nitrate had more retention time to find adsorption sites on biochar surface. When used in a continuous flow system, the total amount of nitrate removed by WH/Mg biochar in the biofilter represented 27%–30% of the maximum adsorption capacity of the biochar depending on flow direction and speed. Optimization of biofilter structure (size and packing layer) and flow mechanics (flow direction and speed) for the maximum nitrate removal by biochar needs to be considered when used in the continuous flow system.

**Keywords:** biochar; biofilter; Langmuir; nitrate; water hyacinth

## 1. Introduction

At present, it is common to use chemical and animal manure fertilizers in agriculture to provide sufficient nutrients and organic matter to soils, so as to improve soil fertility and crop productivity. However, chemical fertilizers are one of the major sources

of nitrate (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) pollution in groundwater, and subsequently watersheds. Nitrate from the chemical fertilizers are highly soluble in water and cannot bind well with soil particles (Zhang et al. 2012). As a result, it can enter groundwater and surface water easily with rainfall. Further, high concentration of nitrate in drinking water can give rise to harmful

effects on human health, especially in infants, for example causing blue baby syndrome (Hafshejani et al. 2016).

Biofiltration or bioretention system is one of the most promising water recycling and reuseable systems. These systems have been widely utilized in developing countries (Guan et al. 2020). Moreover, the systems are chemical-free and passive methods for capturing and treating wastewater at source, which have proven to be effective in removing heavy metals, hydrocarbon, suspended solids, and phosphorus (Bratieres et al. 2008; Jay et al. 2019; Mahmoud et al. 2019). However, a number of studies have reported that the removal performance for nitrate was often limited due to low anion exchange capacity of soils (Hsieh & Davis, 2005; Davis, 2008; Line & Hunt, 2009). Therefore, for nitrate removal, carbon amendments such as crop residues, woodchips, sawdust, and biochars have been proposed (Shrestha et al. 2018; Jia et al. 2019). However, utilization of biochar as the sole biofilter to remove nitrate from water has not been fully investigated.

Biochar is a porous, carbon-rich solid product derived from thermal conversion of biomass under limited oxygen or anaerobic conditions (Inyang & Dickenson, 2015). Biochars derived from agricultural wastes and woody materials have shown effectiveness at removing nitrate (Zhang et al. 2012). Research trends about utilization of biochars have shifted from agriculture- and soil science-related fields such as organic fertilizer and soil amendment to environmental applications such as phytoremediation agent to fix heavy metals in soils and adsorbent to remove impurities from water. However, efficiency of biochars in the environmental application largely depends on adsorption capacity of biochar for adsorbate, and is often restricted due to its limited

adsorption capacity of pristine biochar (Ahmed et al. 2016).

The limited adsorption capacity of pristine biochars can be overcome by synthesizing nano-composite biochars (called as functional or enhanced biochars) to improve physicochemical properties of biochars. Conventionally, the nano-composite biochars can be classified into three categories: functional nanoparticles-coated biochar, magnetic biochar, and metal-oxide composite biochars (Tan et al. 2016). The metal-oxide composite biochar can be produced by pretreating biomass with chemical reagent before pyrolysis. In general, metal salts are chosen as the chemical reagent for the pretreatment of biomass. The metal ions may attach onto the surface or enter into the interior of biomass during metal-salt solution biomass soaking. The metal ions then transform into nano metal-oxide, and subsequently the biomass impregnated with metal ions become nano-composite biochars after pyrolysis (Yao et al. 2013). Among them, magnesium (Mg)-composite biochars have shown excellent adsorption capacity to remove phosphate and nitrate from water (Yao et al. 2011). However, the maximum adsorption capacity and dynamics in a continuous flow system using nano metal-oxide composite biochars for nitrate removal have not been fully examined to date.

Water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) is among the most noxious, dreadful, and invasive floating aquatic weeds in the world producing 140 million daughter plants annually and extending to 1.4 km<sup>2</sup> of cover water area with 28,000 t of fresh biomass (Ruan et al. 2016). The plant brings about serious environmental and socioeconomic problems, including ecological imbalance in lakes and clogging in navigation and irrigation systems (Gaurav et al. 2020). Attempts using chemical and mechanical

means have been made to remove water hyacinth from natural water bodies, which eventually are often to no avail. By contrast, in recent decades, there are a number of studies reported that the plant has demonstrated its potential for the phytoremediation of nitrogen, fecal bacteria, suspended solids, heavy metals, dyes, and organic matter in contaminated wastewaters and surface waters (Rezania et al. 2015). However, little research has focused on utilizing water hyacinth as a feedstock to produce biochar in removal of nitrate from water bodies.

Therefore, the objectives of this study were to evaluate (1) the maximum adsorption capacity of Mg-modified biochar for nitrate and (2) nitrate removal efficiency of Mg-modified biochar as the sole filter media in biofilter in continuous flow system.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Preparation and analyses of biochars

Oak sawdust (*Quercus*) and water hyacinth were used as feedstock and dried in an oven at 95°C prior to pyrolysis. Pristine biochars (OS and WH, respectively) were obtained from pyrolysis in a covered ceramic crucible under oxygen-limiting condition in a muffle furnace with increasing rate of 5°C min<sup>-1</sup> and retention time of 2 h at the maximum temperature of 550°C. To synthesize Mg-modified biochars (OS/Mg and WH/Mg, respectively), firstly 30.5 g of MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O was dissolved in 300 mL of ultrapure water, into which 10 g of each feedstock was soaked for 4 h. The mixture of biomass and MgCl<sub>2</sub> were then oven-dried at 95°C to remove the water. The Mg-modified biochars were obtained from the same pyrolysis procedure as the pristine biochars. After cooling, the biochars were shaken with ultrapure water overnight at 160 strokes min<sup>-1</sup> to wash away the impurities,

filtered with Whatman No.1 filter paper, dried in the oven at 95°C, grounded and sieved to ≤ 500 μm and 500–2000 μm for adsorption and biofilter experiments, respectively.

Physicochemical properties of the biochars were analyzed for pH in a 1:10 biochar:deionised water (w/v) suspension (Singh et al. 2017); electrical conductivity in a 1:20 biochar:deionized water (w/v) suspension (Singh et al. 2017); cation exchange capacity (Graber et al. 2017); total C (TC), H, and N (TN) by Dumas dry oxidation method (Dumas 1930); and fixed C, volatile matter, and ash contents by thermal gravimetric analysis (Antal et al. 2000).

Specific surface area and pore size distribution of the biochars were measured by N gas adsorption at 77 K using Advanced Systems Analysis Program (ASAP 2010, Micromeritics). The Brunauer Emmett Teller (BET) method (Brunauer et al. 1938) was used to estimate the surface areas ( $S_{BET}$ ). Total pore volumes ( $V_{total}$ ) was estimated from the amount of N adsorbed at a relative pressure. Micropore volume ( $V_{mic}$ ) was estimated by the t-plot method, and macropore and mesopore volumes ( $V_{macro+meso}$ ) were estimated by difference of  $V_{total}$  and  $V_{mic}$ . After drying at 105°C for 24h, the biochar surface was observed by using Scanning Electron Microscopy (SEM) for all biochar samples before nitrate adsorption.

Fourier transform infrared (FTIR) spectra of the biochars were conducted by an FTIR instrument (IRPrestige-21 FTIR-8400S, Shimadzu) to analyze the surface functional groups for all biochar samples before nitrate adsorption, and only WH and WH/Mg biochar samples after nitrate adsorption (OS and OS/Mg biochar samples were not recovered after nitrate adsorption experiment).

## 2.2. Biochar adsorption kinetic and isotherm for nitrate

Nitrate solution for the adsorption experiments was prepared by using  $\text{NaNO}_3$ . For the adsorption kinetic experiment, the initial solution pH was adjusted to 2.0 with 1.0 M HCl or 0.05 M NaOH. 50 mg of biochar were added into a 50 mL centrifuge tube with 25 mL of  $10 \text{ mg L}^{-1}$  of nitrate solution. The tubes were shaken in a horizontal shaker at  $160 \text{ strokes min}^{-1}$  at room temperature with different shaking time intervals of 15, 30, 45, 60, 120, 240, and 1440 min. After each shaking time, the mixtures were filtered with Whatman No.1 filter paper followed by  $0.45 \mu\text{m}$  pore size nylon membrane. The concentration of nitrate in the filtrate was measured using an auto-analyzer, and the adsorbed nitrate was calculated by difference from the initial concentration.

Adsorption kinetic results were described as the following pseudo-first order (Eq. 1) and pseudo-second order rate models (Eq. 2).

$$q_t = q_e(1 - e^{-k_1 t}) \quad (1)$$

$$q_t = \frac{q_e^2 k_2 t}{1 + q_e k_2 t} \quad (2)$$

where  $q_t$  ( $\text{mg g}^{-1}$ ) and  $q_e$  ( $\text{mg g}^{-1}$ ) were the amount of nitrate adsorbed by biochar at  $t$  shaking time and at equilibrium, respectively;  $t$  (min) was the shaking time; and  $k_1$  ( $\text{min}^{-1}$ ) and  $k_2$  ( $\text{g mg}^{-1} \text{min}^{-1}$ ) were the pseudo first and pseudo second order rate constants, respectively. The initial adsorption rate  $h$  ( $\text{mg g}^{-1} \text{min}^{-1}$ ) was calculated by using the pseudo-second order kinetic parameters (Eq. 3).

$$h = q_e^2 k_2 \quad (3)$$

The initial concentration of nitrate was prepared as 0, 10, 20, 50, 80, 100, 200, and  $300 \text{ mg L}^{-1}$  for the adsorp-

tion isotherm experiment and adjusted pH to 2.0 with 1.0 M HCl or 0.05 M NaOH. 50 mg of biochar were added into a 50 mL centrifuge tube with 25 mL of each nitrate concentration solution. The tubes were shaken in the horizontal shaker at  $160 \text{ strokes min}^{-1}$  at room temperature for 1440 min. After shaking, the mixtures were filtered with Whatman No.1 filter paper followed by  $0.45 \mu\text{m}$  pore size nylon membrane. The concentration of nitrate in the filtrate was measured using the auto-analyzer, and the adsorbed nitrate was calculated by difference from the initial concentration.

Adsorption isotherm results were fit with the following Langmuir (Eq. 4) and Freundlich adsorption isotherm models (Eq. 5).

$$q_e = \frac{K_L C_e q_m}{1 + K_L C_e} \quad (4)$$

$$q_e = K_F \times C_e^{\frac{1}{n}} \quad (5)$$

where  $q_e$  ( $\text{mg g}^{-1}$ ) was the amount of nitrate adsorbed by biochar at equilibrium;  $C_e$  ( $\text{mg L}^{-1}$ ) was the nitrate concentration in the solution at equilibrium;  $q_m$  ( $\text{mg g}^{-1}$ ) was the maximum adsorption capacity;  $K_L$  ( $\text{L mg}^{-1}$ ) and  $K_F$  were the Langmuir and Freundlich constant related to adsorption capacity, respectively; and  $n$  was the dimensionless adsorption constant related to the surface heterogeneity.

## 2.3. Biofilter removal of nitrate in continuous flow system

Polyvinyl chloride pipes (1.5 cm internal diameter and 12 cm length) were connected with rubber stoppers to build a model biofilter (Fig. 1). Glass wool was inserted at both ends (3 cm) of a biofilter with 1.382 g of biochar sample inside (5 cm) to prevent the biochar from washing out. The biofilters were then tapped by hand after each layer was poured to ensure no stratification



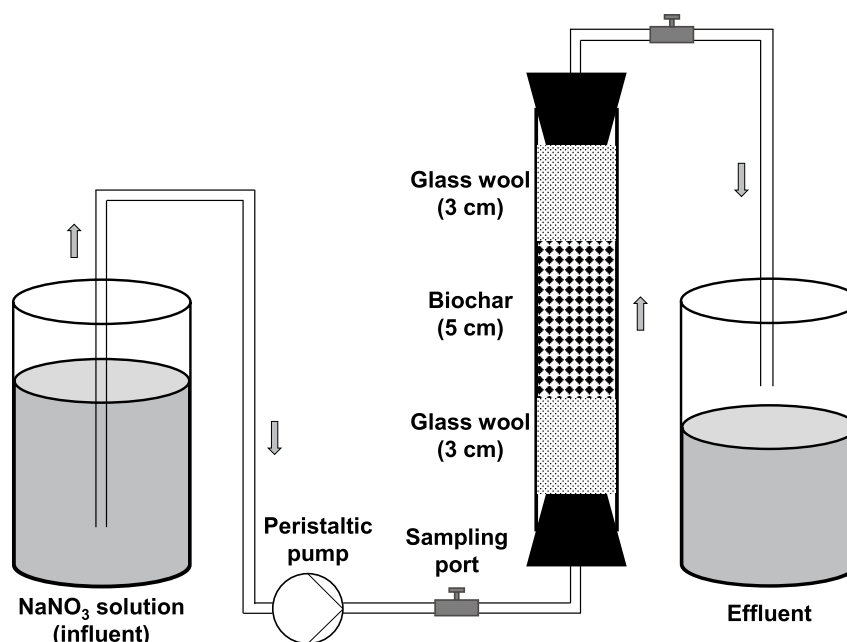


Figure 1. Schematic diagram of biofilter flow system for nitrate removal (upward flow configuration).

in the packed media. After packing, 300 mL ultrapure water was fed into all the biofilters (arranged in an upward flow configuration) using peristaltic pump with the speed of  $50 \text{ mL h}^{-1}$  for 6 h to saturate the biofilter with water and remove air space inside the biofilter.

WH/Mg was the only biochar being used in the biofilter experiment for nitrate removal. The experiment was carried out with four different treatments in two different flow directions (upward and downward) and two different flow speeds ( $50$  and  $100 \text{ mL h}^{-1}$ ) to assess the effect of biochar removal capacity. A  $5.83 \text{ mg L}^{-1}$  nitrate solution made from  $\text{NaNO}_3$  was pumped through

the biofilter for 60 h. Sampling time was 1, 2, 4, 8, 16, 24, 36, 48, and 60 h, and at each sampling time 20 mL was collected from influent before the biofilter ( $C_i$ ) and effluent after the biofilter ( $C_e$ ) from sampling ports. The pH of the solution was measured immediately after sampling, and nitrate concentration was then analyzed by using the auto-analyzer.

## 2.4. Statistical analyses

Statistical software STATISTICA 6.1 (StatSoft.Inc., Tulsa, OK, USA) was used to carry out the statistical analyses. Treatment effects were analyzed by one-way

Table 1. Physicochemical properties of biochars used in this study.

Biochar <sup>†</sup>	pH	Electric conductivity $\mu\text{S cm}^{-1}$	Cation exchange capacity $\text{cmol}_c \text{ kg}^{-1}$	Carbon %	Hydrogen %	Nitrogen %	Fixed carbon %	Volatile matter %	Ash %
OS	7.88	320	17.3	77.3	1.81	0.180	76.5	21.6	1.88
OS/Mg	9.78	287	11.3	75.1	1.30	0.000	71.8	17.1	11.2
WH	9.58	1063	24.8	58.0	1.02	2.92	51.4	28.3	20.3
WH/Mg	9.66	552	25.3	59.6	1.24	2.61	58.5	22.6	18.9

<sup>†</sup> Biochars from oak sawdust (OS), water hyacinth (WH), Mg-modified OS (OS/Mg), and Mg-modified WH (WH/Mg) pyrolyzed at  $550^\circ\text{C}$

Table 2 Surface areas and pore properties of biochars used in this study.

Biochar <sup>†</sup>	$S_{BET}$ <sup>‡</sup>	$S_{micro}$ <sup>‡</sup>	$S_{external}$ <sup>‡</sup>	$V_{total}$ <sup>¶</sup>	$V_{micro}$ <sup>¶</sup>	$V_{macro+meso}$ <sup>¶</sup>
	m <sup>2</sup> g <sup>-1</sup>	m <sup>2</sup> g <sup>-1</sup>	m <sup>2</sup> g <sup>-1</sup>	cm <sup>3</sup> g <sup>-1</sup>	cm <sup>3</sup> g <sup>-1</sup>	cm <sup>3</sup> g <sup>-1</sup>
OS	323	249	73.9	0.163	0.115	0.0481
OS/Mg	270	195	75.9	0.196	0.089	0.107
WH	79.8	55.4	24.3	0.0564	0.025	0.0314
WH/Mg	276	177	98.0	0.204	0.204	0.122

<sup>†</sup> Biochars from oak sawdust (OS), water hyacinth (WH), Mg-modified OS (OS/Mg), and Mg-modified WH (WH/Mg) pyrolyzed at 550°C

<sup>‡</sup> Specific surface area (S); total area (BET) = (micro area) + (external area)

<sup>¶</sup> Pore volume (V); total pore volume = (micro pore) + (macro+meso pores)

analysis of variance. A Tukey honestly significant difference analysis was performed for multiple comparisons of the treatment effects. Statistical significances were determined at  $p < 0.05$ .

### 3. Results

#### 3.1. Biochar characterization

All biochars used in this study showed wide alkaline range (7.88–9.78; Table 1). Pristine WH biochar resulted in more alkaline pH than pristine OS biochar. Mg-modification caused more alkalinity after pyrolysis regardless of feedstock. OS feedstock (OS and OS/Mg) resulted in more TC and less TN, as well as more fixed C and less ash than WH feedstock (WH and WH/Mg). Mg-modification caused more ash content after pyrolysis regardless of feedstock.

OS and OS/Mg exhibited large total specific surface areas (323 and 270 m<sup>2</sup> g<sup>-1</sup>, respectively), of which 72%–77% were micro surface areas (249 and 195 m<sup>2</sup> g<sup>-1</sup>, respectively; Table 2). Pristine WH biochar showed much smaller  $S_{BET}$  and  $S_{micro}$  (79.8 and 55.4 m<sup>2</sup> g<sup>-1</sup>, respectively) than pristine OS biochar, but Mg-modification caused increase to both areas (276 and 177 m<sup>2</sup> g<sup>-1</sup>, respectively).

SEM surface images of the biochars showed mor-

phological structures (Fig. 2). Both OS (Fig. 2a) and OS/Mg (Fig. 2b) possessed many clear porous structures, and it appeared that the pore size of OS/Mg was slightly larger than that of OS. On the other hand, the porous structures were limited in WH (Fig. 2c) and WH/Mg (Fig. 2d).

FTIR spectrum of WH and WH/Mg before and after nitrate adsorption revealed that a peak around 1734 cm<sup>-1</sup> was possibly attributed to carbonyl functional groups C=O stretching vibration (Fig. 3), which may be responsible for nitrate adsorption site (Abdel-Ghani et al. 2016). A peak at around 1493 cm<sup>-1</sup> in the spectra shows C=C groups in the biochars before and after nitrate adsorption (Kim et al. 2013). In addition, peaks around 881 cm<sup>-1</sup> found in WH/Mg before and after adsorption should correspond to C–H stretching (Chen et al. 2015). A peak around 1636 cm<sup>-1</sup> in OS and WH before nitrate adsorption (Fig. 3a) can be attributed to O–H stretching vibration of hydrogen-bonded groups and water molecules (Jung et al. 2015). Mg–O bonds (711 cm<sup>-1</sup>) were present in the biochars before and after adsorption (Richardson & Braterman 2007).

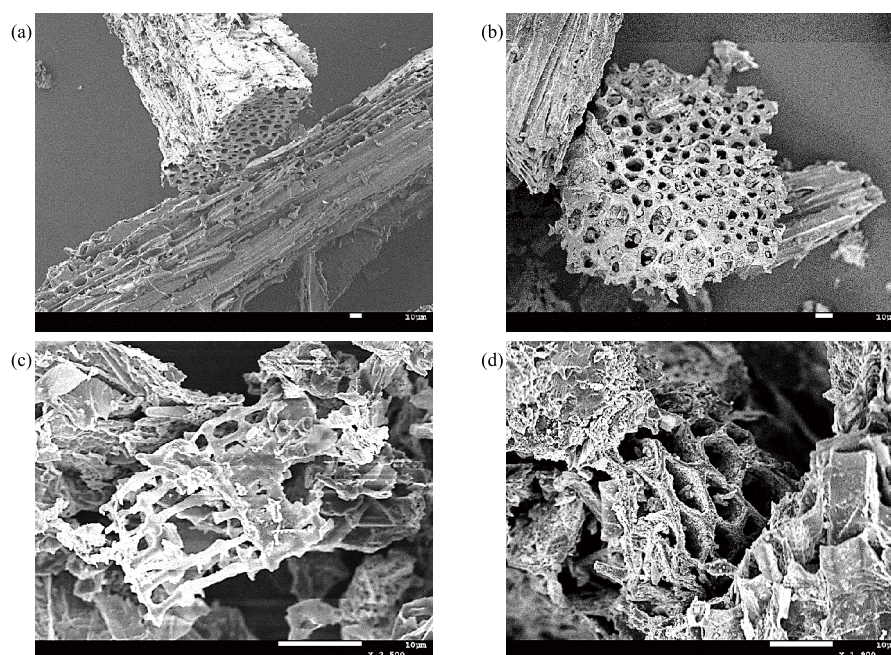


Figure 2. SEM surface image of (a) OS, (b) OS/Mg, (c) WH and (d) WH/Mg biochars.

### 3.2. Biochar adsorption kinetic and isotherm for nitrate

All biochars adsorbed nitrate quickly until 120 min of shaking, and reached quasi-equilibria with nitrate after 240 min, followed by full equilibria by 1440 min (Fig. 4). WH biochars showed higher adsorption capacity than OS biochars regardless of Mg-modification, and Mg-modified biochars showed more adsorption capacity than pristine biochars regardless of feedstock. The highest nitrate adsorption capacity was obtained from WH/Mg ( $q_{e\ exp} = 9.04\ \text{mg g}^{-1}$ ; Table 3) at 1440 min shaking time.

Nitrate adsorption data of all biochars were better fit to the pseudo-second order kinetic model ( $R^2 = 0.956\text{--}0.999$ ) compared to the pseudo-first order kinetic model ( $R^2 = 0.211\text{--}0.542$ ; Table 3). The highest nitrate adsorption capacity calculated by the pseudo-second order model was obtained from WH/Mg ( $q_{e\ 2} = 9.23\ \text{mg g}^{-1}$ ; Table 3). The initial adsorption rate  $h$  was 3.4–6.2 times higher for WH biochars than OS biochars, and the highest  $h$  was obtained from WH/Mg ( $0.278\ \text{mg g}^{-1}\text{min}^{-1}$ ; Table 3).

All biochars exhibited clear adsorption isotherms for nitrate (Fig. 5). The adsorption equilibrium was

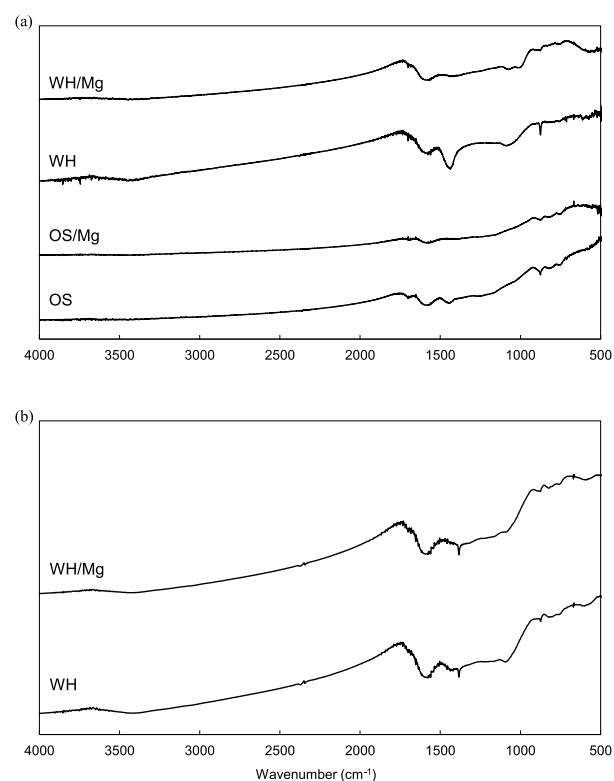


Figure 3. FTIR spectra of (a) OS, OS/Mg, WH, and WH/Mg biochars before nitrate adsorption and (b) WH and WH/Mg biochars after nitrate adsorption.

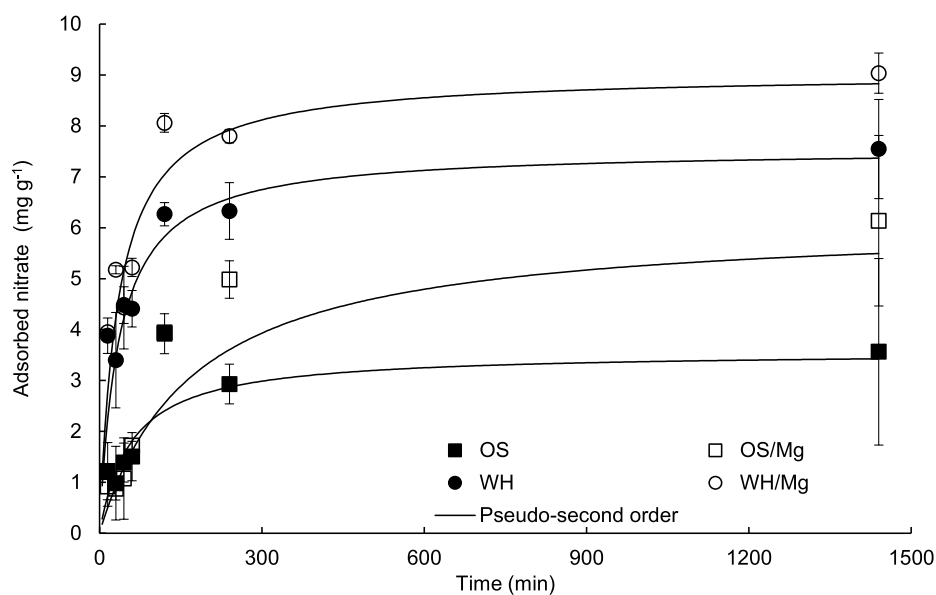


Figure 4. Adsorption kinetic of OS, OS/Mg, WH, and WH/Mg biochars for nitrate. Solid lines represent approximation by pseudo-second order kinetic model.

achieved at a concentration of around  $200 \text{ mg L}^{-1}$  for all biochars. The highest adsorption capacity was obtained from WH/Mg, whereas OS showed the lowest.

Both Langmuir and Freundlich adsorption isotherm models fit well with nitrate adsorption data of all biochars ( $R^2 = 0.893\text{--}0.983$  and  $0.954\text{--}0.991$ , respectively; Table 4). Comparing two models, the Freundlich model fit better with nitrate adsorption by OS/Mg, WH, and WH/Mg, while the Langmuir fit better with that by OS. The highest maximum adsorption capacity calculated by the Langmuir model ( $q_m$ ) was  $19.1 \text{ mg g}^{-1}$  for WH/Mg,

followed by  $10.4 \text{ mg g}^{-1}$  for WH,  $9.68 \text{ mg g}^{-1}$  for OS/Mg, and the lowest value of  $5.11 \text{ mg g}^{-1}$  for OS.

### 3.3. Biofilter removal of nitrate in continuous flow system

For both upward and downward flow directions, relative nitrate concentration in  $C_e$  to  $C_i$  ( $C_e/C_i$ ) was almost 0 for the first 4 h regardless of flow speed ( $50$  or  $100 \text{ mL h}^{-1}$ ; Fig. 6). However,  $C_e/C_i$  values quickly increased to  $0.358\text{--}0.437$  for 8 h with  $100 \text{ mL h}^{-1}$ , while remaining at 0 with  $50 \text{ mL h}^{-1}$ , regardless of the flow direction. Then,

Table 3. Pseudo-first order and pseudo-second order kinetic model parameters for nitrate adsorption kinetic.

Biochar <sup>†</sup>	Pseudo-first order				Pseudo-second order			
	$q_{e \text{ exp}}^{\ddagger}$	$k_1$	$q_{e1}$	$R^2$	$k_2$	$q_{e2}$	$h$	$R^2$
	$\text{mg g}^{-1}$	$\times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$	$\text{mg g}^{-1}$		$\times 10^{-3} \text{ g mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$	$\text{mg g}^{-1}$	$\text{mg g}^{-1} \text{ min}^{-1}$	
OS	3.56	0.486	1.72	0.211	4.83	3.71	0.0665	0.956
OS/Mg	6.14	1.05	3.82	0.542	0.967	6.83	0.0451	0.982
WH	7.55	0.781	2.70	0.453	3.74	7.72	0.223	0.999
WH/Mg	9.04	0.882	3.03	0.363	3.26	9.23	0.278	0.999

<sup>†</sup> Biochars from oak sawdust (OS), water hyacinth (WH), Mg-modified OS (OS/Mg), and Mg-modified WH (WH/Mg) pyrolyzed at  $550^\circ\text{C}$

<sup>‡</sup> The maximum adsorption capacity from the experiment at shaking time of 1440 min

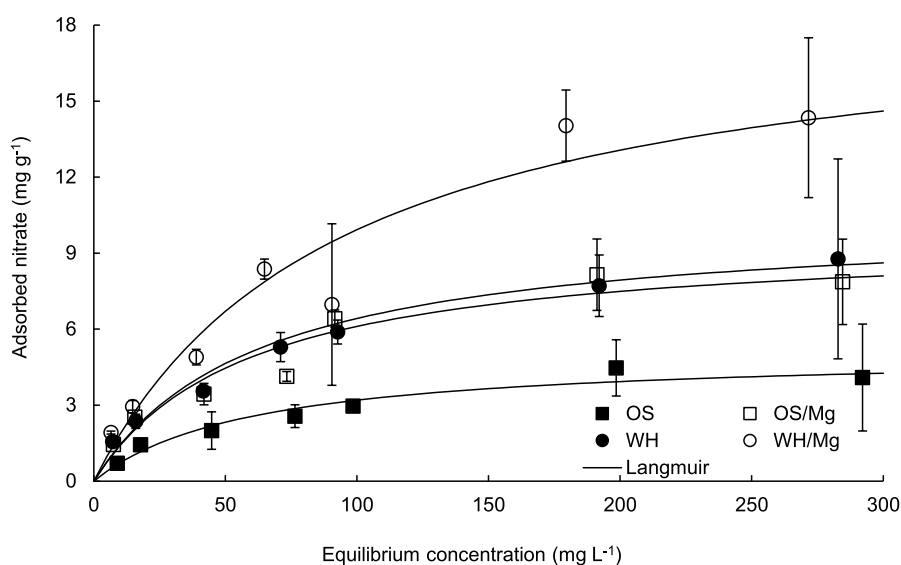


Figure 5. Adsorption isotherms of OS, OS/Mg, WH, and WH/Mg biochars for nitrate. Solid lines represent approximation by Langmuir adsorption isotherm model.

$C_e/C_i$  values reached 0.978–1.00 for 36 h with 100 mL h<sup>-1</sup>, while continuing to increase or remaining relatively constant with 50 mL h<sup>-1</sup> even after 36 h, regardless of flow direction.

The final pH of the effluent with upward flow direction showed similar trends with time passing for both flow speeds (Fig. 6a). The final pH was around 9.0 in the beginning, quickly dropped to

2.3–2.5 for 8 h, and remained relatively constant for the rest of time. However, for the downward flow direction biofilter, the final pH quickly dropped from 9.0 to 2.4 for 4 h and remained relatively constant for the rest of time (Fig. 6b). The flow speed appeared to have no effects on pH change over time for both flow directions.

Table 4. Langmuir and Freundlich adsorption isotherm model parameters for nitrate adsorption isotherm.

Biochar <sup>†</sup>	Langmuir model			Freundlich model		
	$K_L$	$q_m$	$R^2$	$K_F$	$n$	$R^2$
	L mg <sup>-1</sup>	mg g <sup>-1</sup>		mg <sup>1-(1/n)</sup> L <sup>1/n</sup> g <sup>-1</sup>		
OS	0.0167	5.11	0.972	0.285	2.00	0.954
OS/Mg	0.0170	9.68	0.953	0.607	2.10	0.956
WH	0.0161	10.4	0.983	0.621	2.08	0.991
WH/Mg	0.0107	19.1	0.893	0.659	1.77	0.972

<sup>†</sup> Biochars from oak sawdust (OS), water hyacinth (WH), Mg-modified OS (OS/Mg), and Mg-modified WH (WH/Mg) pyrolyzed at 550°C

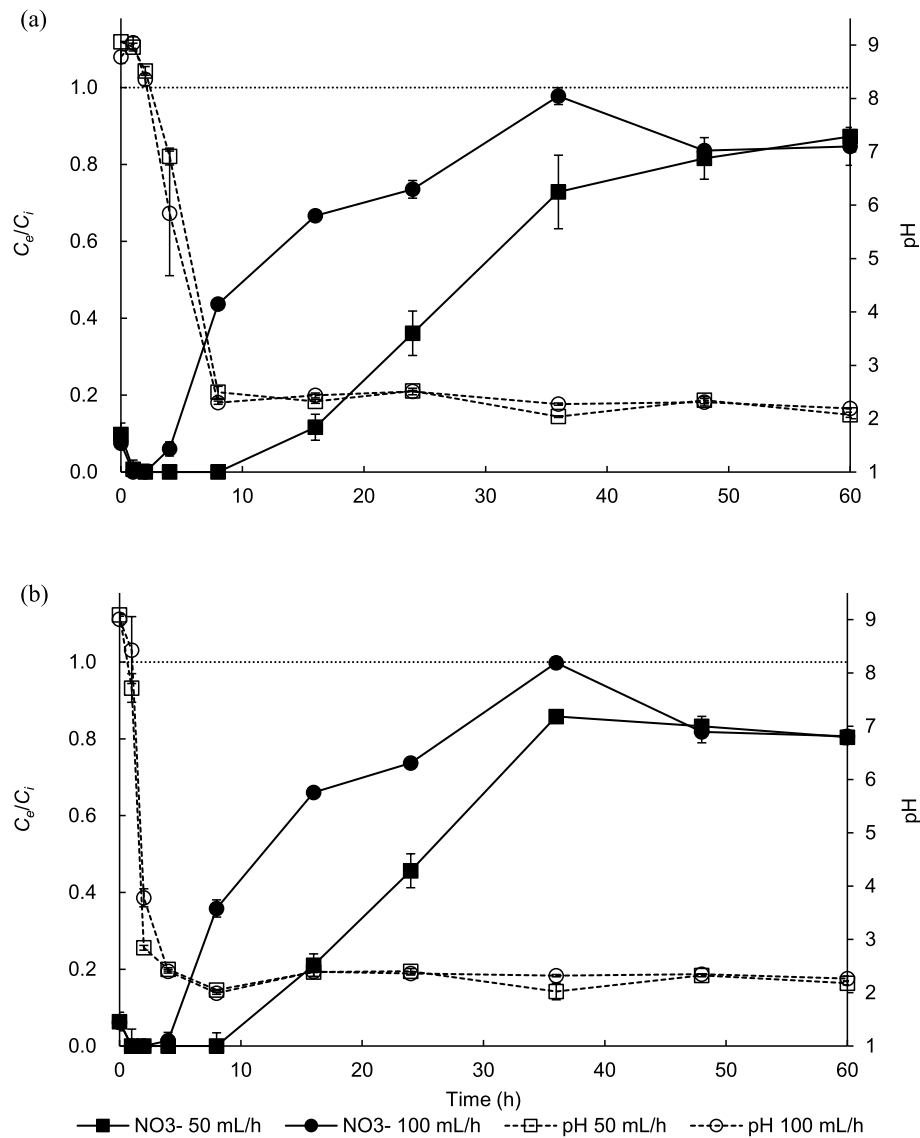


Figure 6. Relative nitrate concentration in effluent after the biofilter ( $C_e$ ) to influent before the biofilter ( $C_i$ ) (breakthrough curve) and effluent solution pH with (a) upward and (b) downward flow directions. A dotted line represents adsorption saturation point when  $C_e/C_i = 1$ .

## 4. Discussion

### 4.1. Nitrate adsorption kinetics

Adsorption kinetics can provide essential parameters about the reaction pathway and mechanism of the adsorption process (Xu et al. 2013). Better fit of biochars' nitrate adsorption results with the pseudo second-order than the pseudo first-order model (Table 3) can indicate that adsorption was governed by physicochemical com-

posite reactions involving external liquid film diffusion, surface adsorption, and intraparticle diffusion (Tümsek & Avcı, 2013). The maximum adsorption capacity of the biochars calculated by the pseudo second-order model ( $q_{e2} = 3.71\text{--}9.23 \text{ mg g}^{-1}$ ) were almost same as those from the experiment at 1440 min shaking time ( $q_{e\text{exp}} = 3.56\text{--}9.04 \text{ mg g}^{-1}$ ), and highest  $q_{e2}$  was obtained from WH/Mg. The initial adsorption rate  $h$  values calculated by the pseudo-second order model showed better initial

performance by WH biochars compared to OS biochars, and the highest initial adsorption was obtained from WH/Mg. These results confirmed that Mg-modification particularly for WH biochar was effective to improve adsorption capacity of pristine biochar for nitrate. However, the optimum kinetic model for nitrate by biochars may be different depending on biochar properties such as biochar feedstock, production temperatures, and modification procedures if any. For example, the optimum kinetic model was pseudo-first order, pseudo-second order, and Elovich models for date-palm Mg/Al-modified biochar (Alagha et al. 2020), palm leaf residues non-modified biochar (Zare & Ghasemi-Fasaei 2019), and corncob FeCl<sub>3</sub>-modified biochar (Long et al. 2019), respectively. Therefore, more detailed investigations are needed for better understanding on effects of different physicochemical properties of feedstock and/or production procedures of biochars on physicochemical mechanism for nitrate adsorption by biochars.

#### 4.2. Nitrate adsorption isotherms

The adsorption isotherms of different biochars for nitrate showed better fitting results with the Freundlich than the Langmuir adsorption isotherm model except for OS biochar (Table 4), indicating reversible adsorption process where the biochar surface containing adsorption sites was heterogeneous and each site could hold several molecules in multilayers (Keränen et al. 2015; Zhen et al. 2015). Comparing the maximum adsorption capacity calculated by the Langmuir model, Mg-modification of biochars resulted in 1.89 and 1.84 times higher capacity than pristine biochars for OS and WH, respectively (Table 4). For nitrate adsorption, the mechanism may be controlled by multiple interactions such as fixation by ionic bonding with exchangeable cations from MgCl<sub>2</sub> and electrostatic attraction (Hale et al. 2013), which could have hap-

pened with Mg-modified biochars. On the other hand, an assumption of the Langmuir adsorption isotherm model is that the surface containing the adsorption sites is homogeneous and that each site can hold at most one molecule in thickness, also known as monolayer adsorption (Keränen et al. 2015). Therefore, the monolayer adsorption of nitrate on homogenous surface could have occurred for OS biochar without Mg-modification, thus reducing the maximum adsorption capacity.

The maximum adsorption capacity of OS biochar in this study (5.11 mg g<sup>-1</sup>; Table 4) was comparable with that of OS biochar in other studies (8.94 mg g<sup>-1</sup>; Wang et al. 2015). As seen in this study, improvement of the maximum adsorption capacity by Mg-modification was also seen in other studies. For example, a peanut shell biochar modified by Mg increased nitrate adsorption capacity to 94 mg g<sup>-1</sup> (Zhang et al. 2012). However, when OS was modified by LaCl<sub>3</sub>, the maximum adsorption capacity increased up to 100 mg g<sup>-1</sup> (Wang et al. 2015). Therefore, the adsorption capacity of biochar for nitrate largely depends on types of feedstock, pyrolysis conditions, and most importantly modification procedures. The highest maximum adsorption capacity of biochar for nitrate found in the most recent literature may be 157 mg g<sup>-1</sup> when apple branch biochar was modified by CO<sub>2</sub>-activation plus Mg/Al-layered double hydroxides-modification (Wang et al. 2021).

#### 4.3. Nitrate removal by biofilter

Relative nitrate concentration in  $C_e$  to  $C_i$  ( $C_e/C_i$ ) represents how much nitrate was removed from solution (or adsorbed by biochar) in the biofilter, and shows 1 (one) when the biochar was saturated with nitrate (or reached the maximum adsorption capacity). The breakthrough curve of the biochar for nitrate showed that flow direction (upward or downward) did not seem

Table 5. Total nitrate removed by biofilter and relative percentages to the maximum adsorption capacity of biochar.

Flow direction	Flow speed	Total nitrate flowed <sup>†</sup>	Total nitrate removed <sup>‡</sup>	Removed by biofilter <sup>*</sup>	Biochar saturated by nitrate <sup>  </sup>
	mL h <sup>-1</sup>	mg	mg	%	%
Upward	50	17.5	7.92	45%	30%
	100	35.0	8.74	25%	33%
Downward	50	17.5	7.20	41%	27%
	100	35.0	9.26	26%	35%

<sup>†</sup> Total amounts of nitrate pumped through the biofilter calculated as (flow speed, 50 mL h<sup>-1</sup> × flow time, 60 h × influent nitrate concentration, 5.83 mg L<sup>-1</sup> × 10<sup>-3</sup>)

<sup>‡</sup> Total amounts of nitrate removed by biofilter calculated as difference of total nitrate flowed and total nitrate in effluent sampled after the biofilter

<sup>\*</sup> Percentages of total nitrate removed to total nitrate flowed calculated as (total nitrate removed / total nitrate flowed × 100%)

<sup>||</sup> Percentages of total nitrate removed to the maximum adsorption capacity of biochar for nitrate calculated as (total nitrate removed / the maximum adsorption capacity of biochar × 100%) where the maximum adsorption capacity of biochar was calculated as (the maximum adsorption capacity of WH/Mg biochar, 19.1 mg g<sup>-1</sup>; Table 4 × biochar weight in the biofilter, 1.382 g)

to have significant effects on nitrate removal efficiency of biochar in the biofilter (Fig. 6). However, flow speed (50 or 100 mL h<sup>-1</sup>) appeared to have affected removal efficiency of biochar for nitrate. Regardless of flow direction,  $C_e/C_i$  reached to 1 (biochar saturated with nitrate) at 36 h with 100 mL h<sup>-1</sup>, while it had not reached 1 even at 60 h with 50 mL h<sup>-1</sup>. The removal efficiency of biochars in the biofilter with slower flow speed was more efficient because nitrate had more retention time to find adsorption sites on the biochar surface allowing more nitrate being removed by the biochar. The breakthrough curve was also strongly dependent on the influent nitrate concentration; the higher the nitrate concentration, the faster the nitrate broke through and the resin was saturated (Keränen et al. 2015).

Total amounts of nitrate removed by the biofilter and their relative percentages to the maximum adsorption capacity of WH/Mg biochar were assessed for different flow direction and flow speed (Table 5). Total amounts of nitrate removed was calculated as the difference of total amounts of nitrate pumped

through the biofilter (total nitrate flowed) and total amounts of nitrate in effluent sampled after the biofilter for 60 h. Total nitrate removed with upward flow direction resulted in 7.92 and 8.74 g, and with downward flow direction 7.20 and 9.26 g with 50 and 100 mL h<sup>-1</sup> flow speed, respectively (Table 5). Percentages of total nitrate removed to total nitrate flowed (% removed by biofilter) were comparable between flow directions but different by flow speed: 41%–45% and 25%–26% for slow and fast flow speeds, respectively (Table 5). This result confirmed again insignificant effects of flow direction on the nitrate removal of biochar in the biofilter, but noteworthy effects by flow speed. It appears clear from this study that faster flow speed could result in less retention time of nitrate with biochar, thus less adsorption or removal by the biofilter. Low nitrate removal percentages by the biofilter found in this study could be improved by slowing flow speed even more and/or widening the biofilter diameter to increase nitrate retention time with biochar in the biofilter. However, percentages of total nitrate removed to the maximum adsorption capacity



of biochar in the biofilter (% biochar saturated by nitrate) calculated as [the maximum adsorption capacity of WH/Mg biochar,  $19.1 \text{ mg g}^{-1}$ ; Table 4  $\times$  biochar weight in the biofilter, 1.382 g] showed comparable with 27%–35% regardless of flow direction and flow speed (Table 5). This result implies that when used in the continuous flow system biochar could adsorb nitrate only around 30% of its maximum adsorption capacity regardless of flow direction and flow speed. The reduced adsorption capacity in the continuous flow system could be a result of reduced retention time of biochar with nitrate in the biofilter compared to 24 h of shaking time in tube for adsorption isotherm experiment and/or difference in adsorbed (saturated) fractions of biochar particles depending on location within the biofilter. Biochar particles closer to influent side of the biofilter may adsorb (be saturated with) more nitrate than those closer to effluent side of the biofilter. Therefore, switching flow directions during flowing period could overcome this shortcoming by utilizing biochar particles unsaturated with nitrate.

## 5. Conclusion

This study demonstrates the adsorption capacity of biochars produced from both oak sawdust and water hyacinth for removing nitrate from aqueous solution. Furthermore, Mg-modification of biochar was proven to be effective to improve adsorption capacity of biochar. The adsorption isotherms of biochars for nitrate were well fit with both Langmuir and Freundlich adsorption isotherm models. Water hyacinth Mg-modified biochar was also successfully used to remove nitrate from the continuous flow system (biofilter), but with limited removal efficiency. Optimization of biofilter structure (size and packing layer) and flow me-

chanics (flow direction and speed) for the maximum nitrate removal by biochar needs to be considered when used in the continuous flow system.

## 6. Acknowledgements

Authors are thankful to city governments of Gyoda and Kazo City for allowing to sample water hyacinth from parks. Authors acknowledge members of Laboratories of Restoration Ecology and Environmental Chemical Engineering at Soka University for analytical instruments. This research was supported by Private University Research Branding Project (PLANE3T) funded by MEXT, and Science and Technology Research Partnership for Sustainable Development (SATREPS) funded by Japan Science and Technology Agency (JST)/Japan International Cooperation Agency (JICA)(Grant Number JPMJSA2005).

## References

- Abdel-Ghani NT, El-Chaghaby GA, ElGammal MH, Rawash ESA (2016) Optimizing the preparation conditions of activated carbons from olive cake using KOH activation. *New Carbon Mater* 31: 492–500.
- Ahmed MB, Zhou JL, Ngo HH, Guo W, Chen M (2016) Progress in the preparation and application of modified biochar for improved contaminant removal from water and wastewater. *Bioresour Technol* 214: 836–851.
- Alagha O, Manzar MS, Zubair M, Anil I, Mu'azu ND, Qureshi A (2020) Comparative adsorptive removal of phosphate and nitrate from wastewater using biochar-MgAl LDH nanocomposites: Coexisting anions effect and mechanistic studies. *Nanomaterials* 10: 336.
- Antal MJ, Allen SG, Dai X, Shimizu B, Tam MS, Gronli M (2000) Attainment of the theoretical yield of carbon from biomass. *Ind Eng Chem Res* 39: 4024–4031.

- Bratieres K, Fletcher TD, Deletic A, Zinger Y (2008) Nutrient and sediment removal by stormwater biofilters: A large-scale design optimisation study. *Water Res* 42: 3930–3940.
- Brunauer S, Emmett PHH, Teller E (1938) Adsorption of gases in multimolecular layers. *J Am Chem Soc* 60: 309–319.
- Chen J, Fan X, Jiang B, Mu L, Yao P, Yin H, Song X (2015) Pyrolysis of oil-plant wastes in a TGA and a fixed-bed reactor: Thermochemical behaviors, kinetics, and products characterization. *Bioresour Technol* 192: 592–602.
- Davis AP (2008) Field performance of bioretention: Hydrology impacts. *J Hydrol Eng* 13: 90–95.
- Dumas JBA (1831) *Procedes de l'analyse organique*. *Ann Chim Phys* 2: 198.
- Gaurav GK, Mehmood T, Cheng L, Klemeš, JJ, Shrivastava DK (2020) Water hyacinth as a biomass: A review. *J Cleaner Prod* 277: 122214.
- Graber ER, Singh B, Hanley K, Lehmann J (2017) "Determination of cations exchange capacity in biochar" In: *Biochar. A guide to analytical methods* (eds Singh B, Camps-Arbestain M, Lehmann J). CRC Press, Boca Raton, pp. 74–84
- Guan P, Prasher SO, Afzal MT, George S, Ronholm J, Dhiman J, Patel RM (2020) Removal of *Escherichia coli* from lake water in a biochar-amended biosand filtering system. *Ecol Eng* 150: 105819.
- Hafshejani LD, Hooshmand A, Naseri AA, Mohammadi AS, Abbasi F, Bhatnagar A (2016) Removal of nitrate from aqueous solution by modified sugarcane bagasse biochar. *Ecol Eng* 95: 101–111.
- Hale SE, Alling V, Martinsen V, Mulder J, Breedveld GD, Cornelissen G (2013) The sorption and desorption of phosphate-P, ammonium-N and nitrate-N in cacao shell and corn cob biochars. *Chemosphere* 91: 1612–1619.
- Hsieh CH, Davis AP (2005) Evaluation and optimization of bioretention media for treatment of urban storm water runoff. *J Environ Eng* 131: 1521–1531.
- Inyang M, Dickenson E (2015) The potential role of biochar in the removal of organic and microbial contaminants from portable and reuse water: A review. *Chemosphere* 134: 232–240.
- Jay JG, Tyler-Plog M, Brown SL, Grothkopp F (2019) Nutrient, metal, and organics removal from stormwater using a range of bioretention soil mixtures. *J Environ Qual* 48: 493–501.
- Jia L, Gou E, Liu H, Lu S, Wu S, Wu H (2019) Exploring utilization of recycled agricultural biomass in constructed wetlands: Characterization of the driving force for high-rate nitrogen removal. *Environ Sci Technol* 53: 1258–1268.
- Jung KW, Jeong TU, Hwang MJ, Kim K, Ahn KH (2015) Phosphate adsorption ability of biochar/Mg–Al assembled nanocomposites prepared by aluminum-electrode based electro-assisted modification method with  $MgCl_2$  as electrolyte. *Bioresour Technol* 198: 603–610.
- Keränen A, Leiviskä T, Hormi O, Tanskanen J (2015) Removal of nitrate by modified pine sawdust: Effects of temperature and co-existing anions. *J Environ Manage*, 147: 46–54.
- Kim P, Johnson AM, Essington ME, Radosevich M, Kwon WT, Lee SH, Rials T, Labbé N (2013) Effect of pH on surface characteristics of switchgrass-derived biochars produced by fast pyrolysis. *Chemosphere* 90: 2623–2630.
- Line DE, Hunt WF (2009) Performance of a bioretention area and a level spreader-grass filter strip at two highway sites in North Carolina. *J Irrig Drain Eng* 135: 217–224.
- Long L, Xue Y, Hu X, Zhu Y (2019) Study on the influence of surface potential on the nitrate adsorption capacity of metal modified biochar. *Environ Sci Pollut Res* 26: 3065–3074.
- Mahmoud A, Alam T, Rahman MYA, Sanchez A, Guerrero J, Jones KD (2019) Evaluation of field-scale stormwater bioretention structure flow and pollutant load reductions in a semi-arid coastal climate. *Ecol Eng X* 1: 100007.
- Rezania S, Ponraj M, Talaiekhosani A, Mohamad SE, Din MFM, Taib SM, Sabbagh F, Sairan FM (2015) Perspectives of phytoremediation using water hyacinth for removal of heavy metals, organic and inorganic pollutants in wastewater. *J Environ Manage*

- 163: 125–133.
- Richardson MC, Braterman PS (2007) Infrared spectra of oriented and nonoriented layered double hydroxides in the range from 4000 to 250  $\text{cm}^{-1}$ , with evidence for regular short-range order in a synthetic Magnesium–Aluminum LDH with Mg:Al = 2:1 but not with Mg:Al = 3:1. *J Phys Chem C* 111: 4209–4215.
- Ruan T, Zeng R, Yin XY, Zhang SX, Yang ZH (2016) Water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) biomass as a biofuel feedstock by enzymatic hydrolysis. *BioRes* 11: 2372–2380.
- Shrestha P, Hurley SE, Wemple BC (2018) Effects of different soil media, vegetation, and hydrologic treatments on nutrient and sediment removal in roadside bioretention systems. *Ecol Eng* 112: 116–131.
- Singh B, Dolk MM, Shen Q, Camps-Arbestain M (2017) “Biochar pH, electrical conductivity and liming potential” In: *Biochar. A guide to analytical methods* (eds Singh B, Camps-Arbestain M, Lehmann J). CRC Press, Boca Raton, pp. 23–38
- Tan X, Liu Y, Gu Y, Xu Y, Zeng G, Hu X, Liu S, Wang X, Liu S, Li J (2016) Biochar-based nano-composites for the decontamination of wastewater: A review. *Biore-sour Technol* 212: 318–333.
- Tümsek F, Avci Ö (2013) Investigation of kinetics and isotherm models for the acid orange 95 adsorption from aqueous solution onto natural minerals. *J Chem Eng Data* 58: 551–559.
- Wang T, Zhang D, Fang K, Zhu W, Peng Q, Xie Z. (2021) Enhanced nitrate removal by physical activation and Mg/Al layered double hydroxide modified biochar derived from wood waste: Adsorption characteristics and mechanisms. *J Environ Chem Eng* 9: 105184.
- Wang Z, Guo H, Shen F, Yang G, Zhang Y, Zeng Y, Wang L, Xiao H, Deng S (2015) Biochar produced from oak sawdust by Lanthanum (La)-involved pyrolysis for adsorption of ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ), nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ), and phosphate ( $\text{PO}_4^{3-}$ ). *Chemosphere* 119: 646–653.
- Xu X, Gao B, Tan T, Zhang X, Yue Q, Wang Y, Li Q (2013) Nitrate adsorption by stratified wheat straw resin in lab-scale columns. *Chem Eng J* 226: 1–6.
- Yao Y, Gao B, Chen J, Yang L (2013) Engineered biochar reclaiming phosphate from aqueous solutions: Mechanisms and potential application as a slow-release fertilizer. *Environ Sci Technol* 47: 8700–8708.
- Yao Y, Gao B, Inyang M, Zimmerman AR, Cao X, Pullammanappallil P, Yang L (2011) Biochar derived from anaerobically digested sugar beet tailings: Characterization and phosphate removal potential. *Biore-sour Technol* 102: 6273–6278.
- Zare L, Ghasemi-Fasaei R (2019) Investigation of equilibrium isotherm and kinetic modeling to assess sorption characteristics of nitrate onto palm leaf biochar. *Iran J Chem Chem Eng* 38: 143–153.
- Zhang M, Gao B, Yao Y, Xue Y, Inyang M (2012) Synthesis of porous MgO-biochar nanocomposites for removal of phosphate and nitrate from aqueous solution. *Chem Eng J* 210: 26–32.
- Zhen Y, Ning Z, Shaopeng Z, Yayi D, Xuntong Z, Jiachun S, Weiben Y, Yuping W, Jianqiang C (2015) A pH- and temperature-responsive magnetic composite adsorbent for targeted removal of nonylphenol. *ACS Appl Mater Interfaces* 7: 24446–24457.



# 間欠的な曝気攪拌が海産珪藻 *Chaetoceros gracilis* の生産性に与える影響

大竹正弘<sup>1)\*</sup>、家後幸一<sup>2)</sup>、平原南萌<sup>1a)</sup>、ファティマ・ユソフ<sup>3)</sup>、戸田龍樹<sup>1)</sup>

1) 創価大学理工学部 〒192-8577 東京都八王子市丹木町 1-236

2) 創価大学大学院理工学研究科 〒192-8577 東京都八王子市丹木町 1-236

3) マレーシアプトラ大学生物科学研究所 43400 UPM Serdang, Selangor Darul Ehsan, Malaysia

a) マッハコーポレーション株式会社 〒220-0004 神奈川県横浜市西区北幸 2-5-15 プレミア横浜西口ビル 7 階

## Effect of intermittent agitation on the productivity of the marine diatom *Chaetoceros gracilis*

Masahiro Ohtake<sup>1)\*</sup>, Kouichi Yago<sup>2)</sup>, Minamo Hirahara<sup>1a)</sup>, Fatimah Md. Yusoff<sup>3)</sup>, Tatsuki Toda<sup>1)</sup>

1) Faculty of Science and Engineering, Soka University, 1-236 Tangi-machi, Hachioji, Tokyo 192-8577, Japan

2) Graduate School of Science and Engineering, Soka University, 1-236 Tangi-machi, Hachioji, Tokyo 192-8577, Japan

3) Institute of Bioscience, Universiti Putra Malaysia, 43400 UPM Serdang, Selangor Darul Ehsan, Malaysia

\* Corresponding author: bigbamboo@soka.gr.jp

a) Mach Corporation, Puremia Yokohama Nishiguchibiru 7 floor, 2-5-15, Kitasaiwai, Nishi-ku, Yokohama, Kanagawa, 220-0004, Japan

2021 年 3 月 31 日受付, 2021 年 5 月 21 日受理

**Abstract** The demand for global fisheries protein source continues to increase with the increase of the world's population, causing decrease of natural fishery resources due to the overfishing and the degradation of habitats. Under these circumstances, the fisheries industry for marine products has rapidly grown in recent decades to promote the stable production and utilization of fishery resources while managing and conserving them. Mass cultivation of microalgae is essential for efficient production of artificial seedlings of bivalves whose resources are rapidly decreasing. Diatoms can provide high utility as a primary feed because they contain a high content of fucoxanthin, a carotenoid pigment. The marine diatom, *Chaetoceros gracilis* which can accumulate fucoxanthin, is a promising feed for fishery products. However, marine diatoms are known as a taxonomic group in which stable cultivation is difficult, and it is necessary to establish a cultivation method that enables high-density cultivation.

In previous studies, the factors involved in the growth of marine diatoms have been investigated by controlling the external environment such as light intensity, water temperature and nutrient concentration. However, the establishment of high-density cultivation for marine diatoms under each optimal environmental condition has still not been achieved. A problematic point in the high-density cultivation involves the heterogeneity of the light intensity, water temperature,

and nutrient concentration in the culture tank, which limits the growth of algae. Previous studies have reported that “agitation” of the culture solution has the effect of promoting the supply of CO<sub>2</sub>, as a carbon source, and the removal of dissolved oxygen by equalizing the internal environment of the culture tank, and is essential to improve the productivity of microalgae. However, the performance of using the agitation method remain to be solved in mass culture operation. Intermittent agitation frequency is one of the solutions for low-energy cost operation. There is no previous research comparing biomass productivity per unit of agitation energy input between the same species using both continuous and intermittent agitation methods. The objective of this study was to evaluate the productivity per aeration energy under different agitation frequencies toward high-density cultivation of marine diatom *C. gracilis*.

*C. gracilis* (UPMC-A0010-2) isolated from Malaysian coastal waters was semi-continuously cultured using modified Conway medium in 1.2-L bubble column reactors (n=2). The culture was conducted under stable light intensity 300 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> (12 hours cycle of light and dark) and temperature (25°C). The dilution rates were adjusted at 0.3 d<sup>-1</sup>. The aeration rate in each reactor was set to 0.2 L min<sup>-1</sup> (2% CO<sub>2</sub>), and aeration frequency was set to the following three conditions: (1) continuous agitation condition, (2) intermittent agitation condition once 9 every minutes, and (3) intermittent agitation condition once 18 every minutes. The cultivation period was a stationary phase of the biomass for up to 5 days, and the absorbance (750 nm) and pH of the culture, and the dry weight were measured.

The biomass productivity per algal volume was equivalent to that under continuous agitation conditions even with relatively high frequency of intermittent agitation once 9 every minutes. This may be caused by the high light utilization efficiency of the cells because the cells in the culture are distributed on an average without sedimentation even after the aeration pause period without agitation. The biomass productivity per unit of agitation energy input in the intermittent agitation conditions showed a higher value than the continuous agitation condition by several times. Intermittent agitation performance can be evaluated as an environmental control technology that can maintain biomass productivity equivalent to continuous agitation conditions. The reduction of energy consumption by intermittent agitation is expected to significantly contribute to the reduction of operating costs for outdoor closed-system reactors.

**Keywords:** agitation frequency, biomass productivity, bubble column reactor, mass culture, power input

## 1. 緒 言

世界の水産タンパク源の需要は人口の増加に伴って年々拡大の一途をたどり、一方で、水産資源の乱獲や生息環境の悪化による天然水産資源の減少が問題

となっている。こうした背景から、水産資源を管理・保全しつつ、安定的に生産・利用するため、近年では魚介類の養殖産業が急成長している（農林統計協会 2000）。天然資源の減少が著しい二枚貝の人工種苗生産を効率的に行うためには、餌料である微細藻

類の大量生産が不可欠である (Su et al. 1997, Dueer et al. 1998, 生田 2001)。餌料用の微細藻類の中でも、特に、珪藻類はカロテノイド系色素であるフコキサンチンを多く含有する (Peng et al. 2011, Tokushima et al. 2016) ことから、初期餌料としての利用価値が高いことで知られる。フコキサンチンは、抗酸化作用、抗肥満作用、白血病細胞の増殖抑制効果 (Ganesan et al. 2011, Peng et al. 2011) が知られ、サプリメントや健康食品としての利用が期待される。特に、*Chaetoceros gracilis* や *C. calcitrans* などの海産珪藻は、緑藻類と比べて増殖速度や有価物生産性が高く、高密度培養による商業利用に適した生理的特性を有している。しかし、安定的なバイオマス生産を要する商業利用は、これまで、淡水産藻類であるスピルリナやクロレラの2種に限定され (Lee 1997, Kitto et al. 1999, 丸山 1998)、世界全体の藻類生産量の99%以上を占めているのが現状である。この理由は、エネルギー効率の高いレースウェイなどの開放型の藻類培養槽にて単一種の純粋培養が可能な藻類種がスピルリナとクロレラだけであることに起因している。海産珪藻は安定的な培養が困難な分類群として知られ (奥村 2000)、海産珪藻の高密度培養が可能な培養手法の確立が求められている。

これまで、光強度、水温、栄養塩濃度などの外部環境を制御し、海産珪藻の増殖に関わる因子の検討試験が活発に行われてきたが、各種固有の最適環境条件下での高密度培養の確立には未だ至っていない。高密度培養における問題点として、培養槽内の光強度、水温、栄養塩濃度が不均一となり (Carvalho et al. 2006, Leupold et al. 2013b)、藻類の増殖が制限されることが挙げられる。培養液の「攪拌」は、培養槽内の環境を均一化し、炭素源であるCO<sub>2</sub>の供給や活性酸素ストレスの要因となる溶存酸素の除去を促す効果があることが報告され (Carvalho et al. 2006, Leupold et al. 2013a)、微細藻類の生産性向上に不可欠である。しかし、攪拌にかかるエネルギーは、微細藻類バイオマスの生産コストの40%以上を占めると

報告され (Leupold et al. 2013b, Kim et al. 2013)、高密度培養にかかる攪拌コストの低減が課題となっている。曝気コスト削減の一つの技術的な解決策として、「間欠攪拌」が挙げられ、曝気の頻度や時間を制御することで、バイオマス生産コストの削減が期待できる。*Chlorella* 属の投入エネルギーあたり生産性 (dry g W<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>) を調査した既往研究を比較すると、連続攪拌により得られた *Chlorella* sp. の生産性は 0.12 dry g W<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> から 0.16 dry g W<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> (Tang et al. 2011, Ryu et al. 2009) の範囲であったのに対し、間欠攪拌を用いた *C. vulgaris* や *C. lessleri* の培養では、それぞれ 0.40 dry g W<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> および 0.51 dry g W<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> (Morais & Costa 2007) と高いエネルギーあたり生産性を示した。しかし、これまでの報告では、連続攪拌と間欠攪拌の両手法を用いて、同種間のエネルギーあたり生産性を比較した研究例はなく、攪拌頻度に対するバイオマス生産性の評価が必要である。本研究では、海産珪藻 *C. gracilis* の高密度培養に向けて、異なる曝気攪拌頻度下におけるバイオマス生産性および曝気エネルギーあたり生産性を評価することを目的とした。

## 2. 材料と方法

供試藻類は、マレーシア沿岸から単離された *Chaetoceros gracilis* (UPMC-A0010-2) を利用した。本株を実験に供試するまで、改変 Conway 培地 (Tomkins et al. 1995) を用いて下記の条件下で馴致培養を行った。本実験では、バブルカラムリアクター (有効容積 1.2 L) を2連準備し、水温 25°C、光強度 300 μmol photons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> (明暗周期 12 時間) の条件下で半連続培養を行った。リアクターはアクリル製の水浴内に横一列に固定し、培養中の水温を一定に保つため、水浴内を水道水で満たし、ヒーターを用いて温度制御を行った。光強度は LED ライトと水浴との設置間隔を微調整して調節した。培地の引き抜き速度 (毎日交換する培地の割合) は 0.3 d<sup>-1</sup> とした。培養初期の pH は 8.2 に調整した。各リアクター内の曝気速度は 0.2

$L \text{ min}^{-1}$  (2%  $\text{CO}_2$  添加)に統一し、曝気攪拌の頻度を以下の3条件とした:(1)連続曝気攪拌(24時間連続曝気)、(2)高頻度間欠曝気攪拌(9分間のうち1分間の攪拌)、(3)低頻度間欠曝気攪拌(18分間のうち1分間の攪拌)。培養期間はバイオマスの定常期で5日間経過までとし、培養液の吸光度(750 nm)およびpHを24時間毎に測定した。供試株の乾燥重量(DW)は、前実験により算出した吸光度と乾燥重量の関係式( $\text{DW} = 0.4127 \times \text{吸光度} + 0.0318$ )を用いて、吸光度の測定値から算出した。

面積生産性( $\text{g-DW m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ )は、乾燥重量(DW; $\text{g L}^{-1}$ )と前日の培地引き抜き直後のDWの差分を比表面積( $0.021 \text{ m}^2 \text{ L}^{-1}$ )と時間(day)で割ることにより算出した。単位体積あたり生産性( $\text{g-DW L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ )は、面積生産性に比表面積を乗じて算出した。

以下の式を用いて、藻類培養槽の体積あたり曝気エネルギー投入量 $E_G$  ( $\text{W m}^{-3}$ )を算出した(Ketheesan & Nirmalakhandan 2012) :

$$E_G = \frac{Q_G \gamma h}{V_R} \quad (1)$$

$Q_G$ :ガス供給量( $\text{m}^3 \text{ s}^{-1}$ )、 $\gamma$ :培養液の比重( $\text{N m}^{-3}$ )、 $h$ :培養液の深度(m)、 $V_R$ :藻類培養槽における運転容量( $\text{m}^3$ )。曝気エネルギーあたり生産性は、面積生産性を $E_G$ で割ることにより算出した。

また、藻類培養槽の体積あたりの光エネルギー投入量 $E^L$  ( $\text{W m}^{-3}$ )は、以下の式を用いて算出した(Ketheesan & Nirmalakhandan 2012) :

$$E^L = \frac{0.22 I_L A_R}{V_R} \quad (2)$$

$I_L$ :光量子束密度( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ )、 $A_R$ :受光面積( $\text{m}^2$ )、 $V_R$ :藻類培養槽における運転容量( $\text{m}^3$ )。

以上により、藻類培養槽の体積あたり曝気エネルギー投入量および光エネルギー投入量から、式(3)を用いて、投入エネルギーあたり生産性 $P_{B/P}$  ( $\text{g W}^{-1} \text{ d}^{-1}$ )を算出した(Ketheesan & Nirmalakhandan 2012) :

$$P_{B/P} = \frac{1000P}{(E_G + E^L)} \quad (3)$$

培養期間中にバイオマス増加によるpHの急激な変化があった際は、pH緩衝剤であるトリシンまたは炭酸水素ナトリウムの添加量を適宜調整することでpHを安定させた。

### 3. 結果

吸光度(750 nm)は、すべての条件において、培養開始時から培養40日後半にかけて増加し、培養50日前半にかけて減少傾向を示し、その後比較的安定した値で推移した(Fig. 1a)。培養終盤にて吸光度が5日以上安定して推移したことから、定常期を迎えたと判断し、培養63日目で本培養実験を終了した。定常期であった吸光度の値を比較すると、連続曝気攪拌条件および高頻度曝気攪拌条件では約0.58、低頻度曝気攪拌条件では約0.48で推移し、高頻度な攪拌条件にて高い値を示した。pHはすべての条件において、類似した変動を示した(Fig. 1b)。培養5日目および18日目にはpHは9.5付近まで増加したため、トリシンを添加したところ、培養24日目にかけてpH7.5まで急激に減少した。そこで、炭酸水素ナトリウムの供給量を規定量よりも減らしたところ、培養終盤の50日目以降のpHは、すべての条件において8.7付近で安定した。関係式より吸光度から算出した乾燥重量は、すべての条件において、培養47日目前後にてピークを記録し、培養終盤にはピーク時の約50%程度の値に収束した(Fig. 1c)。

単位体積あたり生産性は、定常期であった52日目から63日目の期間において、連続攪拌条件で平均 $0.087 \pm 0.005 \text{ g-DW L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ 、9分間に1分間の間欠攪拌条件で $0.086 \pm 0.006 \text{ g-DW L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ 、18分間に1分間の間欠攪拌条件で $0.074 \pm 0.003 \text{ g-DW L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ を示し、9分間に1分間の間欠的な曝気攪拌でも連続攪拌と同等の生産性を維持できることが明らかとなった(Fig. 2)。



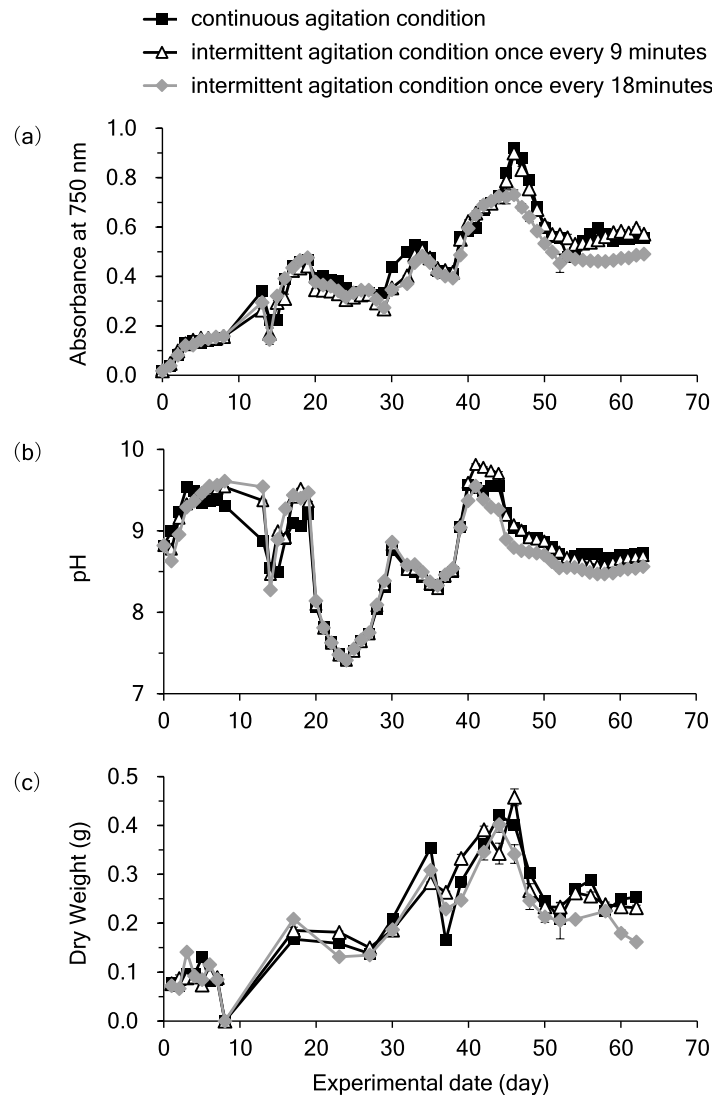


Figure 1. Changes in absorbance at 750 nm (a), pH (b), and dry weight (c) in each agitation frequency condition. The agitation frequencies were as follows: ■ continuous agitation condition, △ intermittent agitation condition once every 9 minutes, and ◆ intermittent agitation condition once every 18 minutes. Each plot is expressed as mean  $\pm$  standard deviation.

曝気エネルギーあたり生産性は、連続攪拌条件で  $0.410 \pm 0.024$  g-DW  $W^{-1} d^{-1}$ 、9分間に1分間の間欠攪拌条件で  $3.883 \pm 0.303$  g-DW  $W^{-1} d^{-1}$ 、18分間に1分間の間欠攪拌条件で  $6.669 \pm 0.106$  g-DW  $W^{-1} d^{-1}$ を示し、曝気による攪拌頻度が少ないほど高い生産性を示した (Fig. 3)。

曝気と光供給による投入エネルギーあたり生産性 ( $P_{B/P}$ ) は、連続攪拌条件で  $0.124 \pm 0.000$  g-DW  $m^{-2} d^{-1}$ 、9分間に1分間の間欠攪拌条件で  $0.122 \pm 0.006$

g-DW  $m^{-3} d^{-1}$ 、18分間に1分間の間欠攪拌条件で  $0.105 \pm 0.004$  g-DW  $m^{-3} d^{-1}$ を示し、光照射によるエネルギー消費を考慮すると、18分間に1分間の間欠攪拌条件では生産性が比較的低くなることがわかった (Fig. 4)。

#### 4. 考 察

体積あたり生産性は、比較的高頻度な間欠攪拌でも連続攪拌条件と同等の生産性が得られた (Fig. 2)。こ

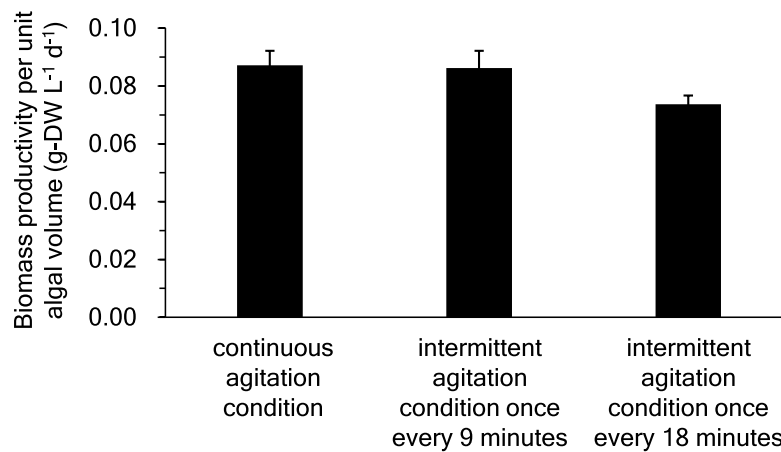


Figure 2. Biomass productivity per unit algal volume in each agitation frequency condition. Each bar is expressed as means  $\pm$  standard deviation (n=6).

れは、攪拌を行わない曝気休止期間を挟んでも、培養液内の細胞が沈殿せず平均的に分布しているため、細胞の光利用効率が高く維持されているためと考えられる。一方で、低頻度の間欠攪拌条件(18分間に1分間の間欠攪拌)における生産性の低下は、長期の曝気休止により細胞が沈殿し、培養液の底に濃密に局在することから、細胞の光利用効率が低下したためと想定される。光利用効率は、培養液内の細胞密度と反比例の関係にあり(Yoon et al. 2008)、細胞密度が低いときは、光源からの照射光が培養液の深く(遠く)まで届くため、培養液内の多くの細胞に光が供給されやすい環

境となる。そのため、曝気による培養液の適度な攪拌は、細胞の光利用効率に影響を与え、高い生産性の維持に重要である。本研究では、間欠攪拌条件として、9分間のうち1分間の攪拌と、18分間のうち1分間の攪拌を行ったが、後者の条件で体積あたり生産性の低下がみられたことから、17分間よりも長い曝気休止を行うと、生産性がより低下する傾向がみられると想定される。以上の点から、1分間の曝気攪拌と8分間の曝気休止を組み合わせた間欠的な曝気攪拌は、連続曝気攪拌条件と同等の生産性を維持できる環境制御技術として一定の評価ができる。

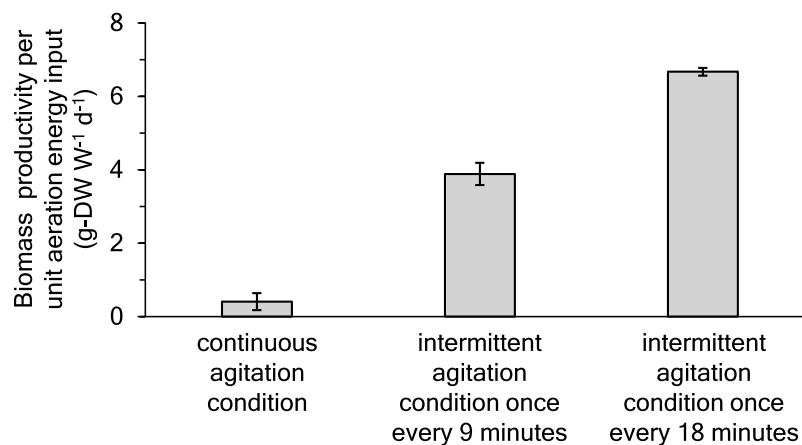


Figure 3. Biomass productivity per unit aeration energy input in each agitation frequency condition. Each bar is expressed as means  $\pm$  standard deviation (n=6).

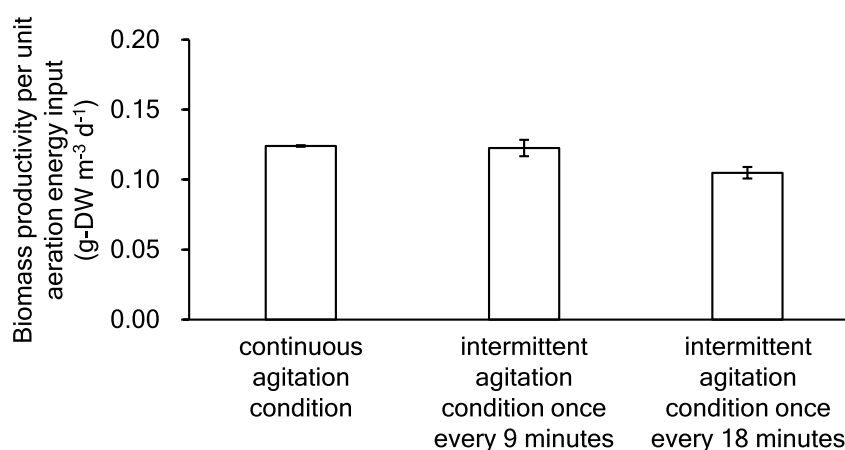


Figure 4. Biomass productivity per unit power input in each agitation frequency condition. Each bar is expressed as means  $\pm$  standard deviation (n=6).

Table 1. Comparison in biomass productivity per unit algal volume and unit power input of various microalgae in a different agitation condition.

Algal species	Aeration rate (L L <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> )	Agitation	Biomass productivity per unit algal volume (dry g L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )	Biomass productivity per unit power input (dry g W <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )	Reference
<i>Chlorella</i> sp.	0.25	Continuous	0.38	0.12	[1]
	0.20	Continuous	0.34	0.16	[2]
<i>Nanochloropsis oculata</i>	0.25	Continuous	0.48	0.13	[3]
	1.00	Continuous	0.28	0.10	[4]
<i>Scenedesmus obliquus</i>	0.25	Continuous	0.16	0.15	[5]
<i>Chlorella kessleri</i>	0.30	Intermittent	0.18	0.51	[6]
<i>Chlorella vulgaris</i>	0.30	Intermittent	0.14	0.40	[6]
<i>Scenedesmus dimorphous</i>	0.50	Intermittent	0.24	0.41	[7]
<i>Chaetoceros gracilis</i>	0.20	Continuous	0.09	0.12	This study
	0.20 (1 min 9 min <sup>-1</sup> )	Intermittent	0.09	0.12	This study
	0.20 (1 min 18 min <sup>-1</sup> )	Intermittent	0.07	0.11	This study

[1] Tang et al., 2011, [2] Ryu et al., 2009, [3] Chiu et al., 2009a, [4] Hsueh et al., 2009, [5] Chiu et al., 2009b, [6] Morais & Costa, 2007, [7] Eustance et al., 2015

曝気エネルギーあたり生産性は、間欠曝気攪拌条件において、連続曝気攪拌条件よりも数倍高い値を示し、曝気休止によりエネルギーコストを抑えつつ、高い生産性を維持できることが明らかとなった (Fig. 3)。一方で、曝気エネルギーに加えて光供給エネルギーを考慮した、投入エネルギーあたり生産性 ( $P_{B/P}$ ) は、18 分間に 1 分間の間欠曝気攪拌条件では比較的低い生産性を示した (Fig. 4)。これは、投入エネルギーに占める光エネルギー投入量 ( $E_L$ ) は、曝気エネルギー投入量 ( $E_G$ ) の約 70 倍であり、室内における藻類培養では光供給によるエネルギー消費の割合が大きいためであると示唆される。しかし、微細藻類の大量培養は装置の大規模化に伴い屋外で行われており、屋外培養では太陽光による豊富な照射光を利用でき、屋内培養において不可欠であった、LED ライトなどの人工的な光源を用いた光エネルギーの供給は不要となる。屋外での藻類大量培養に用いられているチューブ型やフラットパネル型の閉鎖系リアクターは、生物汚染 (コンタミネーション) を抑制できることから高い生産性を有するが、曝気や攪拌のためのエネルギー消費が多く、そのコスト低減が課題となっている。Norsker et al. (2011) は、フラットパネル型リアクターを用いた培養プロセスにかかるコストを試算し、そのコスト全体のうち約 40% が電気代にあたり、そのうち約 98% が曝気によるコストであると見積もられた。このことから、間欠曝気攪拌によるエネルギー消費の削減は、屋外閉鎖系リアクターの運転コスト削減に大きく寄与すると期待される。間欠曝気攪拌における曝気の頻度や供給量の調節は屋内や屋外を問わず容易ではあるが、リアクターの容積や形状を変化させると、同様の曝気条件でも攪拌効率が変わると想定される。屋外での大規模培養システムへの応用に向けて、今後の研究課題としては、攪拌休止後の時間と培養液の深度ごとの細胞密度の関係を調べ、攪拌頻度ごとの細胞の光利用効率の変動を明らかにすることが挙げられる。

本研究では、バブルカラムリアクターを用いて、連続曝気攪拌および間欠曝気攪拌による *C. gracilis* の半連

続培養を行い、間欠曝気攪拌条件において高い曝気エネルギーあたり生産性が得られた。緑藻類を供試した様々な先行研究によると (Morais & Costa 2007, Chiu et al. 2009a, Chiu et al. 2009b, Hsueh et al. 2009, Ryu et al. 2009, Tang et al. 2011, Eustance et al. 2015)、間欠攪拌では連続攪拌に比べ、投入エネルギーあたり生産性が高い傾向がみられる (Table 1)。*C. gracilis* の生産性は先行研究の他種と比較すると低いことから (Table 1)、培養液中の栄養塩の枯渇など生産性低下の要因を探索することが課題である。今後の展望として、供試株の最適な間欠攪拌条件を評価するため、細胞の沈殿速度を把握し、光利用効率を最大化できる曝気攪拌頻度を調査する。

## 謝辞

本研究は、微細藻類の大量培養技術の確立による持続可能な熱帯水産資源生産システムの構築プロジェクト (COSMOS; Grant No. JPMJSA1509) の一環で実施され、国立研究開発法人科学技術振興機構 (JST) および国際協力機構 (JICA) が共同で実施している地球規模課題対応国際科学技術プログラム (SATREPS) によるご支援を賜った。本研究では、長尾宣夫博士ならびに今泉雄貴氏より藻類培養に関する技術指導を賜った。本研究で使用した藻類株は、マレーシア・トレンガヌ大学 (UMT) の Mohd. Effendy Abd Wahid 教授と東京大学の高橋一生教授による素材移転契約 (MTA) の締結により、使用許可が得られた。この場をお借りして厚く御礼申し上げたい。

## 引用文献

- Carvalho AP, Meireles LA, Malcata FX (2006) Microalgal reactors: a review of enclosed system designs and performances. *Biotechnol Progr* 22: 1490–1506.
- Chiu SY, Kao CY, Tsai MT, Ong SC, Chen CH, Lin CS (2009a) Lipid accumulation and CO<sub>2</sub> utilization of *Nannochloropsis oculata* in response to CO<sub>2</sub> aeration. *Bioresour Technol* 100: 833–838.
- Chiu SY, Tsai MT, Kao CY, Ong SC, Lin CS (2009b)

- The air-lift photobioreactors with flow patterning for high density cultures of microalgae and carbon dioxide removal. *Eng Life Sci* 9: 254–260.
- De Morais MG, Costa JAV (2007) Carbon dioxide fixation by *Chlorella kessleri*, *C. vulgaris*, *Scenedesmus obliquus* and *Spirulina* sp. cultivated in flasks and vertical tubular photobioreactors. *Biotechnol Lett* 29: 1349–1352.
- Duerr EO, Molnar A, Sato V (1998) Cultured microalgae as aquaculture feeds. *J Mar Biotechnol* 6: 65–70.
- Eustance E, Wray JT, Badvipour S, Sommerfeld MR (2015) The effects of limiting nighttime aeration on productivity and lipid accumulation in *Scenedesmus dimorphous*. *Algal Res* 10: 33–40.
- Ganesan P, Noda K, Manabe Y, Ohkubo T, Tanaka Y, Maoka T, Sugawara T, Hirata T (2011) Siphonaxanthin, a marine carotenoid from green algae, effectively induces apoptosis in human leukemia (HL-60) cells. *Biochim Biophys Acta* 1810: 497–503.
- Hsueh HT, Li WJ, Chen HH, Chu H (2009) Carbon bio-fixation by photosynthesis of *Thermosynechococcus* sp. CL-1 and *Nanochlropsis oculata*. *J Photochem Photobiol* 95: 33–39.
- 生田義明 (2001) 貝類養殖の新たな挑戦 (1) 微細藻を利用した陸上での二枚貝栽培. *養殖* 38: 70–73.
- Ketheesan B, Nirmalakhandan N (2012) Feasibility of microalgal cultivation in a pilot-scale airlift-driven raceway reactor. *Bioresour Technol* 108: 196–202.
- Kim TH, Lee Y, Han SH, Hwang SJ (2013) The effects of wavelength and wavelength mixing ratios on microalgae growth and nitrogen, phosphorus removal using *Scenedesmus* sp. for wastewater treatment. *Bioresour Technol* 130: 75–80.
- Kitto MR, Regunathan C, Rodrigues A (1999) An industrial photosynthetic system for *Skeletonema costatum* in arid regions. *J Appl Phycol* 11: 391–397.
- Lee YK (1997) Commercial production of microalgae in the Asia-Pacific rim. *J Appl Phycol* 9: 403–411.
- Leupold M, Hindersin S, Kerner M, Hanelt D (2013a) The effect of discontinuous airlift mixing in outdoor flat panel photobioreactors on growth of *Scenedesmus obliquus*. *Bioprocess Biosyst Eng* 36: 1653–1663.
- Leupold M, Hindersin S, Gust G, Kerner M, Hanelt D (2013b) Influence of mixing and shear stress on *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus obliquus*, and *Chlamydomonas reinhardtii*. *J Appl Phycol* 25: 485–495.
- 丸山 功 (1998) クロレラ培養の最新技術と今後の展望. *養殖* 35: 48–51.
- Norsker NH, Barbosa MJ, Vermuë MH, Wijffels RH (2011) Microalgal production—a close look at the economics. *Biotechnol Adv* 29: 24–27.
- 農林統計協会 (2000) 図説漁業白書平成 11 年度. 農林統計協会, 東京, 327 pp.
- 奥村裕弥・中島幹二・増田篤稔・高橋光男・向阪信一・洞口公俊・松山恵二・村上克介 (2000) 植物餌料研究の現状と課題. *植物工場学会誌* 12: 261–267.
- Peng J, Yuan JP, Wu CF, Wang JH (2011) Fucoxanthin, a marine carotenoid present in brown seaweeds and diatoms: metabolism and bioactivities relevant to human health. *Mar Drugs* 9: 1806–1828.
- Ryu HJ, Oh KK, Kim YS (2009) Optimization of the influential factors for the improvement of CO<sub>2</sub> utilization efficiency and CO<sub>2</sub> mass transfer rate. *J Ind Eng Chem* 15: 471–475.
- Su HM, Su MS, Liao IC (1997) Collection and culture of live foods for aquaculture in Taiwan. *Hydrobiologia* 358: 37–40.
- Tang D, Han W, Li P, Miao X, Zhong J (2011) CO<sub>2</sub> bio-fixation and fatty acid composition of *Scenedesmus obliquus* and *Chlorella pyrenoidosa* in response to different CO<sub>2</sub> levels. *Bioresour Technol* 102: 3071–3076.
- Tokushima H, Inoue-Kashino N, Nakazato Y, Masuda A, Ifuku K, Kashino Y (2016) Advantageous characteristics of the diatom *Chaetoceros gracilis* as a sustainable biofuel producer. *Biotechnol Biofuels* 9: 1–19.
- Tompkins J, Deville MM, Day JG, Turner MF (1995) Culture Collection of Algae and Protozoa Catalogue of Strains. *Culture Catalogue of Algae and Protozoa*. Ambleside, 204 pp.
- Yoon JH, Shin JH, Park TH (2008) Characterization of factors influencing the growth of *Anabaena variabilis* in a bubble column reactor. *Bioresour Technol* 99: 1204–1210.



# メタン発酵消化液を用いた微細藻類培養とバイオガス精製同時プロセス

岸正敏<sup>1)\*</sup>, 尾内秀美<sup>2)</sup>, 田中健児<sup>3)</sup>, 吉田あかり<sup>3)</sup>, 戸田龍樹<sup>1,3)</sup>

1) 創価大学プランクトン工学研究所 〒192-8755 東京都八王子市丹木町 1-236

2) 国立環境研究所 〒305-8506 茨城県つくば市小野川 16 番地 2

3) 創価大学理工学部 〒192-8755 東京都八王子市丹木町 1-236

## Simultaneous microalgal culture and biogas upgrading using anaerobic digestion effluent

Masatoshi Kishi<sup>1)\*</sup>, Hidemi Onouchi<sup>2)</sup>, Kenji Tanaka<sup>3)</sup>, Akari Yoshida<sup>3)</sup>, Tatsuki Toda<sup>1,3)</sup>

1) *Institute of Plankton Eco-engineering, Soka University 1-236 Tangi-machi, Hachioji City, Tokyo, 192-8577 Japan*

2) *National Institute of Environmental Studies, 16-2 Onogawa, Tsukuba, Ibaraki, 305-8506 Japan*

3) *Faculty of Science and Engineering, Soka University 1-236 Tangi-machi, Hachioji City, Tokyo, 192-8577 Japan*

\*Corresponding author: [masa-kishi@soka.gr.jp](mailto:masa-kishi@soka.gr.jp)

2021年4月10日受付, 2021年5月25日受理

**Abstract** Anaerobic digestion is an energy-generating, ecologically friendly waste/wastewater treatment process. However, treatment of anaerobic digestion effluent (ADE) and purification of carbon dioxide in the biogas, commonly called biogas upgrading, are two issues that prevent propagation of this process. Since ADE contains high concentrations of nutrients, it can be utilized for microalgal cultivation if the chemical composition is optimized for the purpose. Microalgal cultivation is at the same time a promising platform to capture and utilize carbon dioxide in biogas. Therefore, simultaneous ADE utilization and biogas upgrading can be possible by coupling microalgal culture. Previous studies using the simultaneous process adopted open pond systems with algal-bacterial consortium. Although these processes were effective in treatment of both ADE and biogas, the volumetric productivity and economic value of the microalgal biomass are low in such systems. Thus, this study aimed to establish a simultaneous algal pure culture and biogas upgrading using centrifuged supernatant of anaerobic digestion effluent from an activated sludge treatment facility.

To achieve this goal, the ADE concentration, pH, dissolved inorganic carbon, and metal composition were adjusted by batch optimization tests with *Chlorella sorokiniana*. The optimized ADE media was then scaled up to 4-L photobioreactor (PBR) coupled with a 1.8-L gas/liquid exchange column for simultaneous processing. Since the current study adopted algal pure culture in a closed PBR, gas/liquid transfer was expected to be different from previous studies, and thus, three liquid circulation flow rates (1, 2 and 4 L d<sup>-1</sup>) were tested, which resulted in liquid to gas ratio (L/G) of 0.1, 0.3 and 0.5.

As a result, the ADE media was optimized to 10% ADE content, pH 8.0, 0.1 mol L<sup>-1</sup> bicarbonate addition, and Mg + Mn addition. While the raw ADE did not allow the growth of *Chlorella sorokiniana*, the maximum algal specific growth rate using the optimized media reached more than 2 d<sup>-1</sup>, which equals a doubling time of less than 9 hours. The optimized media was then used for the simultaneous microalgae cultivation and biogas upgrading process. The average productivity in the PBR was 206 ± 138 mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>. The carbon dioxide recovery rates for L/G 0.1, 0.3, and 0.5 were 90, 94, and 99%, respectively. On the other hand, O<sub>2</sub> contents in the upgraded gas were 8.5, 8, and 14%, respectively. The content of carbon dioxide and O<sub>2</sub> were in a reverse relationship over various L/G ratios. The current study demonstrated the effectiveness of carbon capture from the biogas, but also suggested further challenge in prevention of oxygen intrusion from algal pure culture. Comparisons with other studies suggest that optimization in gas/PBR volume may enhance the quality of biogas upgrading.

**Keywords:** carbon dioxide, *Chlorella*, CO<sub>2</sub> capture, waste valorization.

## 1. 序 論

メタン発酵処理は、廃棄物系バイオマスを微生物によって低エネルギー・低コストで処理し、生成されるバイオガスから燃料として利用可能なメタンガスを回収することができる低環境負荷型の処理技術である。メタン発酵処理は普及しつつあるものの、処理後に発生する排水（消化液）の処理や、バイオガスの天然ガス代替燃料としての使用のためには課題が多く残されている。

メタン発酵で発生する消化液は、高濃度の栄養塩を含有しているため、液肥や堆肥として農地へ利用することも可能である。しかし、施肥できる液肥や堆肥の量は 170 kg-N ha<sup>-1</sup> y<sup>-1</sup> 程度と限られており、排出量に見合う十分な農地面積が必要であるため、特に農地の少ない都市部や人口密集地では需要の確保が困難となっている (Xia & Murphy 2016)。そのため、大半の消化液は、メタン発酵後に生物学的脱窒処理や生物脱リン法により消化液中の栄養塩を除去したうえで、河川等に放流する手法を取っている。処理過程においては薬品の利用や曝気によるコスト負担の発生 (中川 2003) が課題となっている。消化液を処理後に河川へ放流する

場合、消化液中に含まれる窒素分は脱窒により処理されるため、栄養塩の有効利用はされない (中村 2011)。処理に代わるメタン発酵消化液の有効利用法が求められている。

消化液の新たな利用方法として、消化液中の栄養塩を利用して微細藻類を培養し、その培養した微細藻類を飼料や餌料などの原料として使用する手法が注目されている (Ban et al. 2019)。微細藻類は面積あたり窒素利用速度が農地施肥よりも約 30 倍高く、人口密集地での実施がより容易である (Xia & Murphy 2016)。しかし消化液を利用した微細藻類培養にはいくつかの課題がある。まず、消化液に高濃度で含まれるアンモニア態窒素による微細藻類の増殖阻害が生じる可能性がある。また、微細藻類の増殖には窒素やリン等の栄養塩の他にも微量金属が必要不可欠であり、メタン発酵槽の基質によって消化液中に含まれる成分は変化する (Dębowski et al. 2017, Kimura et al. 2019)。そのため、安定的に消化液を利用するには、消化液の希釈や pH の調整、微細藻類の増殖に必要な微量金属群の添加、他生物の混入を防ぐための滅菌処理など微細藻類の培養に適する条件に最適化を行う必要がある。



また、バイオガスには、約 60% を占めるメタンの他に約 40% の  $\text{CO}_2$  や微量の  $\text{H}_2\text{S}$  が含まれる。バイオガスを天然ガスの代替燃料として利用するためには、メタンガス濃度を 90 ~ 95% 程度まで精製する必要がある (Ángeles et al. 2020)、特に高濃度で含まれる  $\text{CO}_2$  を除去する必要がある。バイオガスに含まれる  $\text{CO}_2$  の回収方法として、微細藻類培養液への  $\text{CO}_2$  の溶解を利用する方法がある。微細藻類が光合成で  $\text{CO}_2$  を利用すると、培養液はアルカリ性に傾き、 $\text{CO}_2$  の溶解度が上昇する。この培地に  $\text{CO}_2$  を含んだバイオガスを通気することで、pH と溶存無機炭素 (dissolved inorganic carbon; DIC) を一定に保つことができ、 $\text{CO}_2$  供給とバイオガス精製を同時に達成することができる。さらに、微細藻類培地として消化液を用いることで、メタン発酵から生じる排液および排ガスを包括的に利用するプロセスを構築できる可能性がある。

従来の微細藻類を用いたガス精製プロセスでは、 $\text{CO}_2$  濃度 5 ~ 15% 程度の燃焼ガスを対象として微細藻類培養槽に直接ガスを供給しており (Keffer & Kleinhertz 2002, Van Den Hende et al. 2012)、バイオガスを藻類培養槽に直接供給した場合には高濃度  $\text{CO}_2$  による微細藻類の成長阻害 (Meier et al. 2015) や精製ガス中への酸素の混入 (Posadas et al. 2015) という問題が生じていた。

これらの問題を受けて、 $\text{CO}_2$  吸収塔と微細藻類培養槽を用いた 2 槽循環型ガス精製プロセスが提唱された (González-López et al. 2012, Chi et al. 2013, Meier et al. 2015, Posadas et al. 2015, Serejo et al. 2015)。このプロセスでは、高濃度の  $\text{CO}_2$  ガスを含むバイオガスを吸収塔に通気し、 $\text{CO}_2$  ガスを液中に溶解させた状態で液分を培養槽に供給することで、高濃度  $\text{CO}_2$  による微細藻類の成長阻害を回避することが可能となった。さらに精製ガスを培養槽からではなく吸収塔上部で回収することで、精製ガス中への  $\text{O}_2$  の混入が低減することが示された。また、供給ガス量 (G) に対する  $\text{CO}_2$  吸収塔への培地返送量 (L) の比率 L/G 比を調整することで精製ガス中の  $\text{CO}_2$  と  $\text{O}_2$  濃度を調整し、ガス精製能

の向上が可能となった (Meier et al. 2015, Posadas et al. 2015, Toledo-Cervantes et al. 2016, 2017)。しかし、これらの 2 槽循環型ガス精製プロセスの既往研究では、ほとんどが開放系培養池を用いた微細藻類バクテリア共生系で運転されており、①生産されるバイオマスの価値が低いこと、および②容積あたりの微細藻類生産性が低く、実規模のメタン発酵槽から得られる量のバイオガス精製を行うには膨大な容積の微細藻類培養槽が必要となることが課題であった。

この課題を解決するために、2 槽循環型ガス精製プロセスの微細藻類培養槽に、光供給効率の高いフラットパネル型リアクターを用いて純粋培養を行うことで、高付加価値な藻類バイオマスの生産と、容積当たりのガス精製性能の向上が期待できる。しかし一方で、閉鎖系での微細藻類生産により  $\text{O}_2$  生産量の増加や  $\text{CO}_2$  利用量の変化から、最適な L/G 比が変化する可能性がある。高いバイオマス生産性とガス精製効率を同時に達成するには、L/G 比やガス供給速度を検討する必要がある。

そこで本研究では、微細藻類を用いた 2 槽循環型ガス精製プロセスにおける高いバイオマス生産性・ $\text{CO}_2$  回収率を達成することができる L/G 比を明らかにすることを目的とした。

## 2. 材料と方法

微細藻類は、*Chlorella sorokiniana* Shihira & R.W.K-rauss NIES-2173 株を使用した。メタン発酵消化液は、神奈川県横浜市北部汚泥資源化センターから、下水処理場の余剰活性汚泥を処理するメタン発酵槽由来のものを使用した。メタン発酵汚泥を遠心処理して得た上澄み液を収集し、300 ~ 400 mL ずつ分注して使用直前まで -20°C で冷凍保存した。使用時には、自然解凍後に遠心処理を行った。滅菌処理には、消化液を培地として調整後、オートクレーブ (SX-500, TOMY) を用いて 70°C、1 時間の加熱滅菌処理を行った。

本研究ではまず消化液を *C. sorokiniana* の増殖に適

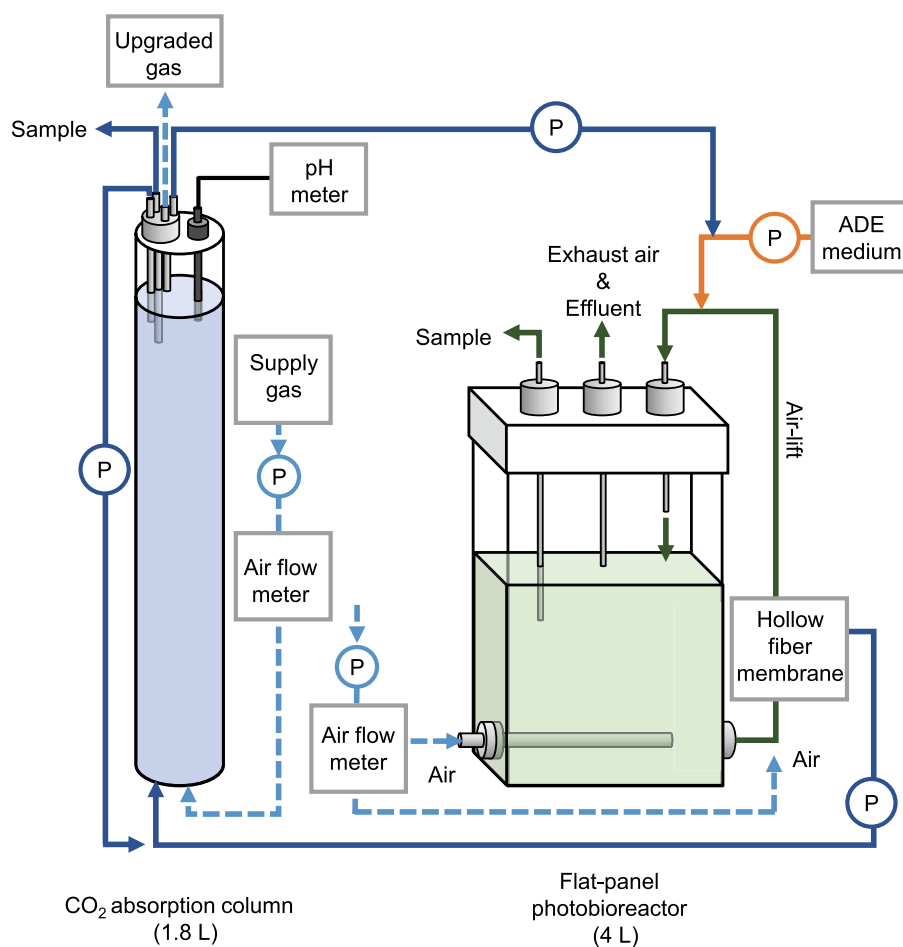


Fig. 1. Schematic diagram of the two-phase CO<sub>2</sub> absorption and microalgae cultivation process.

した性状に調整するため、消化液濃度、pH、DIC 濃度、および金属添加条件の最適化を行った。次に最適化された消化液培地を用いて 2 槽循環型 CO<sub>2</sub> ガス回収プロセスの運転条件の検討を行った (Fig. 1)。

## 2.1. 消化液培地の最適化

微細藻類の培地の栄養源として消化液を使用するため、微細藻類の増殖に適した培地の調整を行った。

### 2.1.1. 消化液濃度、初期 pH、溶存無機炭素濃度

最初に、純水を用いて異なる倍率で希釈した消化液を用いて微細藻類の培養実験を行った。純水に対する消化液の添加濃度は 10、17、25、50、100% の計 5 条件とした。

次に、最適濃度の消化液を用いて、異なる初期

pH 条件を設定し、微細藻類が最も増殖する pH 条件の検討を行った。初期 pH 条件は、pH 7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、10、11 の計 7 条件とした。初期 pH の調整には、1 mol L<sup>-1</sup> の塩酸と水酸化ナトリウム水溶液を使用した。

決定した消化液濃度および初期 pH の消化液培地を用いて、異なる DIC 濃度で培養実験を行った。実験条件は、0.01、0.05、0.1、0.2、0.4 mol L<sup>-1</sup> の計 5 条件とし、DIC 濃度の調整には炭酸水素ナトリウムを使用した。pH 調整は消化液濃度と DIC 濃度の調整後に滅菌処理を施してから行った。

培養条件は、温度 25℃、光量子束密度 200 μmol (photons) m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>、明暗周期は 24 時間明期とした。培養容器には、有効容積 10 mL のねじ口試験管を使用した。測定項目は、波長 750 nm における光学密度

Table 1. Chemical composition of C medium and PIV metals per 100 mL.

Chemical composition		Unit
C medium (Ichimura, 1971)		
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	15	mg
KNO <sub>3</sub>	10	mg
β - Na <sub>2</sub> glycerophosphate · 5H <sub>2</sub> O	5	mg
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	4	mg
Vitamin B <sub>12</sub>	0.01	μg
Biotin	0.01	μg
Thiamine HCl	1	μg
PIV metals*	0.3	mL
Tris (hydroxymethyl) aminomethane	50	mg
*PIV metals (Provasoli, 1960)		
Na <sub>2</sub> EDTA · 2H <sub>2</sub> O	100	mg
FeCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	20	mg
MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	3.6	mg
ZnCl <sub>2</sub>	1.04	mg
CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0.4	mg
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.25	mg

(OD<sub>750</sub>)とした。測定時には、暗所下でボルテックスを用いて攪拌を行ったのち、吸光光度計 (DR-6800, HACH) を用いた。試験管で測定した光学密度(OD<sub>tube</sub>)の 1 cm 光路長への換算には以下の実測値から算出した換算式を用いた:

$$OD_{750} = 1.85 \times OD_{tube} + 0.036. \quad (1)$$

### 2.1.2. 金属群

消化液濃度、初期 pH、DIC 濃度を決定した消化液培地を用いて、異なる金属群の添加条件を設定し、比較培養を行った。比較培養実験に使用した金属群は、*C. sorokiniana* ストック培養に用いる C 培地 (Ichimura 1971; Table 1) をもとに Mg、および PIV 微量金属溶液

(Provasoli 1960)を構成する Fe、Mn、Zn、Co、Mo の計 6 種類を使用した。

実験条件は、基準となる C 培地、金属群を加えない消化液培地、消化液に各微量金属を 1 種類ずつ加えた条件、すべての PIV 微量金属群を加えた条件、Mg のみを加えた条件、Mg に各種微量金属を 1 種類ずつ加えた条件、Mg と PIV 微量金属群を加えた条件の計 15 条件とした (Table 2)。微量金属群を加える条件では、金属群の析出を防ぐため、C 培地と同量の EDTA を添加した。

培養条件は温度 25℃、光量子束密度 200 μmol (photons) m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>、明暗周期を明期 12 時間: 暗期 12 時間とした。培養容器には 96 ウェルプレートを使用した。実験期間中にウェル内の水分が蒸発することを防

Table 2. Experimental series of metal optimization tests.

Experimental condition	Metals					
	Mg	Fe	Mn	Zn	Co	Mo
C medium	+	+	+	+	+	+
ADE	-	-	-	-	-	-
ADE + Fe	-	+	-	-	-	-
ADE + Mn	-	-	+	-	-	-
ADE + Zn	-	-	-	+	-	-
ADE + Co	-	-	-	-	+	-
ADE + Mo	-	-	-	-	-	+
ADE + PIV metals	-	+	+	+	+	+
ADE + Mg	+	-	-	-	-	-
ADE + Mg + Fe	+	+	-	-	-	-
ADE + Mg + Mn	+	-	+	-	-	-
ADE + Mg + Zn	+	-	-	+	-	-
ADE + Mg + Co	+	-	-	-	+	-
ADE + Mg + Mo	+	-	-	-	-	+
ADE + Mg + PIV metals	+	+	+	+	+	+

+: added; -: not added in each experiment.

ぐため、最縁部のウェルには滅菌水を配置し、培養時にはパラフィルムを用いて蓋と本体を密閉したうえで、チャック付クリアパックでプレートを覆った。培養期間中は攪拌装置 (SHM-2002, LMS) を用いて常時攪拌を行った。測定は、マイクロプレートリーダー (EPOCH 2, BioTek) を用いて波長 750 nm における光学密度を測定した。消化液添加培地では 24 時間後に析出に起因するとみられる OD<sub>750</sub> の上昇が確認されたため、これを差し引いた値を結果の解析に用いた。

## 2.2. 2 槽循環型ガス精製プロセスを用いた CO<sub>2</sub>

### ガス回収

#### 2.2.1. 実験条件

微細藻類の培養槽には、有効容積 4.0 L のアクリル樹脂製フラットパネル型リアクターを使用した (Fig. 1)。培養条件を温度 25°C、光量子束密度  $500 \pm 58 \mu\text{mol} (\text{photons}) \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 、明暗周期 24 時間明期とし、消化液培地を培養槽内の希釈速度が  $0.5 \text{d}^{-1}$  となるように供給

して連続培養を行った。培養槽内の水温調節は、培養槽背面に設計された水槽に開放系冷却循環装置 (CTP-1000, EYELA) で冷却水を循環させることで調節した。光源には昼白色蛍光灯 (メロウ Z ロングライフ, FL20S-SENC/18LLN, 東芝) を使用した。

リアクター内は下部に設置した散気管から濡れ空気を  $0.5 \text{L min}^{-1}$  で通気して曝気攪拌を行った。また培養 10 日目以降には、リアクター底面へのバイオマスの沈澱を防ぐため、リアクター内部に攪拌子を入れて常時攪拌を行った。消化液培地は約 5 ~ 7 日ごとに新しく作成し、オートクレーブ滅菌された 20 L ポリプロピレンボトルから供給した。

吸収塔には、有効容積 1.8 L のアクリル樹脂製円筒形リアクターを使用した (Figure 1)。供給ガスには、バイオガスを模して安全性の高い N<sub>2</sub> ガスと CO<sub>2</sub> ガスを約 65:35 で混合したガスを使用した。供給速度は事前の *C. sorokiniana* 培養試験で見られた培養槽の DIC 濃度の減少分と CO<sub>2</sub>-C 供給速度が同等になるよう、7.31

± 0.47 L d<sup>-1</sup> で一定とした。混合ガスはガスバッグからエアポンプ (HIBLOW, KP-6035S, TECHNO TAKATSUKI) を使用して供給した。吸収塔は塔上部から下部へ塔内の液分を 30 mL min<sup>-1</sup> の速度で常時循環させて攪拌した。

培養槽から吸収塔への供給には、藻類細胞に対する CO<sub>2</sub> 阻害を防止するため、中空糸膜 (マイクロザ® MF ラボモジュール PSP-103, 旭化成) を用いて濾過した濾液を供給した。培養槽側面下部からチューブを延ばして中空糸膜を接続し、内部を濡れ空気 0.5 L min<sup>-1</sup> で通気を行いエアリフトの形式で内部に培養液を流動させた。2 槽間の液循環速度は、運転 0 日目から 9 日目までを 4 L d<sup>-1</sup>、9 日目から 14 日目までを 2 L d<sup>-1</sup>、14 日目から 20 日目までを 1 L d<sup>-1</sup> (L/G 比はそれぞれ 0.54、0.27、0.14) と段階的に変化させた。

### 2.2.2. 測定項目

培養槽では波長 750 nm における光学密度および乾燥重量を、吸収塔では供給ガスと精製ガスのガス組成を、そして両槽で pH および DIC 濃度を測定した。光学密度は紫外可視分光光度計 (UV-2450, 島津)、培養槽内の pH には卓上型 pH メーター (D-51, HORIBA)、吸収塔内の pH には pH ロガー (17SD, SATO TECH [pH 電極: InPro 3030/325, Mettler Toledo]) を用いて測定を行った。乾燥重量は、粒子保持能 0.7 μm のガラス繊維濾紙 (GF/F 25mm, Whatman) 上に捕集し純水で洗浄した試料を 60°C のドライオーブン (DG-82, YAMATO) で 1 日以上乾燥させた後、精密電子天秤 (UMX 2, Mettler Toledo) で計量を行った。DIC 濃度は、試料を孔径 0.7 μm のガラス繊維濾紙 (GF/F 25mm, Whatman) で濾過後、TOC 計 (TOC-V CSH, 島津) の DIC 測定メソッドを用いて塩酸処理後の試料に曝気をし、揮散した CO<sub>2</sub> 量を計測することにより定量した。ガス組成は、ガスクロマトグラフィー (GC-2014, 島津 [分析カラム: Shincarbon-ST 6.0 m × 3.0 mm I.D., キャリアガス: ヘリウム]) を用いて測定した。

## 3. 結果

### 3.1. 消化液培地の最適化

#### 3.1.1. 消化液濃度、初期 pH、溶存無機炭素濃度

異なる消化液濃度での培養では、10 ~ 25% の条件で OD<sub>750</sub> 0.15 程度までの増殖が見られた一方で、50% および 100% 条件ではほとんど増殖が見られず、0.067 ~ 0.096 の間に留まった (Fig. 2a)。10 ~ 25% の条件では、最大比増殖速度が 0.47 ~ 0.55 d<sup>-1</sup> となり、10% 消化液濃度で最も高い OD<sub>750</sub> 0.156 が得られた。

10% 消化液を用いて異なる初期 pH 条件で行った培養では、pH7 ~ 9 の条件で増殖が確認され、pH10 以上ではほとんど増殖が見られなかった (Fig. 2b)。pH7.0 および 8.0 で他の系列よりも有意に高い比増殖速度が得られ ( $p < 0.01$ )、それぞれ 0.95 および 1.05 d<sup>-1</sup> であった。pH8.0 では他の系列の 1.5 倍と有意に高い ( $p < 0.01$ ) 最大 OD<sub>750</sub> 0.34 が確認された。

10% 消化液、pH8 で行った異なる DIC 濃度下での培養試験では、0.4 mol L<sup>-1</sup> の最も高濃度条件を除いて、全ての条件でこれまでの試験よりも高い最大比増殖速度 1.26 ~ 2.04 d<sup>-1</sup> が得られた (Fig. 2c)。中でも DIC 濃度 0.05 および 0.1 mol L<sup>-1</sup> では倍加時間 8.2 ~ 9.5 h が確認され、最大 OD<sub>750</sub> も 1.05 とこれまでで最も高い値が得られた。

#### 3.1.2. 金属群

最適化された消化液培地を用いて、異なる金属群添加条件による培養試験を行った (Fig. 3)。消化液に金属を単独で添加した実験では、Mn 添加区、PIV 添加区、および Mg 添加区で消化液区よりも高い比較的良好な増殖が確認された (Fig. 3a)。しかしこれらの比増殖速度および最終 OD<sub>750</sub> は C 培地区と比較してそれぞれ約 4 倍および 2 倍の差があった。また、Fe、Co、Mo 添加区ではほとんど増殖が確認されず、消化液単独区よりも最終 OD<sub>750</sub> が低かった。

最適消化液培地に Mg と各種微量金属を組み合わせて添加した培養試験では、Mn 添加区と PIV 添加区

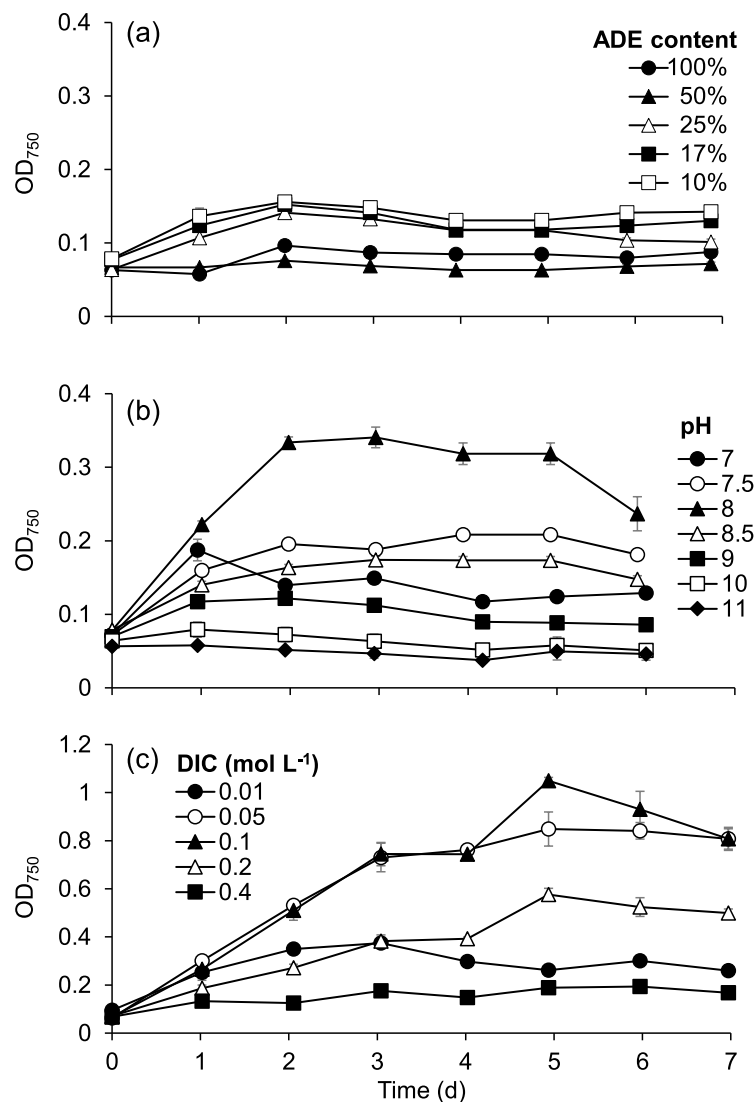


Fig 2. Growth curves of *Chlorella sorokiniana* under different (a) anaerobic digestion effluent (ADE) content, (b) initial pH, and (c) initial dissolved inorganic carbon (DIC) concentrations. Growths are expressed in optical density at 750 nm (OD<sub>750</sub>) with means  $\pm$  standard deviation (N = 3).

でC培地と同等の最終 OD<sub>750</sub> が確認された (Fig. 3b)。特に Mn 添加区ではC培地の最大比増殖速度  $1.1 \pm 0.1 \text{ d}^{-1}$  に近い  $0.83 \pm 0.03 \text{ d}^{-1}$  と最も高い値が得られた。一方で、Mg に加えて Fe、Zn、Co、Mo を添加した試験区では、単独添加試験と同様に、消化液区よりも低いか、あるいはほとんど増殖が見られなかった。

### 3.2. 2槽循環型ガス精製プロセスを用いた CO<sub>2</sub> ガス回収

消化液培地の pH は平均  $8.39 \pm 0.15$ 、培養槽内の pH は平均  $9.56 \pm 0.10$  で実験期間を通して比較的安定し、培養槽の pH が供給培地よりも約 1 程度高い値が維持された (Fig. 4a)。一方、吸収塔内の pH は L/G 比 0.5 条件で  $8.20 \pm 0.34$  と、L/G 比 0.3 および 0.1 条件の  $7.82 \pm 0.09$ 、 $7.79 \pm 0.13$  と比較して有意に高かった ( $p < 0.01$ )。

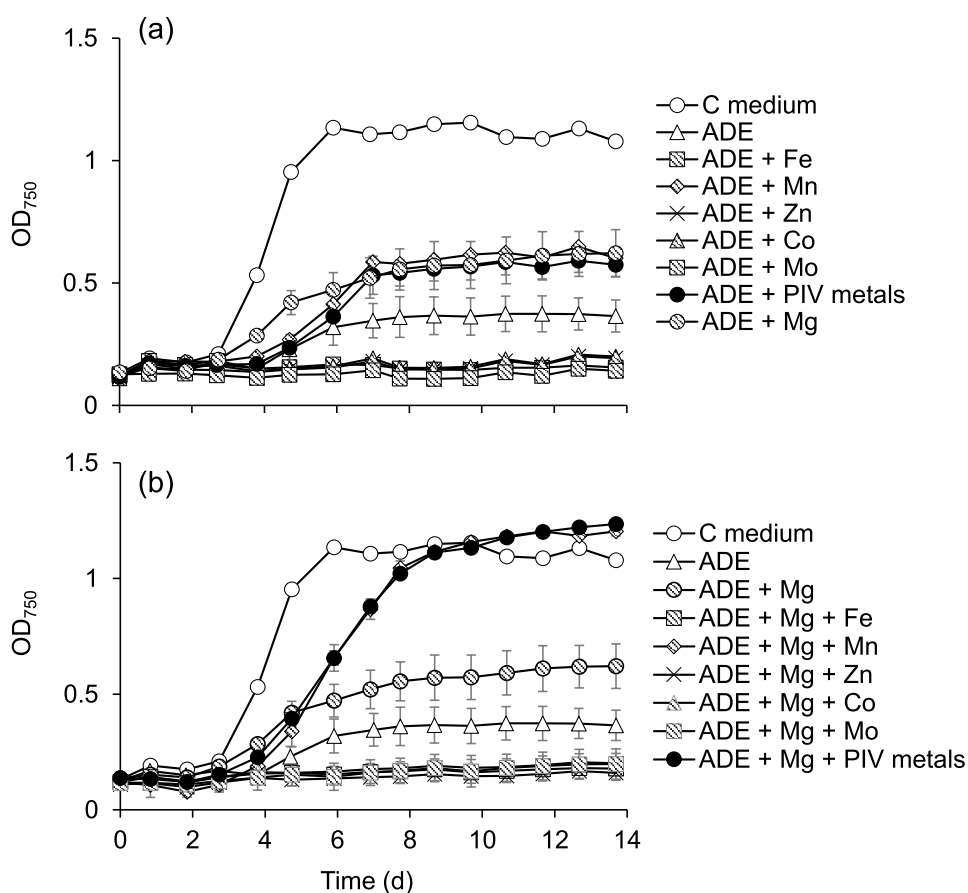


Fig 3. Growth curves of *Chlorella sorokiniana* in diluted anaerobic digestion effluent (ADE) with various metal supplementing conditions; (a) only PIV trace metals; and (b) combinations of Mg and PIV metals. Growths are expressed in optical density at 750 nm ( $OD_{750}$ ) with means  $\pm$  standard deviation ( $N = 3$ ). Growth in C medium was added in each figure as a control.

培養槽内の乾燥重量は、L/G 比 0.5、0.3、0.1 条件でそれぞれ  $390 \pm 56$ 、 $295 \pm 60$ 、 $468 \pm 150 \text{ mg L}^{-1}$  であり (Fig. 4b)、若干の変動がみられた。特に L/G 比 0.3 条件と 0.1 条件にかけては有意に増加した ( $p < 0.05$ )。DIC 濃度は、実験期間を通して安定しており、消化液培地が平均値  $1308 \pm 48 \text{ mg L}^{-1}$ 、培養槽内が  $1093 \pm 41 \text{ mg L}^{-1}$ 、吸収塔内が  $1288 \pm 45 \text{ mg L}^{-1}$  であり、常に培養槽内の DIC 濃度が消化液培地よりも低く、吸収塔で消化液培地とほぼ等しくなっていた。乾燥重量の値より算出した生産速度は平均  $206 \pm 138 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ 、炭素固定速度は  $94.3 \pm 71.5 \text{ mg C L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  となった。

供給ガスの組成は、 $N_2$  ガスが  $64 \pm 2\%$ 、 $CO_2$  ガス

が  $34 \pm 2\%$ 、 $O_2$  ガスが  $1 \pm 1\%$  であった (Fig. 5a)。精製ガスでは、L/G 比が 0.5、0.3、0.1 と減少するにつれて  $CO_2$  ガス割合がそれぞれ  $0.32 \pm 0.21\%$ 、 $2.3 \pm 0.71\%$ 、 $3.2 \pm 1.1\%$  と緩やかに上昇し (Fig. 5b)、L/G 比 0.5 条件のみ有意に低かった ( $p < 0.01$ )。各条件の  $CO_2$  回収率は  $99 \pm 0.7\%$ 、 $94 \pm 2\%$ 、 $91 \pm 2\%$  であった。一方、精製ガス中の  $O_2$  ガスはそれぞれ  $14.4 \pm 4.1\%$ 、 $8.0 \pm 0.7\%$ 、 $8.5 \pm 1.2\%$  と、L/G 比 0.5 条件と比較して 0.3 および 0.1 の条件で有意に低くなった ( $p < 0.01$ )。

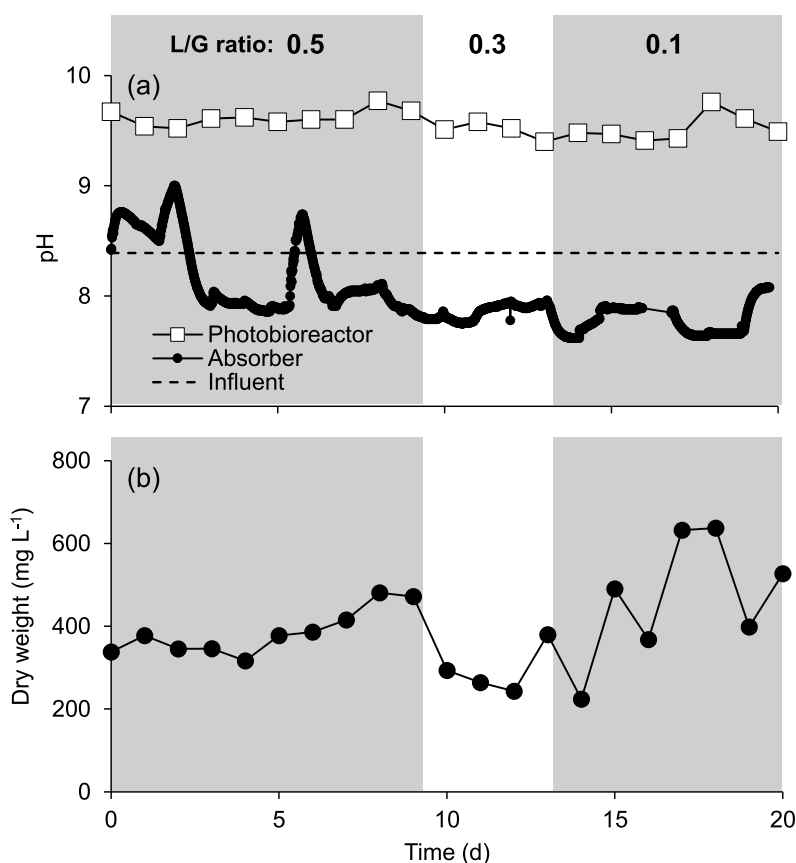


Fig 4. Two-phase CO<sub>2</sub> recovery and algal culture (a) pH and (b) algal cell dry weight. Liquid to gas (L/G) ratio was changed from 0.5 to 0.1 in two steps.

#### 4. 考 察

##### 4.1. 消化液培地の最適化

###### 4.1.1. 消化液濃度、初期 pH、溶存無機炭素濃度

消化液添加濃度は 10 ~ 25% で比較的良好な増殖が確認された (Fig. 2a)。高濃度条件で増殖が見られなかった原因は、高い遊離 NH<sub>3</sub> 濃度にあると考えられる。水に溶けた NH<sub>4</sub> は pH が高いほど NH<sub>3</sub> に遊離した状態の割合が高くなり、25℃の淡水における pKa は 9.25 である (Bates & Pinching 1949)。消化液原液の NH<sub>4</sub>-N 濃度は約 1000 mg L<sup>-1</sup> であり、培養初日 pH 8.98 の遊離 NH<sub>3</sub> 濃度は約 450 mg-N L<sup>-1</sup> つまり 32 mmol L<sup>-1</sup> と試算された (Anthonisen et al. 1976 より試算)。本研究と同じ *Chlorella sorokiniana* NIES-2173 株を用いた既往研究によると、本株の遊離 NH<sub>3</sub> に対する EC<sub>50</sub> は 1.6 mmol L<sup>-1</sup> であり、3 mmol L<sup>-1</sup> 以上ではほとんど増殖

を示さなかった (Sekine et al. 2020)。本研究での消化液原液の遊離 NH<sub>3</sub> 濃度は本株の耐性の 10 倍以上の高濃度であり、これが原因で増殖が見られなかったと示唆された。一方、消化液濃度 10% 条件では pH が 8.56 まで低下したことも相まって遊離 NH<sub>3</sub> 濃度は 1.2 mmol L<sup>-1</sup> まで低下し、比較的高い増殖となったと考えられる。ところが 10% と類似した増殖が得られた 17 ~ 25% 濃度条件でも遊離 NH<sub>3</sub> 濃度は 3.0 ~ 4.5 mmol L<sup>-1</sup> であり、EC<sub>50</sub> を 2 倍程度越えていた。既往研究において NH<sub>3</sub> 阻害の度合いは初期バイオマス濃度が高くなると緩和されることが報告されている (Uggetti et al. 2014)。既往研究の EC<sub>50</sub> 1.6 mmol L<sup>-1</sup> (Sekine et al. 2020) は初期光学密度が約 0.02 で試験されており、本研究では 0.05 以上と 2 倍以上で設定したため、阻害が緩和されていた可能性がある。本研究では遊離 NH<sub>3</sub> 濃度が常に EC<sub>50</sub> 以下となる 10% 濃度条件を最適値と定め、そ



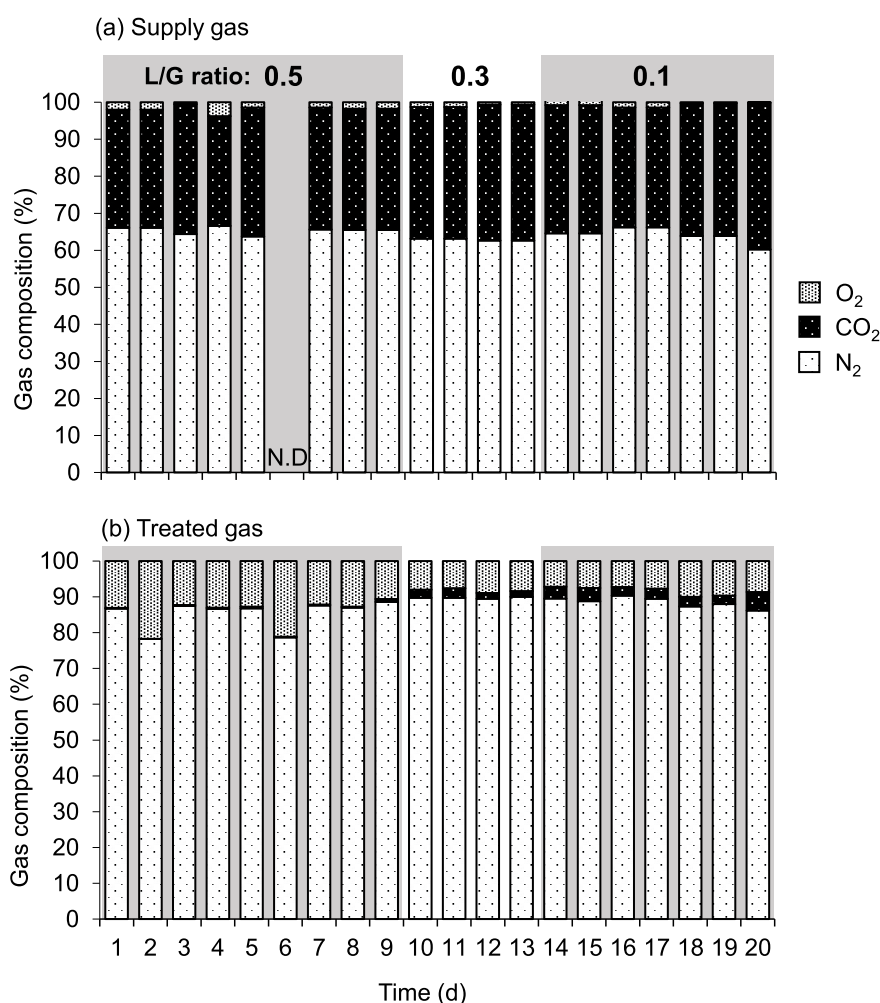


Fig. 5. Gas composition during the two-phase CO<sub>2</sub> supply and algal culture in (a) supply gas and (b) treated gas. Liquid to gas (L/G) ratio was changed from 0.5 to 0.1 in two steps.

の後の実験に供した。

続く pH の最適化では、pH10 未満の条件で増殖が確認された (Fig. 2b)。pH10 以上の条件では遊離 NH<sub>3</sub> が 6.4 mmol L<sup>-1</sup> を越え、増殖を完全に抑制していたと考えられる。一方で pH7 ~ 8.5 では遊離 NH<sub>3</sub> は 1.1 mmol L<sup>-1</sup> 以下であり、増殖をほとんど妨げない濃度だったと示唆された。その中で pH8 条件では突出して高い増殖が見られた。その明確な原因は不明であるが、繰り返し試験 (N = 6) を行ったところ、ほぼ同様の結果が得られたことから、測定誤差の可能性は棄却された。pH8 で増殖が高かった要因の一つの可能性として、消化液培地の DIC の低さが考えられる。後述の異なる DIC 濃度最適化試験で、最も低い DIC 濃度 0.01 mol

L<sup>-1</sup> 条件では、0.05 ~ 0.1 mol L<sup>-1</sup> と比較して増殖が大きく抑制された。消化液原液の DIC は約 1000 mgC L<sup>-1</sup> であったが、70°C 1 時間の滅菌処理および 10 倍希釈によって DIC 濃度が減少していた可能性がある。そのため、pH 最適化実験でも DIC が増殖の律速になっていた可能性がある。pH はアルカリ性に傾くほど空気中の CO<sub>2</sub> を取り込みやすく、また *Chlorella* 属は重炭酸を炭素濃縮機構によって光合成に利用できることから (Beardall & Raven 1981, Fan et al. 2015)、pH7 や 7.5 の条件よりも pH8 で増殖が高くなった可能性がある。その他の要因として pH 変化に伴う金属分の遊離などが考えうるが、確かなところは今後の研究が必要である。

DIC 濃度条件では、0.05 mol L<sup>-1</sup> と 0.1 mol L<sup>-1</sup> の条

件で最も高い増殖が得られた。上述のとおり、最も添加量の少ない  $0.01 \text{ mol L}^{-1}$  ではおそらく DIC 律速のために増殖が抑制された。一方で、 $0.2 \text{ mol L}^{-1}$  以上の条件で十分な増殖が得られなかった要因として考えられるのは、高イオン強度である。本実験では、DIC 濃度の調整に  $\text{NaHCO}_3$  を使用した。本種は淡水種であり、DIC 濃度が増加するにつれて培地中の Na 塩が増加し、増殖が低かったと考えられる。

以上の結果より、本研究で用いた消化液は消化液添加濃度 10%、pH8、DIC  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$  に調整することで最も良好に *C. sorokiniana* の培地として使用できることが明らかとなった。

#### 4.1.2. 金属群

まず個別の金属の影響を調査するため、単独 (PIV のみ複合) で金属を添加したところ、Mn、Mn を含む PIV、Mg の条件で消化液区よりも高い増殖が確認された (Fig. 3a)。このことから、本消化液培地では Mn と Mg が欠乏している可能性が示唆された。既往研究では水草をメタン発酵処理した消化液で Mg が欠乏することが報告されたが (Kimura et al. 2019)、Mn の欠乏については本研究で初めて確認された。Mn のみと Mg のみでは C 培地の増殖と比較して半分以下の増殖であったため、2つを組み合わせる必要が示唆された。

そこで、続いて Mg と各種金属を組み合わせ、複合的な影響を確認した。その結果、Mg + PIV 微量金属群と Mg + Mn の条件で最も高い増殖が得られ (Fig. 3b)、Mg と Mn が本消化液培地で不足していたことが認められた。これら2つの条件では最終光学密度は C 培地と同等であったことから、C 培地と同程度のバイオマス収量が得られる培地が作成できたことが分かる。一方で最大比増殖速度は C 培地の  $1.1 \pm 0.1 \text{ d}^{-1}$  に対して Mg + Mn で  $0.83 \pm 0.03 \text{ d}^{-1}$  であり、C 培地が有意に高かった ( $p < 0.05$ )。既往研究では、水草メタン発酵由来消化液を用いて本研究と同じ株を培養した際に、C 培地と同等の増殖速度が得られた (Kimura et al.

2019)。本研究では消化液は、下水汚泥を処理するメタン発酵槽からの排水に凝集沈殿剤を添加した後に遠心分離した脱水濾液である。基質や凝集沈殿剤の成分が何らかの阻害影響を与えた可能性があるが、詳細は不明である。

また、Mg に加えて Fe、Zn、Co、Mo をそれぞれ単独で添加した4系列ではほとんど増殖が確認されなかった。Mg のみの条件よりも増殖が低かったのは、これら重金属は微細藻類に対する毒性も有しているためと考えられる (Guanzon et al. 1994)。一方で同量の各重金属が添加されている Mg + PIV 条件で高い増殖が見られたのは、単独添加条件では増殖制限のある状態であるため阻害影響が強かったのではないかと考えられる。このことから、どの金属が不足しているか不明な消化液培地を用いる場合には PIV 微量金属群のような複数種がバランス良く添加されている状態のものを添加することで増殖阻害を抑制できる可能性が示唆された。

本実験に使用したメタン発酵消化液では、微細藻類が増殖するうえで Mg と Mn が不足していることが明らかとなった。基質にココナダモを使用したメタン発酵消化液を用いて微細藻類培養を行った既往研究でも Mg が不足することが明らかとなっている (Kimura et al. 2019)。消化液中の  $\text{Mg}^{2+}$  はリン酸や有機物と反応しやすく、藻類が使用しづらくなることが示されている (Park et al. 2010)。このことから、消化液を用いて微細藻類を培養する場合、Mg が不足しやすい金属類であると考えられる。メタン発酵消化液を用いた微細藻類の培養では、メタン発酵に使用される基質の違いによって生産されるメタン発酵消化液の組成が変化し、微細藻類の増殖速度が変化することが明らかになっている (Dębowski et al. 2017)。本研究で用いた消化液は下水汚泥を処理する嫌気汚泥槽から採取されたものであるが、処理基質や凝集剤などの添加剤、処理プロセスの違いにより、ココナダモ由来消化液では不足しなかった Mn が不足したと考えられる。今後新たなメタン発酵消化液を微細藻類培地として用いる場合には、本研

究と同様に消化液に不足する微量元素群を調査し、補填条件を検討する必要があると考えられる。

#### 4.2. 2槽循環型ガス精製プロセスを用いたCO<sub>2</sub>ガス回収

最適化された消化液培地を用いた2槽循環型ガス精製プロセスを実施した。実験期間を通して各槽のpHは比較的安定していた。供給培地から培養槽にかけてはpHが約8.4から約9.6まで上昇し、その後吸収塔で7.8～8.2程度へと減少した(Fig. 4a)。これは培養槽において培地中のDICを消費することでpHが上昇し(Zeebe & Wolf-Gladrow 2001)、その後CO<sub>2</sub>の溶解により再びpHが減少したことを示している。吸収塔のpHはL/G比0.5から0.1にかけて減少させると、培地に対するCO<sub>2</sub>の供給割合が増加するため、塔内のpHはやや低下した。この塔内のpH低下がL/G比0.3および0.1におけるCO<sub>2</sub>回収率の漸減(91～94%)に影響したと考えられる。また、低L/G比でも培養槽に対するCO<sub>2</sub>供給速度は変化しないため、L/G比0.1条件での低い吸収塔pHは培養槽pHに影響しなかった。

CO<sub>2</sub>回収率は全体を通して90%以上の高い値を示し、特にL/G比0.5条件では99%とほぼすべての

CO<sub>2</sub>が溶解した。一方で同条件ではO<sub>2</sub>の混入割合が14%と高く、微細藻類培地の溶存酸素が精製ガスに多く溶け出した。L/G比を0.3、0.1と下げるとCO<sub>2</sub>回収率はそれぞれ94、91%と減少する一方で、O<sub>2</sub>混入割合が8%程度まで減少した。このようにL/G比は低いとCO<sub>2</sub>吸収が不十分となる一方で、高すぎると培養液から酸素がより多く混入してしまうことが確認された。

2槽循環型ガス精製プロセスを用いた既往研究でも同様な傾向が見られている。例えば開放系リアクターで微細藻類バクテリア共生系を用いてバイオガス精製を行った既往研究では、CO<sub>2</sub>濃度はL/G比1から0.5にかけては1%以下の非常に低い値を取る一方、L/G比0.3では8.3%まで急激に増加した(Toledo-Cervantes et al. 2017)。同既往研究でO<sub>2</sub>濃度はL/G比1の際の0.8%から、L/G比0.8、0.5にかけて0.1%、0.01%と減少した。このようにL/G比の影響は培養槽やリアクター形状など複数の要因によって異なるため、リアクター運転条件に応じて精製ガス中のCO<sub>2</sub>及びO<sub>2</sub>濃度を低く保つ最適条件を検討する必要がある。

本研究のL/G比0.5における精製ガス中のCO<sub>2</sub>濃度は既往研究の中でも低く、高いCO<sub>2</sub>回収率が得られたことがわかった(Table 3)。一方で、同程度の

Table 3. Comparison of CO<sub>2</sub> gas upgrading performance using two-phase recirculation process.

Photobioreactor (PBR)	Microorganisms	PFD ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )	Biomass productivity ( $\text{g L}^{-1} \text{d}^{-1}$ )	Gas/PBR volume ( $\text{L L}^{-1} \text{d}^{-1}$ )	L/G ratio	CO <sub>2</sub> gas composition (%)		O <sub>2</sub> in upgraded gas (%)	Reference
						Supply gas	Upgraded gas		
HRAP	Algal-bacterial mixture	104±25	0.09	0.25	10.7	29.5	6.8±0.9	1.2±0.2	Posadas et al., 2015
HRAP	Algal-bacterial mixture	420±105	0.05	N.D.	1	29.5	0.4±0.1	0.03±0.04	Toledo-Cervantes et al., 2016
HRAP	Algal-bacterial mixture	1500±600	0.06	0.32	0.5	29.5	0.8±0.0	0.01±0.0	Toledo-Cervantes et al., 2017
Bubble column	<i>Nannochloropsis gaditana</i>	N.D.	0.1	1.05	3.30	30	5.8	5.3	Meier et al., 2015
Bubble column	<i>Nannochloropsis gaditana</i>	N.D.	0.1	1.05	6.78	30	2	6	Meier et al., 2015
Open PBR	<i>Nannochloropsis gaditana</i>	100±20	0.03	0.11	1.82	28	1.9±0.6	1.2±0.1	Meier et al., 2015
Flat-pannel PBR	<i>Chlorella sorokiniana</i>	500±58	0.21±0.05	1.83	0.5	32.7	0.3±0.2	14±4	This study
Flat-pannel PBR	<i>Chlorella sorokiniana</i>	500±58	0.13±0.12	1.83	0.3	35.8	2.3±0.7	8.0±0.7	This study

\*HRAP: high-rate algal pond; PFD: photon flux density; N.D.: no data available.

CO<sub>2</sub> 回収率が得られる条件で、他の研究よりも O<sub>2</sub> 混入量が多かった。これにはいくつかの要因が絡んでいると考えられる。

まず始めに、用いた微生物の違いが影響した可能性がある。既往研究の多くが微細藻類バクテリア共生系による H<sub>2</sub>S や NH<sub>4</sub> の酸化も同時に目的としており (Posadas et al. 2015, Toledo-Cervantes et al. 2016, 2017)、有機物の分解も含めて系内で酸素が活発に利用される状態であった。これらの系列では精製ガスへの O<sub>2</sub> 混入量は最適条件下で 0.01 ~ 1.2% であり (Table 3)、L/G 比を 60 程度まで高くしても 7% 程度に保たれた (Toledo-Cervantes et al. 2016)。一方の微細藻類純粋培養を用いた研究では、特に閉鎖系培養槽を用いた場合は最適条件でも 6% と高い O<sub>2</sub> 混入量が見られた (Meier et al. 2015)。本研究でも *C. sorokiniana* の純粋培養を用いたため、他の微生物による酸素消費が起こらず、O<sub>2</sub> 混入量が高くなったと考えられる。

次に、培養槽の形状も関係すると考えられる。これまでの多くの研究が開放系培養池を用いたが、常に外気と気液交換が行われることと、光路長が長く (0.15 ~ 0.3 m) 容積あたりの酸素生成量が低いため、本研究よりも溶存酸素が空気平衡と近い値だったことが推察される。本研究のように閉鎖系培養槽で光路長が短い (0.05 m) 場合は十分に溶存酸素が除去されず、CO<sub>2</sub> 吸収塔で精製ガスに酸素が混入してしまった可能性がある。

最後に、微細藻類培養槽 (PBR; photobioreactor) 容積に対するバイオガスの供給量 (Gas/PBR) 比も関係する (Meier et al. 2015)。培養槽に対する炭素供給量が不足すると、培地はアルカリ性に傾き、より CO<sub>2</sub> を吸収しやすい状態になる。そうすると低い L/G 比でも CO<sub>2</sub> の溶解に対する推進力が増加し、高い CO<sub>2</sub> 回収率が得られる。既精製ガス中の CO<sub>2</sub> と O<sub>2</sub> 割合が共に低かった研究は 0.32 以下の Gas/PBR 比で実施されている (Table 3)。本研究で用いた Gas/PBR 比は 1.83 だったため、CO<sub>2</sub> 溶解の推進力が低く、高い O<sub>2</sub> 混入量に起因したと考えられる。

CO<sub>2</sub> 溶解の推進力の低さは、炭素収支の結果からも確認された。培養槽と培地の DIC を比較したとき、 $208 \pm 83 \text{ mgC L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  の速度で減少したのに対し、微細藻類の炭素固定速度は  $94.3 \pm 71.5 \text{ mgC L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  であった。この差分は曝気により CO<sub>2</sub> として系外に排出されていると考えられ、系外排出の DIC 減少全量に対する寄与率は 55% であった。同様の結果は海産藻類 *Nannochloropsis gaditana* を用いて高い Gas/PBR 比 1.05 で実施した研究でも確認されており、バイオガス由来無機炭素の 46% が系外に CO<sub>2</sub> として排出された (Meier et al. 2015)。一方、同じ研究で Gas/PBR 比を 0.11 まで減少させたところ、バイオガス由来の無機炭素だけでは増殖を維持できず、系外の CO<sub>2</sub> が培養液中に吸収され光合成に利用された (Meier et al. 2015)。本研究で用いた実験系でも Gas/PBR 比を最適化することで、より性能の高いバイオガス精製を実施できる可能性がある。さらに、CO<sub>2</sub> 溶解の推進力を向上させるには、高アルカリ性藻類を用いることも想定され、実際に高い CO<sub>2</sub> 回収率がこれまで示されている (Chi et al. 2011, Kishi et al. 2019)。しかし消化液を用いた高アルカリ性種の培養には大量のアルカリ剤が必要であるため、消化液での同様の研究が待たれる。

また、本研究では速いバイオマス生産性を保つために培養槽の希釈速度を  $0.5 \text{ d}^{-1}$  としていたが、短い滞留時間 (2 日) のために排出液に栄養塩が残存した。消化液培地中のアンモニア ( $106 \pm 13 \text{ mg-N L}^{-1}$ ) およびリン酸 ( $11.2 \pm 0.3 \text{ mg-P L}^{-1}$ ) は培養後にそれぞれ 64% および 75% 残存していた。メタン発酵由来の栄養塩を使い切り、環境負荷を低減するためには、滞留時間を 4 倍の 8 日程度 (希釈速度  $0.13 \text{ d}^{-1}$ ) にする必要があることが明らかとなった。

以上のように今後運転条件を制御することで、メタン発酵で排出される廃棄物である CO<sub>2</sub> ガスや消化液を資源化し、微細藻類バイオマスの生産に利用可能であることが示された。本技術は燃料単価の低いバイオガスを高純度メタンにし、微細藻類バイオマスを高価値資源として利用できるようにすることで、メタン発酵を起

点とするバイオマス系廃棄物の資源化プロセスの普及に貢献すると考えられ、今後の発展が期待される。

## 5. 結 論

本研究では、下水汚泥を基質としてメタン発酵消化液を用いた消化液培地の添加濃度と初期 pH に加えて、DIC 濃度と金属群を調整することで、消化液中の栄養塩を微細藻類の培地として使用することが可能であることが示された。特に金属群の調整では、メタン発酵の基質によって消化液中の金属群の組成が変化し、微細藻類の増殖に必要な金属群のうち調整が必要な金属類が変化することがわかった。メタン発酵バイオガス中の CO<sub>2</sub> ガスを除去する 2 槽循環型ガス精製プロセスにメタン発酵槽から排出される消化液を微細藻類の培地として使用することで、バイオガスからの CO<sub>2</sub> ガス精製と有用な微細藻類を生産するための消化液の有効利用を同時に行うことが可能である。本研究では、この 2 槽循環型ガス精製プロセスの微細藻類の培養槽に、閉鎖型のフラットパネル型リアクターを用いて L/G 比を 0.3 ~ 0.5 に設定することで、高い CO<sub>2</sub> 回収率を保ったまま高いバイオマス生産性を達成することが可能であることがわかった。従来大型培養槽を用いることなく省スペースで供給ガス中の CO<sub>2</sub> ガスをほぼすべて精製ガス中から除去可能であることが明らかとなった。今後は O<sub>2</sub> 混入を防ぐための条件の検討が必要となる。

## 謝辞

メタン発酵消化液は、横浜市北部汚泥資源化センターより提供いただいた。実験の実施にあたって安田万莉氏、田川真子氏、長塚健汰氏に協力いただいた。本研究の一部は環境省環境研究総合推進費 (4-1406) および文科省私立大学研究ブランディング事業の支援を受けた。厚く御礼申し上げる。

## 引用文献

- Ángeles R, Arnaiz E, Gutiérrez J, Sepúlveda-Muñoz CA, Fernández-Ramos O, Muñoz R, Lebrero R (2020) Optimization of photosynthetic biogas upgrading in closed photobioreactors combined with algal biomass production. *J Water Process Eng* 38: 101554.
- Anthonisen AC, Loehr RC, Prakasam TB, Srinath EG (1976) Inhibition of nitrification by ammonia and nitrous acid. *J Water Pollut Control Fed* 48: 835–852.
- Ban S, Toda T, Koyama M, Ishikawa K, Kohzu A, Imai A (2019) Modern lake ecosystem management by sustainable harvesting and effective utilization of aquatic macrophytes. *Limnology* 20: 93–100.
- Bates RG, Pinching GD (1949) Acidic dissociation constant of ammonium ion at 0 to 50°C, and the base strength of ammonia. *J Res Natl Bur Stand* (1934) 42: 419–430.
- Beardall J, Raven JA (1981) Transport of inorganic carbon and the 'CO<sub>2</sub> concentrating mechanism' in *Chlorella emersonii* (Chlorophyceae). *J Phycol* 17: 134–141.
- Chi Z, O'Fallon JV, Chen S (2011) Bicarbonate produced from carbon capture for algae culture. *Trends Biotechnol* 29: 537–41.
- Chi Z, Xie Y, Elloy F, Zheng Y, Hu Y, Chen S (2013) Bicarbonate-based Integrated Carbon Capture and Algae Production System with alkalihalophilic cyanobacterium. *Bioresour Technol* 133: 513–521.
- Dębowski M, Szwaja S, Zieliński M, Kisielewska M, Stańczyk-Mazanek E (2017) The influence of anaerobic digestion effluents (ADEs) used as the nutrient sources for *Chlorella* sp. cultivation on fermentative biogas production. *Waste Biomass Valorization* 8: 1153–1161.
- Fan J, Xu H, Luo Y, Wan M, Huang J, Wang W, Li Y (2015) Impacts of CO<sub>2</sub> concentration on growth, lipid accumulation, and carbon-concentrating-mechanism-related gene expression in oleaginous *Chlorella*. *Appl Microbiol Biotechnol* 99: 2451–2462.
- González-López CV, Acien Fernández FG, Fernández-Sevilla JM, Sánchez Fernández JF, Molina Grima E (2012) Development of a process for efficient use of CO<sub>2</sub> from flue gases in the production of photo-

- synthetic microorganisms. *Biotechnol Bioeng* 109: 1637–1650.
- Guanzon NG, Nakahara H, Yoshida Y (1994) Inhibitory effects of heavy metals on growth and photosynthesis of three freshwater microalgae. *Fish Sci* 60: 379–384.
- Ichimura T (1971) Sexual cell division and conjugation-papilla formation in sexual reproduction of *Closterium strigosum*. *Proc 7th Int Seaweed Symp* 208–214.
- Keffer JE, Kleinheinz GT (2002) Use of *Chlorella vulgaris* for CO<sub>2</sub> mitigation in a photobioreactor. *J Ind Microbiol Biotechnol* 29: 275–280.
- Kimura S, Yamada T, Ban S, Koyama M, Toda T (2019) Nutrient removal from anaerobic digestion effluents of aquatic macrophytes with the green alga, *Chlorella sorokiniana*. *Biochem Eng J* 142: 170–177.
- Kishi M, Yamada Y, Katayama T, Matsuyama T, Toda T (2019) Carbon mass balance in *Arthrospira platensis* culture with medium recycle and high CO<sub>2</sub> supply. *Appl Sci* 10: 228.
- Meier L, Pérez R, Azócar L, Rivas M, Jeison D (2015) Photosynthetic CO<sub>2</sub> uptake by microalgae: An attractive tool for biogas upgrading. *Biomass Bioenergy* 73: 102–109.
- 中川悦光 (2003) ふん尿とエネルギー利用による循環型社会を目指して 八木バイオエコロジーセンターの稼働状況の報告. *システム農学* 19: 9–20.
- 中村真人 (2011) メタン発酵消化液の液肥利用とその環境影響に関する研究. *農村工学研究所報告* 50: 1–57.
- Park J, Jin HF, Lim BR, Park KY, Lee K (2010) Ammonia removal from anaerobic digestion effluent of livestock waste using green alga *Scenedesmus* sp. *Bioresour Technol* 101: 8649–8657.
- Posadas E, Serejo ML, Blanco S, Pérez R, García-Encina P, Muñoz R (2015) Minimization of biomethane oxygen concentration during biogas upgrading in algal–bacterial photobioreactors. *Algal Res* 12: 221–229.
- Provasoli L (1960) Artificial media for fresh-water algae: problems and suggestions. *Ecol Algae Spec Pub* 2: 84–96.
- Sekine M, Yoshida A, Akizuki S, Kishi M, Toda T (2020) Microalgae cultivation using undiluted anaerobic digestate by introducing aerobic nitrification–desulfurization treatment. *Water Sci Technol* 82: 1070–1080.
- Serejo ML, Posadas E, Boncz MA, Blanco S, García-Encina P, Muñoz R (2015) Influence of biogas flow rate on biomass composition during the optimization of biogas upgrading in microalgal–bacterial processes. *Environ Sci Technol* 49: 3228–3236.
- Toledo-Cervantes A, Madrid-Chirinos C, Cantera S, Lebrero R, Muñoz R (2017) Influence of the gas–liquid flow configuration in the absorption column on photosynthetic biogas upgrading in algal–bacterial photobioreactors. *Bioresour Technol* 225: 336–342.
- Toledo-Cervantes A, Serejo ML, Blanco S, Pérez R, Lebrero R, Muñoz R (2016) Photosynthetic biogas upgrading to bio-methane: Boosting nutrient recovery via biomass productivity control. *Algal Res* 17: 46–52.
- Uggetti E, Sialve B, Latrille E, Steyer JP (2014) Anaerobic digestate as substrate for microalgae culture: The role of ammonium concentration on the microalgae productivity. *Bioresour Technol* 152: 437–443.
- Van Den Hende S, Vervaeren H, Boon N (2012) Flue gas compounds and microalgae: (Bio-)chemical interactions leading to biotechnological opportunities. *Biotechnol Adv* 30: 1405–1424.
- Xia A, Murphy JD (2016) Microalgal Cultivation in treating liquid digestate from biogas systems. *Trends Biotechnol* 34: 264–275.
- Zeebe R, Wolf-Gladrow D (2001) CO<sub>2</sub> in Seawater: Equilibrium, Kinetics, Isotopes. Elsevier Science B.V., Amsterdam, 100 pp.