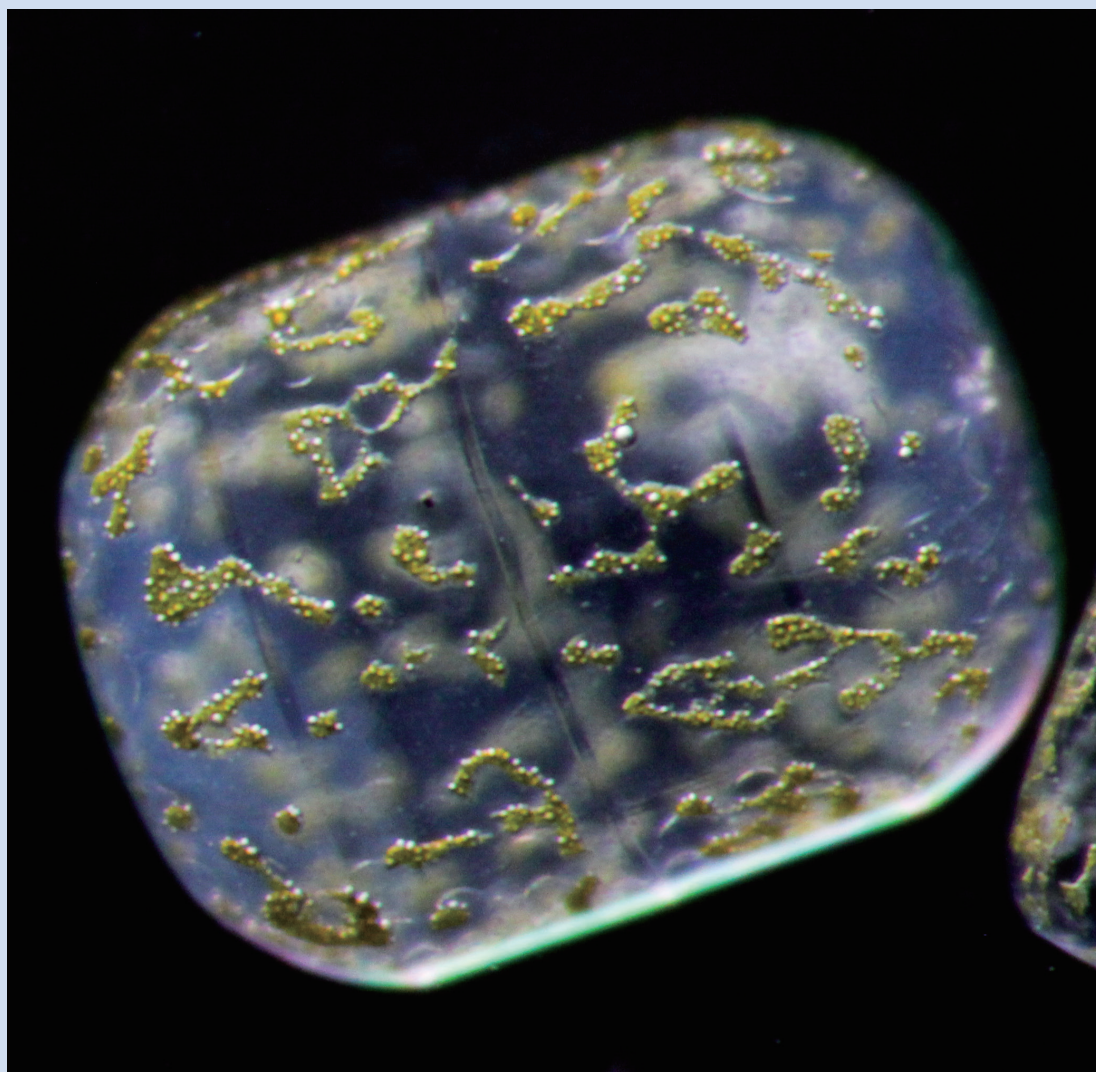


創価大学
プランクトン工学研究

Soka University

Bulletin of Institute of Plankton Eco-Engineering



「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）

桑原ビクター伸一（教育学部）

佐々木諭（看護学部）

中崎清彦（プランクトン工学研究所）

伴 修平（滋賀県立大学）

古谷 研（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無ければならない（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）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。ただし、短報は 250 語程度とする。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、 μM 、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 版で受け付ける。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：珪藻 *Ethmodiscus_gazellae*
（撮影者：下出信次）

Bulletin of Plankton Eco-Engineering Research

No. 4

June 2024

Contents

Review

Effects of microbial inoculation on composting of organic wastes Kiyohiko Nakasaki	1
---	---

Original papers

Isolation of lipid-rich marine diatoms from the coastal waters of the Goto Islands, Japan Mari Yasuda , Minamo Hirahara , Masatoshi Kishi , Tatsuki Toda , Shuichi Yamamoto, Ken Furuya	17
Synthesis of Sr ₄ Nb ₂ O ₉ -N by mechanochemical method and evaluation of their photocatalytic activity Kento Nishi , Kokoro Hirokawa , Tatsushi Matsuyama , Junichi Ida	24
Energy-saving treatment of nitrogen in anaerobic digestate from methane fermentation by a consortium of microalgae and nitrifying bacteria Shin-ichi Akizuki , Germán Cuevas-Rodríguez	32
Examination of dietary microalgae to culture marine copepod <i>Pseudodiaptomus nihonkaiensis</i> Yoshiki Takayama , Shinichi Koga , Tatsuki Toda	42

総説

有機質廃棄物のコンポスト化における微生物接種の効果

中崎清彦^{1*}

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

Effects of microbial inoculation on composting of organic wastes

Kiyohiko Nakasaki^{1*}

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

* *Corresponding author: nakasaki@soka.ac.jp*

2024年4月27日受付、2024年5月6日受理

Abstract Composting converts organic waste into compost and effectively restores soil fertility via the action of microorganisms. As the global population increases, the demand for rapid composting to manage substantial quantities of organic waste also increases. To achieve rapid composting, optimal conditions for moisture content, temperature, oxygen supply, pH, and the C/N ratio should be determined. In addition to controlling these conditions, methods have been developed to accelerate the process by inoculating compost, which is believed to contain high concentrations of effective microorganisms, or cultured microorganisms with high activity in decomposing organic materials. However, the efficacy of microbial inoculation in composting remains controversial. Therefore, this review analyzes and summarizes published studies on appropriate composting systems to clarify the effects of microbial inoculation and the conditions for effective microbial inoculation to improve the composting process.

An appropriate composting system must meet the following conditions: reproducible composting process (differences with and without microbial inoculation are clearly attributable to inoculation), correct assessment of experimental errors, and evaluation based on scientific rationale. A small-scale composting apparatus, in which the composting conditions are strictly controlled, and the same raw material is used, is suitable for obtaining reproducible data. A quantitative method for monitoring the composting process, such as measuring the CO₂ emissions resulting from microbial activity associated with organic matter decomposition, is advantageous for evaluating the effects of microbial inoculation. An example of false evaluation against scientific rationale is the conclusion that non-thermotolerant microorganisms survive the thermophilic phase and significantly contribute to the temperature decline phase when inoculated into compost raw material. Composting is operated with the intention of eliminating human and plant pathogens using thermophilic temperature; hence, inoculated non-thermotolerant microorganisms cannot

survive, rendering such inoculation ineffective.

Microbial inoculation has significant effects when raw compost materials contain inhibitory substances, such as organic acids or furan compounds, which only specific microorganisms can decompose. Organic acid degradation in the compost material and an increase in pH are crucial for accelerated composting. Inoculation of organic acid-decomposing microorganisms into raw materials rich in organic acids is effective for rapid organic acid decomposition and maintaining favorable pH conditions for co-existing composting microorganisms. Consequently, microbial inoculation enhances the succession of composting microorganisms, thereby promoting organic matter decomposition. Effective microbial inoculation in composting was observed when furan compounds were generated during the hydrothermal pretreatment of kitchen refuse to improve the hydrolysis of solid organic material. Inoculation with furan-degrading microorganisms effectively facilitates rapid furan decomposition and accelerates the composting process. In addition, a significant inoculation effect occurs when composting tackles hardly degradable substances, such as polysaccharides and biodegradable plastics, which require microorganisms that are not typically present in high concentrations. The degradation of poly- ϵ -caprolactone, a biodegradable plastic, is accelerated by microbial inoculation. Furthermore, effective inoculation was observed under special composting conditions; only specific microorganisms were active, and the growth conditions of the inoculated microorganisms aligned with the composting conditions.

Under some composting conditions, if the growth conditions of the inoculated microorganisms differ from the composting operating conditions, actively controlling the composting conditions to favor inoculated microbial growth over native microorganisms enhances the microbial inoculation effect. Using the example of producing value-added compost (functional compost) by inoculating suppressive microorganisms against plant pathogens, this review highlights the importance of combining temperature control and timing of microbial inoculation during composting. Overall, integrating microbial inoculation with composting process control is necessary for the stable growth and survival of inoculated microorganisms and the expected benefits during composting.

Keywords: composting, microbial inoculation, organic matter degradation, process control

1. コンポスト化とは何か

コンポスト化は、家庭からの生ごみ、家畜ふんや農作物の残渣、食品工場からの廃棄物、汚泥などの有機質廃棄物を微生物の働きによって分解し、コンポストに変換する方法である。Golueke (1977) はコンポスト化を「有機質廃棄物をコントロールされた条件下で、取り扱い易く、貯蔵性良くそして環境に害を及ぼすことなく安

全に土壌還元可能な状態まで微生物分解すること」と定義している。化学肥料が安価に入手できるようになると、取り扱いが不便なコンポストは、一時期使用されなくなり、耕地への有機物投入量が減少することで土壤中での有機物濃度が低下した。有機物濃度が低下すると土壤中の微生物数が減少し微生物の多様性も失われるが、この現象は地力の低下として知られている。やがて、地力の低下が顕在化するとコンポスト施用の重

要性が再び認識されるようになった。コンポストは、土の中に豊かで変化に富んだ土壌微生物群を養うことによって、耕地での植物の生育を促すとともに、植物に対する病原菌の働きを抑制する重要な役割を果たしている。

コンポスト化は微生物による有機物分解プロセスであるため、そこで働いている微生物の環境条件をいかに整えるかによってコンポスト化の速度は影響を受ける。コンポスト化を担う微生物は、主として腐生性の化学合成従属栄養微生物であり、動植物残渣などの有機物を分解し、生物由来の高分子物質を最終的には二酸化炭素、水、ミネラルなどにまで分解する。これらの微生物は、高温に耐えて増殖するだけでなく、この高温を利用して常温におけるよりもはるかに速い速度で有機物を酸化分解する能力をもった好熱性微生物であり、この好熱性微生物をいかに効率良く働かせるかでコンポスト化の効率も影響を受ける。これらの微生物の働きを左右する因子としては、コンポスト堆積層の含水率、温度、酸素供給、pH、コンポスト原料の炭素と窒素の比 (C/N 比) などがあり、以下に示すような高速コンポスト化のための最適条件が知られている。

2. 最適条件としてどんなことが知られているか

コンポスト化プロセスでは、適切な水分と十分な酸素の条件を同時に満たすことが必要であり、水分が少なすぎると微生物の活性が低下し、水分が多すぎると微生物に十分な量の酸素を供給できず、嫌氣的になると有機物分解速度が著しく低下する。また、嫌氣的になると強い悪臭が発生することがある。コンポスト化の最適水分は 40 ~ 65% 程度であることがわかっている (Dougherty 1998)。

また、微生物分解を促進するためには適切な温度の維持が必要である。異なる温度の条件では異なる微生物が優勢になる。有機物の微生物分解は発熱反応であり、有機物が活発に分解されるとコンポスト堆積層の温度は上昇する。コンポスト堆積層内に通気をおこなわないか、または通気量が少ない場合には、層内部の温

度は、しばしば 80°C 近い高温に達する。微生物の中には温泉水のような有機物濃度が低い貧栄養条件において 90°C 以上でも生育できる高度好熱菌の存在も知られているが、コンポスト化過程で見られる好熱菌は 70°C 以上になるとその活性を失ってしまい、70°C 以上で活発に有機物を分解する微生物は知られていない。このため、コンポスト化の速度を高めるには堆積層を適正な温度の範囲に維持することが必要である。コンポスト化の最適温度は 60°C 付近にあることが知られている (Bach et al. 1984)。

高速コンポストにおいては堆積層内で有機物分解を担っている微生物が活発に働くために、好気条件が維持されていなければならない、投入原料の含水率の調整と通気性改良材 (バルキング材) の使用、および通気、コンポスト堆積層の混合攪拌 (切り返し) が特に重要である。なお、通気性改良材は、コンポスト化進行に必要な酸素を供給するための空間を堆積層内につくる目的で用いられる。木材チップなど吸水性のある資材を用いた場合には、同時に原料の水分を調整することもできる。切り返し時に層内に取り込まれた空気中の酸素はコンポスト中の微生物により直ちに消費される。より多くの酸素を供給する目的で、切り返しを高頻度でおこなうと堆積層温度が低下してしまうので注意が必要である。また、切り返し作業のコストの観点からも頻度をきりもなく上げることはできないので、強制通気によって酸素の要求を満たす方法がしばしば用いられる。原料の種類や堆積層の大きさによっても最適な通気速度は異なるが、実用規模の家畜ふんコンポスト化では活発な有機物分解がおこっているコンポスト化初期の最適通気速度は $50 \sim 300 \text{ L min}^{-1} \text{ m}^{-3}$ の範囲にあるとされている (宮竹 2015)。この値は堆積層内での微生物の活動によって消費される酸素を賄うのに必要な空気量の 10 倍以上にも達することがわかっているが、過大な通気は堆積層を高すぎる温度から冷却するとともに、堆積層を乾燥させる目的のためにも用いられている。なお、切り返しは均一なコンポストを得るためにも必須と考えられている。

コンポスト化における有機物分解は、中性から弱

アルカリ性の範囲で活発におこることが知られている (Nakasaki et al. 1933) が、コンポスト原料の中には、しばしばその pH が中性から大幅に離れているものがある。例えば、嫌気条件下で放置された生ごみは、酢酸などの低級脂肪酸が蓄積し、pH が 4 ~ 5 付近まで低下している。逆に脱水助剤として石灰と塩化第二鉄を用いて脱水した下水汚泥では、pH は 12 付近の高い値を示す。原料の pH が低い場合には、消石灰等を混合する、また、pH が高い場合には酸を添加する方法がおこなわれることもある。そして、活発なコンポスト化がおこなえば、コンポストの pH は 8 よりやや高い値に自然に調節される。このため、製品コンポストをコンポスト原料に混合することには、pH 調整の効果もあることがわかっている。

また、微生物分解を促進するためにはコンポスト原料の C/N 比を適正な値の範囲に維持することが重要とされている。最適 C/N 比は約 25 ~ 30 といわれている (Choi 1999)。種々の廃棄物の C/N 比はそのままではこの値からずれているものも多いので、一般には C/N 比の高い原料と低い原料を組み合わせる方法が用いられる。C/N 比の高いパーク (樹皮) のコンポスト化を効率よく進めるために、鶏ふんなどを混合するのはその例である。

ここでは高速コンポスト化のための操作条件についてまとめたが、これ以外の操作条件として、活性の高い微生物を原料に添加することによって飛躍的な効率の向上をはかろうとする試みが従来からおこなわれてきた。製品の一部をコンポスト原料に混合し、微生物の接種源として用いる方法が一般的に行われているが、特別に培

養した微生物を含む接種剤も数多く市販されている。

3. 効果の有無が分かれる微生物接種の効果

微生物を接種することによるコンポスト化促進の効果をデータに基づいて定量的に評価したのは、Golueke et al. (1954) の研究が最初といってよい。Golueke らは生ごみとわら、また、これに紙を混合したモデル都市ごみのコンポスト化をおこなって微生物接種の効果を検討している。この論文はコンポスト化に必要な微生物は原料から供給されて自足することを主張した啓蒙的な論文でもある。しかしながら、この研究では使用するコンポスト原料が不均質な生ごみ (生ごみは、その性質上どうしても不均質にならざるを得ない) を含んでいるため、また、サンプルも不均一であるため、サンプルを分析して有機物の分解率を求める方法では定量性にも限界があった。このため、微生物接種の効果の有無は、必ずしもはっきりしていないと考える研究者も多く、引き続き微生物接種の効果を検証する多くの研究がおこなわれた。現在までに、効果がある、効果がないと2つの異なる結論を導いた論文が発表されてきているが、その例を Table 1 にまとめた。有機物分解、コンポスト化促進に効果の見られないものと、効果が見られたものとが示されている。また、コンポスト化促進効果は見られないものの、優勢となる微生物の種類が異なり、微生物叢に影響が現れた (Loakasikarn et al. 2021) とした論文もある。なお、微生物接種に効果があったとした報告の中には、窒素の動態 (Zhang et al. 2016) への影響に言及したのものもある。

Table 1 Summary of the effects of microbial inoculation on composting as seen in previous literatures.

Raw material	Composting scale	Seed/Inoculum	Composting stage for inoculation	Temperature profile	Effect of inoculation	References
vegetable trimmings, chopped straw and paper	from laboratory to field scale: 19 L glass jars (3 kg)/ 208 L steel drums (70 kg)/ 1 m square and 1.5 m high bin (450 kg)/ 1.5 m high open pile (2700kg)	Garden soil, horse manure, partially decomposed organic material, and a commercial preparation of special bacterial cultures	initial	Laboratory studies: in a room maintained at 50°C±5°C Open pile: ambient temperature	No measurable effects resulted on the course of temperature, increase in per cent ash, or decrease in per cent carbon	Golueke et al. 1954

Sewage sludge	300 mmΦ × 400mm depth 3kg	Compost product	initial	60°C constant and uniform	No significant effect on the rate and degree of organic matter degradation	Nakasaki et al. 1985
Grape pulps	70-litre batch reactor (70×50×50 cm) 20 kg (wet weight).	mesophilic and thermophilic strains from a culture containing grape pulps and fresh sheep manure/ cellulolytic strains isolated from grape pulps and tree bark	initial	Maximal temperature >60°C	cellulolytic and ligninolytic bacteria had no effect on the degradation of organic matter	Faure & Deschamps 1991
Grass straw and leaf mix	51 cm height, 47 cmΦ 8.2 kg	commercially available seeding material (<i>Bacillus</i> , <i>Streptomyces</i> , <i>Pichia</i> , <i>Saccharomycopsis</i> , <i>Aspergillus</i> , and <i>Mucor</i>)	initial	N.A.	Positive effects in total organic carbon and organic matter contents, the effect was not obvious in microbial biomass and CO ₂ evolution rate	Rajbanshi et al. 1998
Garbage from cafeteria	8.7 L 19×27×17 cm (W×L×H)	mixing microorganisms having substantial activity on various organic substrates	initial	maximal >60°C for inoculated, around 40°C for non- inoculated	temperature, CO ₂ and O ₂ concentrations, pH, and dry matter decrease were improved	Shin et al. 1999
Wood chips Sewage sludge	plastic bins (60×40×30 cm)	Commercial preparation of micro-organisms (<i>Pseudomonas</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Saccharomyces</i> spp.)	initial	(20–25°C) for a period of 28 days	a microbial inoculant did not have a significant effect on the decomposition process	Maboeta & van Rensburg 2003
MSW	34 L	<i>Bacillus</i> <i>azotofixans</i> , <i>Bacillus</i> <i>megaterium</i> and <i>Bacillus</i> <i>mucilaginosus</i> / <i>Trichoderma</i> <i>koningii</i> , <i>Streptomyces</i> <i>cellulosae</i> and White-rot fungi	initial	peak temperature >60°C (inoculated) peak temperature =58°C (uninoculated)	Oxygen uptake rate and total cumulative O ₂ uptake were larger in the inoculated compostings than uninoculated control	Xi et al. 2005
OFMSW	46 kg fresh refuse	a microbial inoculum originated from the MSW leachate	initial	temperature once increased near 70°C	The positive effects were observed in terms of pH, oxygen uptake ratio and cellulase activity, though other parameters were not significantly different	Li et al. 2008
Straw and certain agro-industrial wastes	each pile at the beginning was about 1.5 m length×1.0 m width×0.80 m height	Cellulose degrading fungi: <i>Trichoderma</i> <i>reesei</i> (NRRL 11236), <i>Phanerochaete</i> <i>chrysosporium</i> (NRRL 6361) and <i>Trichoderma</i> <i>viride</i> (EMCC 107)	initial	temperature attained a maximum peak at the 16th day and surpassed 60°C	Inoculation of composting mixtures enhanced the biodegradation of recalcitrant substances	Rashad et al. 2010
Kitchen-waste	6 kg 2 reactors	a microbial cocktail consisting seven types of bacteria and eight types of fungi isolated from soils	initial	the composters were placed in a laboratory at 27±5°C and kept at 45°C. Compost cycle was for 30- days	use of a microbial cocktail did not show advantages in accelerating the composting process.	Abdullah et al. 2013

Household organic waste	dry leaves (1.6 kg total) were added to each bin once a day, for 60 days Five-200 L bin	MC (mature compost) EM (lactic acid bacteria, photosynthetic bacteria and yeast) LDD1 (fungi, actinomycetes and lipase-producing bacteria)	MC was mixed at the initial/ EM and LDD1 were mixed with the organic waste daily	Highest peak ranged from 45 to 50°C	not be necessary to add commercial inoculants to facilitate composting	Karnchanawong & Nissaikla 2014
Rice straw and chicken manure	lab-scale cylinder reactors, about 10 kg raw materials	enriched ammonia-oxidizing bacteria	initial	temperature control Heating phases 37.6-57°C, Thermophilic phases 50-57°C, Cooling phases 40.2-50°C, Mature phases 39.5-40.2°C	inoculation reduce ammonia emission and nitrogen loss by transforming ammonium into nitrite	Zhang et al. 2016
dairy manure and corn straw	8 kg fresh weight of mixture of material	The greatest cellulosic enzymatic strains with tolerance to high temperature/ <i>Streptomyces</i> sp. H1, <i>Streptomyces</i> sp. G1, <i>Streptomyces</i> sp. G2, <i>Actinobacteria</i> bacterium T9	different stages	temperature increased once to 57°C, then dropped linearly	improved cellulase activities, accelerated the degradation of cellulose, increased the content of humic substances	Zhao et al. 2017
Sugarcane processing residues	3.2×1.6×25 m (base×height×length)	phosphate-solubilizing bacteria (PSB), <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PSBR12 and <i>Bacillus</i> sp. BACBR01	initial	temperature increased rapidly, and then remained above 60°C until the end of composting	inoculation of PSB reduced the levels of Ca-bound P and increased the labile organic P fraction	Estrada-Bonilla et al. 2017
Sludge	Box with internal dimension 0.54 m×0.49 m×0.47 m (length×width×height)	A thermophilic bacterium (<i>Geobacillus stearothermophilus</i> CHB1)	initial	maximum temperature: 56.5°C for inoculated, and 51.9°C for non-inoculated	inoculation with CHB1 would enhance the quality and efficiency of composting	Fang et al. 2019
Sugarcane leaves and dairy manure	total weight of each pile was approximately 25 kg in a cylinder compost reactor (60 L)	compost-born multifunctional thermophilic microbial consortium (CTMC)	Two step: first inoculation (day 0) second inoculation (day 9)	thermophilic phase (>50°C) was two days longer in the inoculated composting than non-inoculated one	enhance the mineralization of organic carbon, accelerate the lignocellulose degradation and promote the humification process	Xu et al. 2019
Rice straw	small cylinder (18 cmΦ, 45 cm height) 12.5 L working volume	The inoculum was the blend of five bacterial strains/ <i>Aeromonas caviae</i> sp. SD3, <i>Shinella</i> sp. XM2, <i>Rhizobium</i> sp. S8, <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> sp. SD1, <i>Streptomyces clavuligerus</i> sp. XM	at cooling phase (day 13)	temperature cooling phase is favorable for the inoculated microorganisms	Fenton pretreatment with bacteria inoculation provided a new method to promote the HS amount	Wu et al. 2020
Model food waste (Rabbit food)	laboratory-scale (100 mL) mini reactor	one commercial seeding material and two brands of compost products	initial	60°C constant and uniform	the rates and degrees of organic matter degradation were similar though the microbial communities were different	Loakasikarn et al. 2021

Mushroom residue and wood chips	large pile 3.4 m×1.2 m×0.5 m (in length, width and height)	<i>Aspergillus</i> , <i>Penicillium</i> <i>Bacillus</i> , <i>Streptomyces</i>	initial	Temperature rose to near 60°C and kept high level under the ambient temperature of 3–11°C	beneficial for the starting of the aerobic composting at low temperature and the degradation of cellulose	Jia et al. 2021
Cattle manure and rice straw	mixed materials (100 kg) in a cubic composting reactor (200 L)	<i>Malbranchea cinnamomea</i> <i>Gloeophyllum trabeum</i>	single-stage inoculation: SSI (both at the start) two-stage inoculation: TSI (successively)	<i>G. trabeum</i> was inoculated at the end of cooling stage (50–40°C) in TSI	TSI promoted the degradation degree of cellulose, hemicellulose and lignin, and increased the total nutrients and humus carbon	Zhu et al. 2021
N.A.	N.A., but must be large, since the term, "windrow-based compost piles" was used, and sample weight was large	Two PSB strains <i>Pseudomonas aeruginosa</i> CMG4 and AAC1	initial	Maximal temperature around 50°C	inoculation does not affect the temperature, MC, carbon to nitrogen ratio, organic matter and Mg content but increased the accessible Ca content	Ahmad et al. 2022
Food waste	1 m ³ self-made pilot-scale intelligent aerobic composting equipment	mature compost	initial	Maximal temperature reached near 70°C	increased the reduction rate of volatile solids by 71.4% and shortened the composting period by 7 days	Wang et al. 2022
Spent mushroom substrate and chicken manure	length, width, height and thickness of 65.7 cm, 61.1 cm, 60.5 cm and 6.2 cm about 26.9 kg	A mixture of <i>Bacillus subtilis</i> SL-44, <i>Enterobacter hormaechei</i> Rs-189 and <i>Trichoderma reesei</i> / Commercial Microbial agents	initial	Maximal temperature reached around 70°C	Microbial inoculum elevated the temperature in the thermophilic phase, enhanced humification degree, and promoted composting maturity and quality	Li et al. 2024

微生物接種の効果があるか否かの判定においては、研究方法が微生物接種の効果を評価するのに適したものになっているか、実験誤差を正しく評価しているか、科学的根拠に基づく評価になっているかについて、注意が必要である。研究方法が適正であるためには、再現性のある実験結果が得られるシステムでなければならないことはいままでもないが、再現性に疑問がある研究報告も多く見られている。例えば、生ごみを用いて大型の積み山方式でコンポスト化するときには、生ごみ自身の組成が不均質であることに加えて、通気性改良材や微生物接種剤を均一に混合する操作すら容易ではない。また、積み山の形状、大きさによっても、微生物による代謝で発生する熱の損失量が異なって、堆積層の温度は異なってしまふ。そのような場合、見かけ上同じ操作をしても、真の意味で同じとは言えないので、再現

性のある結果を得ることは極めて難しい。そして、そのような条件下では、微生物接種の有無を変えたコンポスト化で、たとえ差が見られたとしても、それは、微生物接種の効果とは言いきれない。

実用規模のコンポスト化では、原料が不均質であったり、温度、水分、通気性などが堆積層内で大きな分布を生ずるために微生物接種の効果は明確になりにくい。このため、少なくとも原理的に効果があるか否かを調べる段階では実験条件を詳細に制御できる実験室規模の装置で確かめることが有利である。そして、原理的に効果があるとしたら、それを実用規模のコンポスト化にどのように応用するかについては、別途、そのための研究が必要である。少なくとも原理的に効果がなければ、実用規模コンポスト化で効果を期待できないことはいままでもない。なお、微生物接種の効果を検証するためには、

有機物分解をできるだけ定量的に比較する必要があるが、密閉通気型装置からの二酸化炭素発生量を測定する方法をその一つとして用いることができる。この方法では、固体サンプルの灰分率の変化をもとに有機物分解率を計算するときなどに生じやすい、大きな誤差を避けることができる。

微生物接種の効果を検証するには、測定誤差を正しく評価することも重要である。これまでに報告されている多くの論文の中には、微生物の接種の有無によって有機物分解率にわずか数%の差が観察されたことをもって、微生物接種の効果があると主張する論文も散見されている。コンポスト化においては、全く同一の原料を用いて、操作も同一にしても有機物分解率に数%の差が生じることがある。このため、有機物分解率に数%の差しかないときには、有意な差であることの主張は難しい。また、きわめて精密なコンポスト化操作と有機物分解の定量手法の導入によって、数%の差を有意な差であることを主張できたとしても、逆の見方をすれば、微生物接種にともなう有機物分解促進効果はわずか数%に過ぎないということになる。なお、セルロース分解菌を接種したコンポスト化でセルロースの分解促進効果が見られているときに、セルロースを含む有機物全体の分解量には、差が見られないという整合しない実験結果をもとに微生物接種の効果を論じた研究報告もある。この結果は、微生物接種の効果を検証するには、測定誤差について慎重な検討が必要であることを示している。

微生物接種の効果に対する主張が科学的根拠に基づいたものになっているかは、さらに重要である。高温条件下で生き残ることができない微生物を原料に接種し、コンポスト化の高温過程での効果を期待するものがいくつか報告されているが、そのような微生物が高温過程の有機物分解に貢献することは困難である。また、高温条件では生残できない微生物を原料に接種し、コンポスト化の後半で温度が低下したときの増殖と貢献を期待していると思われる研究もあるが、コンポスト化の過程で高温にさらされるとこれらの微生物は死滅する。コンポストの積み山が大きい場合には、積み山の内部は

高温でも表面付近は温度が低く、高温条件では生き残れない微生物も生き残るのではないかと考える向きもあるかもしれない。しかしながら、これらの微生物が生き残る操作を認めることは、コンポスト化の高温過程で人や植物に対する病原菌を殺菌できずに、病原菌が生き残ることも許容することであり、安全なコンポスト化に本来的に求められている条件を満たすことができていないことになる。なお、実際のコンポスト化では適正に切り返しをおこない、病原菌を堆積層の高温域に移動させることで生き残ることがないように操作される。このため、高温条件では生残できない微生物を原料に接種したときに、たとえ効果があったとしても実際の操作においての有用性は疑問である。

また、コンポスト原料にセルロース分解菌を接種して、コンポスト化の初期段階でセルロースの分解を促進しようとした研究も見られるが、その効果は限定的と考えてよい。よく知られているように、セルロースは他に易分解性の有機物が共存するときには、易分解性有機物の分解が進まないと、その分解は開始しない。このため、接種した微生物が直ちにセルロースを分解して大きな接種の効果が見られる条件は限られている。なお、嫌気性のセルロース分解菌として芽胞を形成し、耐熱性も高い *Clostridium* 属細菌を用いれば、コンポスト化初期の易分解性有機物が多く、高温となる期間を生き延びて、温度が低下して条件が整ったときにセルロースの分解に寄与するのではと期待することがあるかもしれない。しかしながら、*Clostridium* 属細菌が好気コンポスト化の条件で大きな効果を発揮することは困難と考えるべきであろう。

ここで述べたもの以外にも、微生物接種に効果があるかもしれないが、その効果の有用性が明確でない研究の報告もある。重金属を含む原料のコンポスト化において外部から微生物を接種することで、コンポスト製品中から重金属が溶出しにくくなるとした報告では、コンポスト中に生成された腐植がキレート物質として作用し重金属が保持される、あるいは、いまだ説明されていないメカニズムで重金属が不動化すると説明している。たと

え微生物の接種にそのような効果があるとしても、製造されたコンポストを長年にわたって土壌に施用し続けるとしたら、土壌中での重金属溶出の問題は避けて通ることはできないと思われるので、そこで見られた微生物接種の効果はコンポスト製造という視点から、大きなメリットにはなりえないものと考えられる。

4. 再現性の高いシステムを用いて得た微生物接種の効果がない場合

先に述べた通り、微生物接種の効果を明確に示すためには、コンポスト化における有機物分解をできる限り定量化し、同一条件のコンポスト化では再現性のある実験結果が得られるシステムを用いる必要がある。そのようなシステムの一例を Fig. 1 に示す。(Nakasaki et al.2011) このシステムでは、密閉通気型の小型装置を用いており、有機物分解速度を定量化するために、微生物による有機物分解の結果として発生する二酸化炭素の発生速度を測定し、有機物分解率は、原料中の炭素重量に対して二酸化炭素として揮散した炭素重量の比と定義した炭素変化率を計算している。また、微生物接種以外のコンポスト条件、すなわち、原料も、温度、水分、通気性などの操作条件も同一にして比較することで、微生物接種の効果のみを評価できる。Nakasaki et al. (1985) は、Fig.1 と同一ではないが、同じ考え方に基いて設計されたコンポスト化システムを用いて微生物接種の効果を検証している。なお、微生物接種剤としてはコンポスト製品を用いて、コンポスト原料に乾燥重量基準で 0、10、20% に変えて添加しているが、微生物接種の有無で微生物濃度以外の物理化学的特性、例えば通気性、pH、含水率などに影響がでることを避けるために、コンポスト製品を添加しない、あるいは減らしたコンポスト化では、ガンマ線照射で滅菌した滅菌コンポスト製品を添加している (Fig. 2 参照)。なお、従来からのコンポスト化における微生物接種の効果に関する研究ではコンポスト化過程で微生物がどのような影響を受けるかについて示されていなかったが、この論文ではコンポスト化過程の微生物叢変化も測定している。

コンポストと滅菌コンポストの割合を変えて外部から接種する微生物濃度を変化させても、コンポスト化における有機物分解に顕著な差は見られないことから、実験に用いた下水汚泥のコンポスト化においては、有機物分解に寄与の大きい好熱性微生物は種菌を接種しなくても原料中に含まれていたものが速やかに増殖し、微生物接種はコンポスト化の有機物分解に顕著な効果はないと結論付けている。

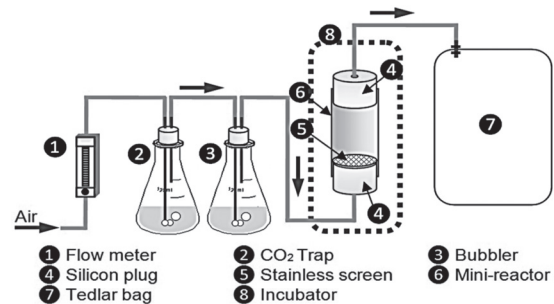


Fig. 1 Laboratory-scale composting system.

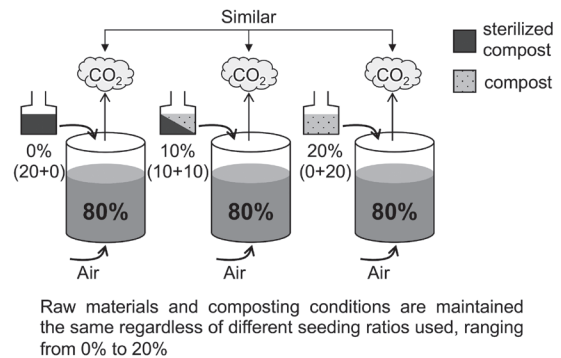


Fig. 2 Experimental design for confirming the effects of microbial inoculation using a mixture of compost and sterilized compost.

同一のシステムは食品加工残渣を原料としたコンポスト化にも適用され、微生物の接種濃度が異なることによって有機物分解速度の変化パターンには差が見られるものの、コンポスト化の発酵終了時の有機物分解率には差がみられないことを確かめている (Nakasaki et al. 1992)。また、複数の市販微生物接種剤の効果についても検討した結果、こちらも有機物分解速度の変化パターンには差があるが、最終的な有機物分解率には顕著な差がないことを明らかにしている (中崎ほか 1993)。なお、この研究では、コンポスト過程で出現する微生物の種類の違いについても検討しているが、分子生物学

が適用される以前の研究であるため、寒天平板上のコロニー観察のデータではあるものの、コンポスト化過程の初期の微生物の種類が微生物接種剤によって異なっていたことを報告している。

その後、異なる微生物接種剤を用いたコンポスト化において、分子生物学を適用し優勢となる微生物の種類が異なることを明らかにした結果が、Loakasikarn et al. (2021) によって報告されている。この論文では、コンポスト中微生物叢を詳細に解析するとともに、酵素遺伝子の存在度についても言及している。実験室規模のコンポスト化において、3種類接種材料（市販の微生物接種剤1種類と市販のコンポスト製品2種類）を比較したところ、有機物の分解速度と分解率は、接種剤の種類によらず同程度であったが、微生物叢は各実験で異なっており、微生物の接種が微生物叢の遷移に大きく影響することが示された。また、接種剤が異なると存在する微生物の種類が異なるにも関わらず、多くの酵素遺伝子の存在度はコンポスト化が進むにつれて同様となった。コンポスト中の微生物は、たとえ種類は異なっても、同様の酵素を生成するポテンシャルを有していたと報告している。

以上、種菌の効果がない、あるいは極めて小さいコンポスト化についてまとめてきたが、効果が見られたコンポスト化について次に解説する。

5. 再現性の高いシステムを用いて得た微生物接種の効果がある場合

微生物接種の効果が見られる例に、コンポスト原料中の有機酸を分解し、pHを上昇させる微生物の働きがある。この効果は、実際のコンポスト化でも特に有用なものである。コンポスト化における最適pHの項ですでに述べた通り、嫌気条件下で放置された生ごみは、酢酸などの低級脂肪酸が蓄積し、pHが4～5付近まで低下して、酸性の状態を示しているが、低pHの条件では、コンポスト化微生物の活性は低く抑えられ、活発な有機物分解が開始するまでに長い時間を要する。原

料中の有機酸を分解するためには、必ずしも有機酸を分解する微生物を外部から接種しなくてもよい。それは、時間が経過すれば、コンポスト原料中に含まれる有機酸分解菌が緩やかにではあるが増殖を始め、増殖にもなって少量の酸が分解するとpHはわずかに上昇し、pHが上昇すると有機酸分解菌の活性はもう少し高くなり、さらに有機酸の分解が進むという循環がおこって、やがて、有機酸は余すことなく分解され、pHも上昇するためである。しかしながら、コンポスト原料に有機酸分解能力の高い微生物を高濃度に接種することはこの変化を加速することができることも報告されてきている。有機酸分解能力の高い微生物の例として、酵母 *Pichia kudriavzevii* RB1 がある (Nakasaki et al. 2013)。有機酸を添加したモデル食品廃棄物にRB1株を接種したところ、RB1株はコンポスト原料に含まれる有機酸を急速に分解し、pHを中性以上に上昇させた。また、RB1株を接種したコンポストでは、有機酸の分解が早まることで、コンポスト中有機物の分解を担う中温性細菌と好熱性細菌の両者 (*Bacillus thermoamylovorans*, *Bacillus foraminis*, *Bacillus coagulans*) が、接種していないコンポストよりも早く増殖を開始したことを報告している。RB1株には耐熱性がないのでコンポスト堆積層の温度上昇とともに死滅したが、高温段階に入る前のコンポスト化の初期段階に影響を及ぼし、コンポスト化にかかわる微生物の増殖開始のための遅滞期を短くすることで、コンポスト化プロセス全体を速くすることが可能になったと説明している。

微生物接種の効果が見られるのは、有機酸分解による、pHの改善に限らない。コンポスト過程における生分解性プラスチックの分解に促進効果があるという結果も報告されている (Ohtaki et al. 1998)。生分解性プラスチックは例えば生ごみを収集するゴミ袋として用いて、生ごみを取り出すことなく、ゴミ袋ごとコンポスト化するなどの用途が考えられている。生分解性プラスチックは本来、コンポスト中のみならず、土壌、河川、海洋などの自然環境中で分解されるように設計されているので、様々な環境中に分解微生物が存在することは前提

となっているが、通常的环境中ではその濃度は高くない。また、コンポスト原料中でも分解性の高い微生物は、その濃度がきわめて低い、あるいは存在しないということも起こりうる。生分解性プラスチックとしてポリ-ε-カプロラクトン (PCL) を用いて、50℃でコンポスト化した場合の PCL の分解性に及ぼす接種菌の種類の影響を調べたところ、PCL の分解性は、使用した2種類の異なる微生物接種剤で大きく異なり、一方の微生物接種剤を使用した場合に観察された分解性は、他方の約2倍であったと報告している。

他に接種効果が見られた例として、Tang et al. (2011) は、海藻であるワカメのコンポスト化において微生物接種の効果を確認している。ワカメに含まれるバイオポリマーであるアルギン酸の分解菌 *Halomonas* sp. AW4 および *Gracilibacillus* sp. A7 を接種したコンポスト化では、これらの微生物を接種しない対象区に比べて、アルギン酸の分解も、全乾燥重量の減少も大きくなったと報告している。アルギン酸を分解する微生物は環境中に少なくないが、コンポスト原料中での濃度が低く、そのため、このコンポスト化で微生物接種の効果がみられたものと考えられた。

また、微生物接種剤の効果は、コンポスト原料を高温高压 (亜臨界) 水で前処理したコンポスト化でも観察されている (Nakasaki et al. 2015)。コンポスト化の初期段階では、固体の有機物が微生物の分泌する菌体外酵素で可溶化し、水溶性有機物に変化する。そして、その可溶化の段階は、引き続き、水溶性有機物が微生物に取り込まれて二酸化炭素と水、およびミネラルまで完全分解される段階に比べて時間がかかることが知られている。このために、固体の可溶化を促進する方法として高温高压水による前処理が用いられることがある。この論文では、レストラン、コンビニエンスストア、食品加工工場から回収した生ごみをおがくずと混合し、180℃、30 分間の高温高压水で処理して、コンポスト原料を調製しているが、処理の過程で 5-HMF (5-ヒドロキシメチルフルフラール) およびフルフラールなどのフラン類が生成する。フラン化合物は、コンポスト化微生物の活性

を著しく阻害し、コンポスト化における有機物分解の開始を遅らせる結果となった。しかしながら、このコンポスト原料にフラン類分解能を有する真菌 *Paecilomyces* sp. FA13 を接種することで、フラン化合物の分解が著しく促進され、その結果として、コンポスト化に寄与する細菌の活性も向上し、有機物の活発な分解の開始が早まるのが観察されている。フラン化合物のように、通常のコンポスト微生物が高濃度に曝されることのない物質を含む原料であれば、微生物接種には確かな効果が観察されることも不思議ではない。

以上述べたように、微生物の活性を阻害する有機酸やフラン化合物のような物質が原料中に含まれている場合、また、多糖類や生分解性プラスチックのように、物質そのものは微生物の活性を阻害しない (実際、生分解性プラスチックそれ自体は固体であり、可溶化するまでは微生物の生育を抑制も促進もしない) が、分解性が低く、その分解微生物が自然環境中に高濃度に存在しない場合には、外部から微生物を接種することが有効であることが示されている (Fig. 3 参照)。

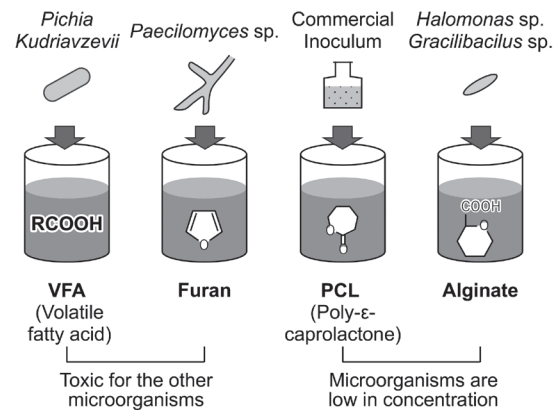


Fig. 3 Positive effect of microbial inoculation on accelerating composting by rapidly decomposing certain chemicals present in the raw compost material.

6. コンポスト化プロセスにおける制御の重要性

すでに上述した通り、中温性の微生物が高温条件で働くことを期待することには無理があるが、高温条件

でなければ、接種効果が期待できるかもしれない。このことは、微生物接種の効果が、コンポスト化の条件と切り離すことはできないことを意味している。別のいいかたをすれば、コンポスト化の条件を制御することで接種した微生物を有効に利用できる可能性がある。ここでは、微生物の接種とコンポスト化プロセスの積極的な制御を組み合わせた報告について紹介する。

Nakasaki et al. (1998) は、植物病原菌に対する抑制菌をコンポスト原料に接種して、増殖、定着させることで、病害を防除し、農薬の代わりとして使用できる高付加価値コンポスト（Nakasaki らは、機能性コンポストと呼んでいる）の製造を試みている。対象病害は、芝草のリゾクトニア病害（ラージパッチ病）で、原因菌である *Rhizoctonia solani* AG2-2 を抑制する有効菌として、*Bacillus subtilis* N4 を接種微生物として用いている。この有効菌は芽胞を形成して高温期を生き延びることができる中温性細菌であるが、高温期は増殖することができない。また、増殖可能な温度であっても、共存する他のコンポスト微生物に比べて増殖速度が遅いため、共存微生物と競合して高濃度にまで増殖することができない。そのため、まず、コンポスト化初期の自己発熱による 80℃ の高温を維持することで、増殖において競合する可能性のある原料中の中温性微生物を殺菌、低濃度化する。その後、温度を室温まで低下させて有効菌を接種し、引き続き有効菌の増殖に適した 40℃ に維持することで、コンポスト中にこの微生物を高濃度に増殖させている。すなわち、微生物を原料に接種するのではなく、接種のタイミングをずらすことに特徴がある。また、40℃ を 3 日間維持することで、有効菌が高濃度に増殖し、芽胞が形成されたことを確かめて、その後、コンポスト化の温度を 60℃ に上昇、維持する。この操作によって、コンポスト中の有効菌の濃度を高く維持しながら、衛生的で高速度のコンポスト化を可能にしている。また、このようにして製造されたコンポストは、芝草病害の防除に有効であることを確かめている。この結果は、微生物の接種とコンポスト化プロセスの積極的な制御を組み合わせることの重要性を裏付けている（Fig. 4 参照）。

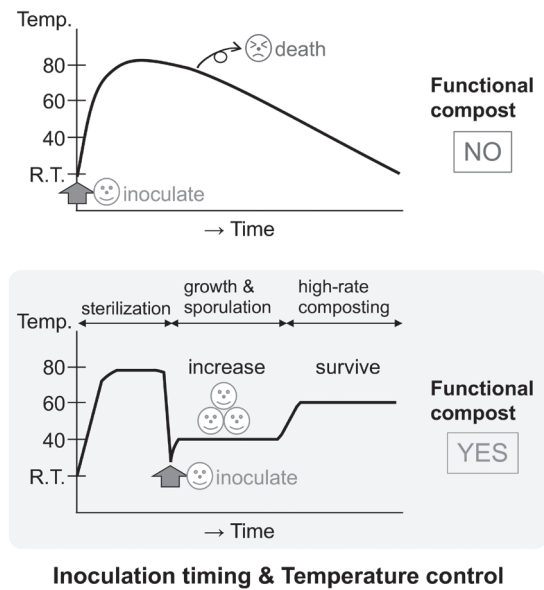


Fig. 4 Combination of delayed inoculation of suppressive microorganisms and temperature control enabling the production of value-added (functional) compost.

さらに *Bacillus subtilis* N4 よりも抗菌スペクトルが広く、より多くの植物病原菌を抑制することができる真菌 *Coprinellus curtus* GM-21 をコンポスト化過程で接種して、高濃度に増殖させることで、植物病害を防除する機能性コンポストを製造する手段が報告されている（Nakasaki & Suzuki, 2008）。コンポスト化初期の高温期が終わって温度が低下するタイミングで GM-21 株を接種した。この時点では、すでにコンポスト化物に残存する有機物濃度のレベルが低くなっており、細菌に比べて貧栄養条件下でも増殖できる真菌の増殖に有利となっている。さらに、pH を細菌の増殖は抑制するが、真菌の増殖には適した 6 付近の値に維持することで真菌の選択的増殖を可能にしている。単に、コンポスト原料に微生物を接種するだけでなく、接種する微生物の性質に合わせて、コンポスト化プロセスを制御することの重要性がここにも示されている。

微生物接種のタイミングを考慮したコンポスト化には Zhou らの論文（Zhou et al. 2015）もある。牛ふん尿に稲わらを混合したコンポスト原料に、コンポスト化進行に合わせて 3 段階に分けて微生物を接種している。第 1

段階はコンポスト原料に高温を達成、維持する目的で *Thermoactinomyces* sp. を、高温期が終了した後、リグニンの分解促進のために *Coprinus cinerea* と *Coprinus comatus* を、さらに時間が経過したときにセルロースの分解を目的として *Trichoderma harzianum* と *Rhizopus oryzae* を接種している。目的の異なる3種類の微生物を3段階に分けて接種することで、リグニンとセルロースの分解が促進されたと報告している。

また、コンポスト化プロセスの制御の重要性を示したもう一つの例に、先に示した酵母 RB1 株を接種し、その活性が高い 40℃ の温度を維持する時間を変えて、コンポスト化における有機物分解に及ぼす影響を明らかにした研究がある (Nakasaki & Hirai 2017)。有機酸が生成されやすい炭水化物含有量の高いモデル生ごみを使用すると、コンポスト化初期段階で新たに多量の有機酸が生成されるが、コンポスト化の温度を 40℃ に維持しなければ有機酸を分解し終わる前に、RB1 株は高温により死滅してしまうので、pH 低下によってコンポスト化は中断する。このため、コンポスト化が中断することなく進行するには、40℃ の温度を維持することが重要で、温度制御の時間がコンポスト化の有機物分解速度に大きく影響するという結果を得ている。

7. 微生物接種の効果についての考え方

微生物活性を阻害する物質、あるいは難分解性物質が存在しても、それを分解する微生物が極めて特殊な微生物でなければ、原料中に低濃度に存在するであろう分解微生物が、いずれは増殖して分解が可能と考えられる。しかしながら、それらの微生物が自然に充足されるとしても、増殖のために長時間を要するとすれば、それらを高濃度に含む微生物接種剤を外部から添加することは、分解開始までの遅滞時間を短くするために有効なはずである。しかしながら、接種する微生物の増殖速度が大腸菌並みに速く、倍加時間が 20 min としたときには、最初 1 cell が 10^6 cell まで 100 万倍に増殖するのに必要な時間は、わずか7時間弱に過ぎな

い。また、倍加時間が 6 h と増殖速度の遅い微生物であれば、100 倍、1 万倍、100 万倍の濃度に増えるために、それぞれ、40h、80h、120h 程度が必要となる。微生物を接種することによる、これらの時間の短縮が重要か否かはコンポスト化全体にかかる時間に依存する。

一方で、期待する機能を持つ微生物が、もともとの原料に含まれていない場合は、コンポスト化の時間をいくら長時間にしてもその微生物は増えてくることがない。例えば、植物病原菌を抑制して病害を防除することのできる微生物は、どんな原料中にも含まれているわけではない。このような状況では有効菌を接種することは有効な手段となるであろう。しかしながら、ここで注意を要するのは、原料に微生物を接種するだけでは、期待する効果は得られないということである。

活性の高い微生物を外部から接種することによって飛躍的な効率の上昇をはかろうとする試みはコンポスト化に限らない。化学物質で汚染された土壌や河川、海洋を微生物の作用で浄化するバイオレメディエーションの技術においても、コンポスト化と同様に、接種した微生物が定着、増殖できず、汚染を浄化できない場合のあることがしばしば観察されている (Harkness et al. 1993)。土壌や河川、海洋に接種された微生物がその環境に適応できない場合、例えば、温度、酸素濃度などが生育範囲から外れている、あるいは、汚染物質の濃度が接種微生物の処理可能な濃度よりも高すぎる場合などにも効果が見られないことは不思議ではない。さらに、環境中にすでに存在する微生物と接種微生物の間の競合が、接種微生物の定着を妨げる場合もある (Ghoul & Mitri 2016)。バイオレメディエーションにおいては、環境条件、例えば温度などを制御するのは容易ではないが、コンポスト化では環境条件が制御可能な場合もあり、その時には、積極的な制御をおこなうことで微生物接種の効果が見込まれることもある。

また、生きて腸に届く乳酸菌を取り込んで、私たちの体内で定着させるプロバイオティクスの考えが実用されてきているが、腸内にはすでに多くの微生物が生息しているために定着は容易ではない。プロバイオ

ティクスに用いることができる微生物は慎重なスクリーニングを経たものであり、どんな微生物でも可能というわけではない。一方で、外部から取り込まれた微生物が新しい環境で容易に定着できないのは、困ったことばかりではない。私たちは、病原菌に感染しても必ずしも病気にはならない。そのことは、生体の持つ免疫誘導のメカニズムに加えて、常在菌との競合で病原菌が増殖できないためと説明されることがある。常在菌とは、人間や動物の体表や体内に定着している微生物のことで、これらの微生物が病原菌と競合することによって病原菌の増殖を抑制する現象は直接的な拮抗と呼ばれている (Buffie & Pamer 2013)。

以上の報告からもコンポスト化に限らず、外来の微生物は、その増殖と定着に工夫が必要であることがわかる。コンポスト化においては、どのような原料のどのような操作条件のコンポスト化で、どのタイミングで接種するとどのような原理で効果があるということが明示されずに、ある微生物を接種すると、漠然と高品質のコンポストが速く製造できる、コンポスト化の過程で臭気を発生しないなどとした研究成果は、説得力に乏しいと言わざるを得ない。

8. まとめ

コンポスト化において微生物接種の効果が期待できるためには、接種する微生物の性質を理解し、その微生物が増殖、定着して、他の共存する微生物に対しても優位になる環境を維持することが重要である。このために、コンポスト化条件の積極的な制御が必要になることもある。近年、発展著しい分子生物学は、コンポスト化の制御ためにも有効な手段になると考えられる。分子生物学は接種した微生物の動態を把握することを可能にするばかりでなく、共存する他の微生物に対する影響についても知ることができるようになってきている。接種微生物の動態とコンポスト化の操作条件を関係づけることにより、求めている効果が得られるコンポスト化条件を見出すことができる可能性がある。接種した微生物を生かして使うために、分子生物学を取り込んだ、新しい微

生物接種操作の進展が望まれる。

引用文献

- Abdullah N, Chin NL, Mokhtar MN, Taip FS (2013) Effects of bulking agents, load size or starter cultures in kitchen-waste composting. *Int J Recycl Org Waste Agric* 2: 1–10.
- Ahmad A, Zafar U, Khan A, Haq T, Mujahid T, Wali M (2022) Effectiveness of compost inoculated with phosphate solubilizing bacteria. *J Appl Microbiol* 133:1115–1129.
- Bach PD, Shoda M, Kubota H (1984) Rate of composting of dewatered sewage sludge in continuously mixed isothermal reactor. *J Ferment Technol* 62: 285–292.
- Buffie CG, Pamer EG (2013) Microbiota-mediated colonization resistance against intestinal pathogens. *Nat Rev Immunol* 13: 790–801.
- Choi K. (1999) Optimal operating parameters in the composting of swine manure with wastepaper. *J Environ Sci Health Part B* 34: 975–987.
- Dougherty M (1998) Composting for municipalities: planning and design considerations. Ithaca, N.Y.: Natural Resource, Agriculture, and Engineering Service, Corporate Extension, 126 pp.
- Estrada-Bonilla GA, Lopes CM, Durrer A, Alves PRL, Passaglia N, Cardoso JBN (2017) Effect of phosphate-solubilizing bacteria on phosphorus dynamics and the bacterial community during composting of sugarcane industry waste. *Syst Appl Microbiol* 40: 308–313.
- Fang Y, Jia X, Chen L, Lin C, Zhang H, Chen J (2019) Effect of thermotolerant bacterial inoculation on the microbial community during sludge composting. *Can J Microbiol* 65: 750–761.
- Faure D, Deschamps AM (1991) The effect of bacterial inoculation on the initiation of composting of grape pulps. *Bioresour Technol* 37: 235–238.
- Ghoul M, Mitri S (2016) The ecology and evolution of microbial competition. *Trends Microbiol* 24: 833–845.
- Golueke CG, Card BJ, McGauhey PH (1954) A critical evaluation of inoculums in composting. *Appl Microbiol* 2: 45–53.
- Golueke CG (1977) Biological reclamation of solid

- wastes. Rodale Press, Emmaus, PA, United States, 272 pp.
- Harkness MR, McDermott JB, Abramowicz DA, Salvo JJ, Flanagan WP, Stephens ML, Mondello FJ, May RJ, Lobos JH, Carroll KM, et al. (1993) In situ stimulation of aerobic PCB biodegradation in Hudson River sediments. *Science* 259: 503-507.
- Jia X, Qin X, Tian X, Zhao Y, Yang T, Huang J (2021) Inoculating with the microbial agents to start up the aerobic composting of mushroom residue and wood chips at low temperature. *J Environ Chem Eng* 9: 105294.
- Karnchanawong S, Nissaikla S (2014) Effects of microbial inoculation on composting of household organic waste using passive aeration bin. *Int J Recycl Org Waste Agric* 3: 113-119.
- Li H, Yang Z, Zhang C, Shang W, Zhang T, Chang X, Wu Z, He Y (2024) Effect of microbial inoculum on composting efficiency in the composting process of spent mushroom substrate and chicken manure. *J Environ Manage* 353: 120145.
- Li M, Peng X, Zhao Y, Ding W, Cai H, Liu G, Wu Z (2008) Microbial inoculum with leachate recirculated cultivation for the enhancement of OFMSW composting. *J Hazard Mater* 153: 885-891.
- Loakasikarn T, Kubota Y, Koyama M, Nakasaki K (2021) Effect of seeding materials on organic matter degradation and microbial community succession during model organic waste composting. *Biocatal Agric Biotechnol* 37: 102182.
- Maboeta MS, van Rensburg L (2003) Bioconversion of sewage sludge and industrially produced woodchips. *Water Air Soil Pollut* 150: 219-233.
- 宮竹史仁 (2015) 堆肥化施設の苦悩と現場ニーズに対応したシステム開発. *環境バイオテクノロジー学会誌* 15: 9-16.
- Nakasaki K, Sasaki M, Shoda M, Kubota H (1985a) Effect of seeding during thermophilic composting of sewage sludge. *Appl Environ Microbiol* 49: 724-726.
- Nakasaki K, Watanabe A, Kitano M, Kubota H (1992) Effect of seeding on thermophilic composting of tofu refuse. *J Environ Qual* 21: 715-719.
- 中崎清彦, 渡辺淳, 片岡稔, 久保田宏 (1993) コンポスト化における種菌の繰り返し使用の効果. *用水と廃水* 35: 32-37.
- Nakasaki K, Yaguchi H, Sasaki Y, Kubota H (1993) Effects of pH control on composting of garbage. *Waste Manage Res* 11: 117-125.
- Nakasaki K, Hiraoka S, Nagata H (1998) A new operation for producing disease-suppressive compost from grass clippings. *Appl Environ Microbiol* 64: 4015-4020.
- Nakasaki K, Suzuki N (2008) Method for producing functional compost, functional compost and compost for proliferation of filamentous fungi. WO2008149846.
- Nakasaki K, Ohtaki A, Takemoto M, Fujiwara S (2011) Production of well-matured compost from night-soil sludge by an extremely short period of thermophilic composting. *Waste Manage* 31:495-501
- Nakasaki K, Araya S, Mimoto H (2013) Inoculation of *Pichia kudriavzevii* RB1 degrades the organic acids present in raw compost material and accelerates composting. *Bioresour Technol* 144: 521-528.
- Nakasaki K, Mimoto H, Tran QNM, Oinuma A (2015) Composting of food waste subjected to hydrothermal pretreatment and inoculated with *Paecilomyces* sp. FA13. *Bioresour Technol* 180: 40-46.
- Nakasaki K, Hirai H (2017) Temperature control strategy to enhance the activity of yeast inoculated into compost raw material for accelerated composting. *Waste Manage* 65: 29-36.
- Ohtaki A, Akakura N, Nakasaki K (1998) Effects of temperature and inoculum on the degradability of poly- ϵ -caprolactone during composting. *Polym Degrad Stab* 62: 279-284.
- Rajbanshi SS, Endo H, Sakamoto K, Inubushi K (1998) Stabilization of chemical and biochemical characteristics of grass straw and leaf mix during in-vessel composting with and without seeding material. *Soil Sci Plant Nutri* 44: 485-495.
- Rashad FM, Saleh WD, Moselhy MA (2010) Bioconversion of rice straw and certain agro-industrial wastes to amendments for organic farming systems: I. Composting, quality, stability and maturity indices. *Bioresour Technol* 101: 5952-5960.

- Shin H-S, Hwang E-J, Park B-S, Sakai T (1999) The effects of seed inoculation on the rate of garbage composting. *Environ Technol* 20: 293-300.
- Tang J, Wang M, Zhou Q, Nagata S (2011) Improved composting of *Undaria pinnatifida* seaweed by inoculation with *Halomonas* and *Gracilibacillus* sp. isolated from marine environments. *Bioresour Technol* 102: 2925-2930.
- Wang Y, Tang Y, Yuan Z (2022) Improving food waste composting efficiency with mature compost addition. *Bioresour Technol* 349: 126830.
- Wu D, Wei Z, Qu F, Ahmed T, Zhu L, Zhao Y, Jia L (2020) Effect of Fenton pretreatment combined with bacteria inoculation on humic substances formation during lignocellulosic biomass composting derived from rice straw. *Bioresour Technol* 303: 122849.
- Xi B, Zhang G, Liu H (2005) Process kinetics of inoculation composting of municipal solid waste. *J. Hazard Mater* 124: 165-172.
- Xu J, Jiang Z, Li M, Li Q (2019) A compost-derived thermophilic microbial consortium enhances the humification process and alters the microbial diversity during composting. *J Environ Manag* 243: 240-249.
- Zhang Y, Zhao Y, Chen Y, Lu Q, Li M, Wang X, Wei Y, Xie X, Wei Z (2016) A regulating method for reducing nitrogen loss based on enriched ammonia-oxidizing bacteria during composting. *Bioresour Technol* 221: 276-283.
- Zhao Y, Zhao Y, Zhang Z, Wei Y, Wang H, Lu Q, Li Y, Wei Z (2017) Effect of thermo-tolerant actinomycetes inoculation on cellulose degradation and the formation of humic substances during composting. *Waste Manag* 68: 64-73.
- Zhou C, Liu Z, Huang Z-L, Dong M, Yu X-L, Ning P (2015) A new strategy for co-composting dairy manure with rice straw: Addition of different inocula at three stages of composting. *Waste Manage* 40: 38-43.
- Zhu N, Zhu Y, Kan Z, Li B, Cao Y, Jin H (2021) Effects of two-stage microbial inoculation on organic carbon turnover and fungal community succession during co-composting of cattle manure and rice straw. *Bioresour Technol* 341: 125842.

Isolation of lipid-rich marine diatoms from the coastal waters of the Goto Islands, Japan

Mari Yasuda^{1,2}, Minamo Hirahara^{1,3}, Masatoshi Kishi^{1,4}, Tatsuki Toda¹, Shuichi Yamamoto¹, Ken Furuya^{1,5,*}

- 1) *Graduate School of Science and Engineering, Soka University, Tangi, Hachioji, Tokyo 192-8577 Japan*
 - 2) *Present address: Global Environment Division, Nippon Koei Co., Ltd. 5-4, Kojimachi, Chiyada, Tokyo 102-8539 Japan*
 - 3) *Present address: Research & Development Center, FUSO Co., Nihonbashi-Muromachi, Chuo, Tokyo 103-0022 Japan*
 - 4) *Present address: Institute of Sustainable Processes, University of Valladolid, Dr. Mergelina s/n., Valladolid 47011, Spain*
 - 5) *Institute of Plankton Eco-engineering, Soka University, Tangi, Hachioji, Tokyo 192-8577 Japan*
- * Corresponding author: furuya@soka.ac.jp

Received Apr. 22 2024, Accepted May 2 2024

Abstract Five diatom strains were isolated from the coastal waters of Goto Islands and their fatty acid content and composition were evaluated. Fatty acid composition of the isolates showed a similar tendency, and fatty acids of 14:0, 16:0, and 16:1 (*n*-7) accounted for the majority, comprising 7.4 to 27.2% of the total, 3.8 to 37.1% of the total, and 15.7 to 59.6% of the total, respectively. In addition, most isolates contained polyunsaturated fatty acid of 20:5 (*n*-3) (eicosapentaenoic acid, EPA) and docosahexaenoic acid (DHA), which are essential fatty acids in marine organisms. Among the isolates, a pennate diatom cf. *Diploneis* sp. contained the highest EPA. The potential of the pennate diatom for aquaculture feed, and the ecological significance of EPA and DHA content of diatoms in marine food webs in the vicinity of Goto Islands are briefly discussed.

Keywords: diatom, Goto Islands, isolation, PUFA

1. Introduction

Microalgae are notable for their rich lipid content, specifically polyunsaturated fatty acids (PUFAs) which regulate cell membrane fluidity and act as precursors to hormones, with *n*-3 PUFAs being particularly beneficial for human health, and thus utilized in nutraceutical applications (Li et al. 2014). PUFA is known as essential fatty acid, which is transported through food webs from

microalgae to higher trophic organisms that cannot produce PUFA (Brett & Müller-Navarra 1997). Since among PUFAs, 20:5 (*n*-3) (eicosapentaenoic acid, EPA) and 22:6 (*n*-3) (docosahexaenoic acid, DHA) are known to be important for the growth of various marine larvae, microalgae rich in EPA and DHA are being explored as excellent feed for larvae in aquaculture (Koven et al. 1989, Wacker et al. 2002, Patil et al. 2005, Waldock & Holland 1984).

Thus, EPA and DHA stand out as the most sought-after *n*-3 PUFAs, traditionally and currently sourced from fish oil. However, this method encounters several issues, including variable fish oil quality, concerns over the sustainable supply of fish oil, and the undesirable odor associated with fish products (Dulvy et al. 2003, Gerber et al. 2012). Furthermore, the production of EPA and DHA from fish oil is plagued by fluctuations in fish catches and resultant variability of prices. Consequently, there is a pressing need for cost-effective, alternative sources of DHA and EPA, prompting a search for new PUFA sources (Lenihan-Geels et al. 2013).

Microalgae emerge as a viable and sustainable alternative for *n*-3 PUFA production, offering advantages such as a higher growth rate and greater biomass density compared to terrestrial crops. This has led to a growing interest in harnessing microalgae industrially for *n*-3 PUFA production. In particular, diatoms are considered to be a suitable source of *n*-3 PUFA (Dunstan et al. 1994). Yet, to date, only a limited number of diatom strains have been commercially exploited for producing high-value substances. Specifically, *Phaeodactylum tricornerutum*, *Nitzschia laevis*, *Chaetoceros gracilis*, and some polar species are currently being explored on a laboratory scale (Hamilton et al. 2015, Katayama et al. 2020, Mao et al. 2020, Steinrücken et al. 2018)

Given the vast taxonomic diversity of diatoms, a broad variability in EPA and DHA production can be anticipated. This study aims to establish new strains with high EPA and DHA productivity from the coastal waters of the Goto Islands in west Japan, highlighting the potential of these organisms as sources of valuable PUFAs.

2. Materials and methods

2.1. Collection of water samples

Sampling was made in the coastal waters of the Goto

Islands in Nagasaki prefecture, Japan in February and August 2017. The islands formed complex topography (Fig. 1) and were selected as an ecologically or biologically significant marine area (Ministry of the Environment, 2014). Seawater samples were collected using a bucket and then introduced into 500 mL bottles through a 180- μ m mesh to remove larger particles in Arikawa, Koteno-ura, Oso, Sangen-ya, Shirauo, and Taino-ura (Fig. 1). Diatoms were condensed on 0.45- μ m membrane filters, and then cultivated in 12-well plates as enrichment cultures. Enriched *f*/2 medium with silicate was used throughout this study. To obtain various species, the serial dilution method was adopted (Thronsen 1978). The plates were incubated at $20 \pm 1^\circ\text{C}$ under an irradiation of $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ with a 12L:12D cycle.

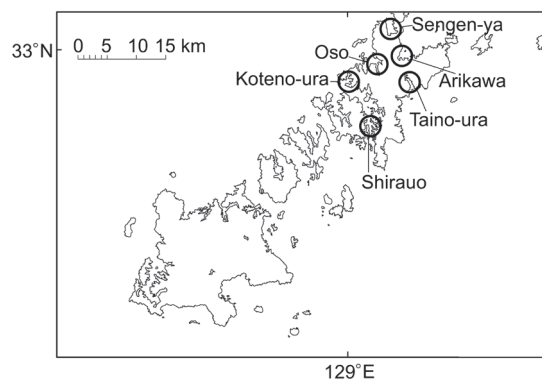


Fig. 1. Sampling locations in the Goto Islands.

2.2. Isolation and culture conditions

Diatoms were isolated using a micropipette under an inverted microscope. Each isolated cell was transferred to a well in 96-well plates and irradiated at $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ with a 12L:12D cycle. Diatoms grown in 96-well plates were then transferred successively to a 12-well plate, 100-mL Erlenmeyer flask, and 500-mL Erlenmeyer flask. Isolates were maintained at $25 \pm 1^\circ\text{C}$ because they showed higher specific growth rates at $25 \pm 1^\circ\text{C}$ than at 20°C . Isolated diatoms were identified to

species morphologically.

2.3. Fatty acid analysis

Cultures of each strain at the late logarithmic growth phase were harvested onto Whatman GF/F filters which were burned beforehand at 550°C for 2 hours. After drying in a dryer (Lab-ware drying oven, Yamato Scientific) for 24 hours, dry weight (DW) was measured using ultra-microbalance (UMX2, Mettler Toledo). Wet biomass of each strain collected on a Whatman GF/F filter in triplicate was freeze-dried and stored at -80°C (SANYO, MDF-C8V1) until extraction of fatty acids.

Fatty acids were extracted according to the protocol of Bligh & Dyer (1959) with some modifications. The stored GF/F filter was immersed in chloroform/methanol (1:2 v/v) mixture solution. Then, fatty acids were extracted by sonication, and the extract was dried using a dry thermo unit (DTU-1CN, TAITEC) in nitrogen gas as a blower. Then, 1 mL of acetyl chloride/methanol (5:100 v/v) was added to the dry extract, and heated at 100°C for 1 hour. The reaction product was extracted three times with hexane, and the extraction was dried with nitrogen. Then, the dry matter was dissolved in 300- μ L hexane.

Fatty acids were analyzed by gas chromatography-mass spectrometry (6890N GC/5973MS, Agilent Technologies) equipped with a DB-5 MS column (0.25 mm inner diameter, 30 m length, 0.25 μ m film thickness, J&W Agilent Technologies). Helium gas was carried at 1.0 mL min⁻¹. The injector temperature was set at 310°C. Individual fatty acids were identified by matching with the mass spectrum of the standard substance and the retention time. Fatty acids were quantified from the ratio of the area of the mass fragment peak of the sample to that of the standard substance.

2.4. Data analysis

Results of GC/MS were analyzed using the software

of Agilent MSD Productivity ChemStation for GC and GC/MS Systems Data Analysis. Tukey test was applied to evaluate significant differences ($p < 0.01$).

3. Results

Five diatom species were isolated: a pennate diatom cf. *Diploneis* sp. (referred to as *Diploneis* sp. hereafter), *Cylindrotheca closterium*, *Bacterosira fragilis* from Koteno-ura, *Chaetoceros pseudocrinitus* from Taino-ura, and *Talassiosira subtilis* from Shirauo.

Fatty acid composition was not variable among the isolates (Table 1). Fatty acids of 14:0, 16:0, and 16:1 ($n-7$) accounted for the majority, comprising 7.4 to 27.2% of the total, 3.8 to 37.1% of the total, and 15.7 to 59.6% of the total, respectively. In addition, most isolates tended to contain PUFA of 20:5 ($n-3$) except *C. pseudocrinitus*, occupying 15.2 to 19.5% of the total. Biomass-specific cellular content of 16:1 ($n-7$) and 20:5 ($n-3$) in *Diploneis* sp. was 20.3 mg g-DW⁻¹ and 6.7 mg g-DW⁻¹, respectively, significantly higher than those of other isolates ($p < 0.01$) (Fig. 2). This strain also contained 0.70 mg g-DW⁻¹ of 18:3 ($n-6$), 0.08 mg g-DW⁻¹ of 22:0, 1.02 mg g-DW⁻¹ of 22:6 ($n-3$), and 0.92 mg g-DW⁻¹ of 24:0 (Fig. 2).

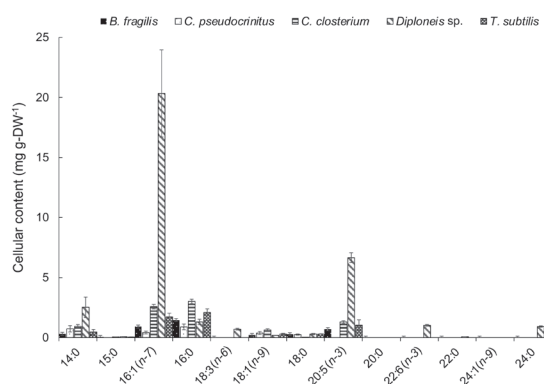


Fig. 2. Fatty acid content and its standard deviation ($n=3$) of *Bacterosira fragilis*, *Chaetoceros pseudocrinitus*, *Cylindrotheca closterium*, *Diploneis* sp., and *Thalassiosira subtilis*.

Table 1. Relative proportion of individual fatty acids (wt%) of isolated diatoms.

Fatty acid	<i>Bacterosira</i> <i>fragilis</i>	<i>Chaetoceros</i> <i>pseudocrinitus</i>	<i>Cylindrotheca</i> <i>closterium</i>	<i>Diploneis</i> sp.	<i>Thalassiosira</i> <i>subtilis</i>
14:0	7.9	27.2	10.9	7.4	7.7
15:0	1.3	0.0	0.7	0.2	0.9
16:0	37.1	33.1	35.2	3.8	35.1
16:1 (<i>n</i> -7)	23.2	15.7	30.1	59.6	28.9
18:0	7.1	9.5	0.4	0.9	5.1
18:1 (<i>n</i> -9)	5.6	14.4	7.5	0.5	5.0
18:3 (<i>n</i> -6)	0.0	0.0	0.0	2.1	0.0
20:0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
20:5 (<i>n</i> -3)	17.8	0.0	15.2	19.5	17.4
22:0	0.0	0.0	0.0	0.2	0.0
22:6 (<i>n</i> -3)	0.0	0.0	0.0	3.0	0.0
24:0	0.0	0.0	0.0	2.7	0.0
24:1 (<i>n</i> -9)	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

4. Discussion

4.1. PUFA content in isolated diatoms

The isolates exhibited high ratio of 14:0, 16:0, 16:1 (*n*-7) and 20:5 (*n*-3) to total fatty acids, supporting the previous studies that diatoms contain high amounts of 14:0, 16:0, 16:1 (*n*-7) and 20:5 (*n*-3) (Serval et al. 1994, Viso & Marty 1993, Zhukova & Aizdaicher 1995).

Among the isolates, *Diploneis* sp. contained a large amount of PUFA, and its biomass-specific EPA and DHA contents were 6.66 mg g-DW⁻¹ and 1.02 mg g-DW⁻¹, respectively (Fig. 2). DHA content of *Diploneis* sp. exceeded a reported high DHA content of 0.6 mg g-DW⁻¹ in *Nitzschia frustulum* (Renaud et al. 1994). Thus, *Diploneis* sp. was the best producer of *n*-3 PUFAs among the isolates in this study. However, the highest EPA content in diatoms is reported to be 62.3 mg g-DW⁻¹

in *Phaeodactylum tricorutum* (Yongmanitchai & Ward 1991), which is almost one order of magnitude higher than that of *Diploneis* sp. in this study. Furthermore, higher *n*-3 PUFA contents are known for other microalgae than diatoms (Ma et al., 2022). Therefore, the next step should be an examination of optimum culture conditions for better productivity of *n*-3 PUFA, that is, both its content and algal growth rate of the isolates obtained in the present study (Ma et al., 2022).

Yongmanitchai and Ward (1991) investigated optimal culture conditions to maximize the EPA production of *P. tricorutum* and increase the EPA content by increasing salinity in the medium. A similar observation was made in *Nitzschia laevis*, which showed elevated EPA content presumably as a result of decreasing cell membrane fluidity to withstand high salinity (Chen et al. 2008). In addition, light, temperature, and growth stage are known

to be effective environmental factors that promote EPA accumulation (Li et al. 2014). In the present study, while an optimal culture condition for EPA accumulation of *Diploneis* sp. was not examined, it is expected to increase EPA content of *Diploneis* sp. by suitable combination of the above factors.

4.2. Application of *Diploneis* sp. to aquaculture

Benthic diatoms are known to be fed by a variety of benthic marine organisms (Araújo-Castro & Souza-Santos 2005, Gerdol & Hughes 1994, Kanaya et al. 2005, Kawamura et al. 1998, Xing et al. 2007). In aquaculture, benthic diatoms are used as feed for the larvae of abalone, sea urchin, and harpacticoid copepod *Tisbe biminiensis*, and EPA and DHA in diatoms promote their growth, survival, settlement, reproduction and development (Araújo-Castro & Souza-Santos 2005, Gordon et al. 2006, Liu et al. 2007, Pinto et al. 2001, Xing et al. 2007, 2008). In addition, since *T. biminiensis* has a relatively low DHA content compared with other harpacticoid copepods, it is necessary to increase its DHA content before feeding it to fish larvae (De Lima et al. 2013, Liu et al. 2007). For this purpose, *Diploneis* sp. isolated in the present study containing relatively high EPA and DHA content can be used as a food for *T. biminiensis* as well as other benthic organisms.

4.3. Ecological significance of diatoms near the Goto Islands

Diatom blooms are recurrent every spring in the waters around the Goto Islands, followed by the increase of copepod abundance from spring to summer (Enomoto 1957, Enomoto & Hamada 1962). The dominance of calanoid and oncaeidae copepods was reported from August to September in the vicinity of the Goto Islands (Tanaka et al. 2006). Copepods contain fatty acids in wax esters that are mainly derived from phytoplankton

feeding (Sargent & Peterson 1988). Calanoid copepods contain a large amount of C16 and 20:5 fatty acids, which are known as characteristic fatty acids of diatoms (Katter 1989). According to the feeding experiment of *Acartia*, high levels of 16:1 (*n*-7) and EPA were found in their bodies after feeding diatoms (Dalsgaard et al. 2003). Moreover, when *Calanus helgolandicus* feeds diatoms, fatty acid composition is quite similar to that of the fed diatoms (Dalsgaard et al. 2003, Graeve et al. 1994). These observations indicate that calanoid copepods obtain 16:1 (*n*-7), EPA and other fatty acids directly by feeding diatoms. EPA is strongly correlated with the egg production rate of calanoid copepods (Brett & Muller-Navarra 1997). Egg production of *Acartia tonsa* fed by diatoms increases 10 times higher than that fed by ciliates, and the diatom-eating copepods and their eggs contain EPA predominantly (Brett & Muller-Navarra 1997). In general, marine animals uptake EPA directly by feeding, and convert it to prostaglandins for their growth and reproduction (Dunstan et al. 1994). The isolated diatoms in the present study contained EPA with variable contents ranging from 0.70 to 6.7 mg g-DW⁻¹, indicating that these diatoms contribute to egg production of calanoid copepods. In the waters around the Goto Islands, *Thalassiosira subtilis* was dominant from January to March, followed by copepods (Enomoto 1957), suggesting *T. subtilis* containing EPA supports the population growth of copepods (Fig. 2).

5. Conclusion

In this study, five diatom strains were isolated from Goto Islands and their fatty acid composition was evaluated. Among the isolates, *Diploneis* sp. contained the highest EPA and DHA, suggesting its potential for food for larvae in aquaculture. In order to exploit this possibility, an examination of optimum environmental factors

for higher EPA and DHA content as well as for growth rate is the next step. In addition, since it was indicated that diatoms contribute to the egg production of zooplankton around the Goto Islands, the ecological implication of PUFA contents in diatoms is an interesting subject to understand planktonic dynamics in this area.

Acknowledgments

We thank Masahiro Ohtake for his assistance at sea. Comments of Victor Kuwahara improved the manuscript. This research was financially supported by the JST-JICA SATREPS program (JPMJSA1509).

References

- Araújo-Castro CMV, Souza-Santos LP (2005) Are the diatoms *Navicula* sp. and *Thalassiosira fluviatilis* suitable to be fed to the benthic harpacticoid copepod *Tisbe biminiensis*? J Exp Mar Bio Ecol 327: 58–69.
- Bligh EG, Dyer WJ (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. Can J Biochem Physiol 37: 911–917.
- Brett MT, Müller-Navarra DC (1997) The role of highly unsaturated fatty acids in aquatic food web processes. Freshw Biol 38: 483–499.
- Chen GQ, Jiang Y, Chen F (2008) Salt-induced alterations in lipid composition of diatom *Nitzschia laevis* (Bacillariophyceae) under heterotrophic culture condition. J Phycol 44: 1309–1314.
- Dalsgaard J, John SM, Kattner G, Muller-Navarra D, Hagen W (2003) Fatty acid trophic markers in the pelagic marine environment. Ad Mar Biol 46: 225–352.
- Dulvy NK, Sadovy Y, Reynolds JD (2003) Extinction vulnerability in marine populations. Fish Fish 4: 25–64.
- Dunstan GA, Volkman JK, Barrett SM, Leroi J-M, Jeffrey SW (1994) Essential polyunsaturated fatty acids from 14 species of diatom (Bacillariophyceae). Phytochemistry 35: 155–161.
- Enomoto Y (1957) Studies on plankton in the west coast of Kyushu. 1. on the seasonal successions of phytoplankton and zooplankton chiefly in 1954. Bull Sei Reg Fish Res Lab 11: 2–9.
- Enomoto Y, Hamada S (1962) Studies on plankton off the west coast of Kyushu- III . on the foods of the sardine, *Sardinia melanosticta*. Bull Jap Soc Sci Fish 28: 314–321.
- Gordon N, Neori A, Lee J, Harpaz S (2006) Effect of diatom diets on growth and survival of the abalone *Haliotis discus hannai* postlarvae. Aquaculture 252: 225–233.
- Hamilton ML, Warwick J, Terry A, Allen MJ, Napier JA, Sayanova O (2015) Towards the industrial production of omega-3 long chain polyunsaturated fatty acids from a genetically modified diatom *Phaeodactylum tricornutum*. PLoS ONE 10: e0144054.
- Kawamura T (1994) Taxonomy and ecology of marine benthic diatoms. Mar Foul 10: 7–25.
- Lenihan-Geels G, Bishop KS, Ferguson LR (2013) Alternative sources of omega-3 fats: can we find a sustainable substitute for fish? Nutrients. 5: 1301–1315.
- Li HY, Lu Y, Yang WD, Liu JS (2014) Biochemical and genetic engineering of diatoms for polyunsaturated fatty acid biosynthesis. Mar Drugs 12: 153–166.
- Liu H, Kelly MS, Cook EJ, Black K, Orr H, Zhu JX, Donh SL (2007) The effect of diet type on growth and fatty acid composition of the sea urchin larvae, II. *Psammechinus miliaris* (Gmelin). Aquaculture, 264: 263–278.
- Ma W, Liu M, Zhang Z Xu Y, Huang P, Guo D, Sun X, Huang H (2022) Efficient co-production of EPA and DHA by *Schizochytrium* sp. via regulation of the polyketide synthase pathway. Commun Biol 5: 1356.

- Mao X, SHY Chen, Lu X, Yu J, Liu B. (2020) High silicate concentration facilitates fucoxanthin and eicosapentaenoic acid (EPA) production under heterotrophic condition in the marine diatom *Nitzschia laevis*. *Algal Res* 52: 102086.
- Ministry of the Environment (2016) Ecologically or biologically significant marine areas identified by Japan. <https://www.env.go.jp/nature/biodic/kaiyohozen/kaiiki/engan/15501.html>
- Patil V, Reitan KI, Knutsen G, Mortensen LM, Källqvist T, Olsen E, Vogt G, Gislerød HR (2005) Microalgae as source of polyunsaturated fatty acids for aquaculture. *Curr Topics Plant Biol* 6: 57–65.
- Pinto CSC, Souza-Santos LP, Santos PJP (2001) Development and population dynamics of *Tisbe biminiensis* (Copepoda: Harpacticoida) reared on different diets. *Aquaculture* 198: 253–267.
- Renaud SM, Parry DL, Thinh LV (1994) Microalgae for use in tropical aquaculture I: gross chemical and fatty acid composition of twelve species of microalgae from the Northern Territory, Australia. *J Appl Phycol* 6: 337–345.
- Servel MO, Claire C, Derrien A, Coiffard L, Roeck-Holtzhauer D (1994) Fatty acid composition of some marine microalgae. *Phytochemistry* 36: 691–693.
- Steinrücken P, Mjøs SA, Prestegard SK, Erga SR (2018) Enhancing EPA content in an arctic Diatom: a factorial design study to evaluate interactive effects of growth factors. *Front Plant Sci* 9: 491.
- Tachihana S, Nagao N, Katayama T, Hirahara M, Yusoff FMd, Banerjee S, Shariff Md, Kurosawa N, Toda T, Furuya K (2020) High productivity of eicosapentaenoic acid and fucoxanthin by a marine diatom *Chaetoceros gracilis* in a semi-continuous culture. *Front Bioeng Biotechnol* 8: 602721.
- Thronsen J (1978) “The dilution-culture method.” *Phytoplankton manual. Monographs on oceanographic methodology* 6, (ed Sournia A) UNESCO, Paris. pp. 218–224.
- Viso AC, Marty JC (1993) Fatty acids from 28 marine microalgae. *Phytochemistry* 34: 1521–1533.
- Waldock MJ, Holland DL (1984) Fatty acid metabolism in young oysters, *Crassostrea gigas*: polyunsaturated fatty acids. *Lipids* 19: 332–336.
- Xing R, Wang C, Gao X, Chang Y (2008) Settlement, growth and survival of abalone, *Haliotis discus hannai*, in response to eight monospecific benthic diatoms. *J Appl Phycol* 20: 47–53.
- Yongmanitchai W, Ward OP (1991) Growth of and omega-3 fatty acid production by *Phaeodactylum tricorutum* under different culture conditions. *Appl Environ Microbiol* 57: 419–425.
- Zhukova NV, Aizdaicher NA (1995) Fatty acid composition of 15 species of marine microalgae. *Phytochemistry* 39: 351–356.

メカノケミカル法による $\text{Sr}_4\text{Nb}_2\text{O}_9\text{-N}$ の調製と光触媒能評価

西健斗¹、廣川心²、松山達¹、井田旬一^{1,*}

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

Synthesis of $\text{Sr}_4\text{Nb}_2\text{O}_9\text{-N}$ by mechanochemical method and evaluation of their photocatalytic activity

Kento Nishi¹, Kokoro Hirokawa², Tatsushi Matsuyama¹, Junichi Ida^{1,*}

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

* Corresponding author: ida@soka.ac.jp

2024年5月6日受付、2024年5月6日受理

Abstract Perovskite-type oxynitrides often exhibit intense colors and have the potential for applications such as visible light responsive photocatalysts. Wu et al. (2016) reported that nitrogen-doped $\text{Sr}_4\text{Nb}_2\text{O}_9$, which is one of the Perovskite-type oxynitride, demonstrated high oxygen generation efficiency for water splitting under visible light irradiation. However, these oxynitrides have been synthesized by the direct nitridation method which require very severe reaction conditions such as high temperature (900-1100 °C) under ammonia flow for long time (e.g., 10 h). Thus, a safer and more convenient synthesis method is required. As an alternative, the mechanochemical method has attracted attention recently. This method does not need to treat sample at high temperature under ammonia flow for a long time to dope nitrogen, and instead, solid materials such as $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ can be utilized as nitrogen sources. Therefore, in this study, we attempted to develop a more safer and simple synthesis method of nitrogen-doped $\text{Sr}_4\text{Nb}_2\text{O}_9$ by using the mechanochemical method. The experimental results showed that $\text{Sr}_4\text{Nb}_2\text{O}_9\text{-N}$ prepared by the mechanochemical method at a rotation speed of 600 rpm for 1 h showed the highest hydrogen production rate among the various mechanochemical conditions with different rotation speeds and times. The result indicates that the mechanochemical methods is an effective method to synthesize visible light responsive photocatalyst for hydrogen production with much safer and simpler condition compared to the conventional methods.

Keywords: photocatalyst, visible light, mechanochemical method

1. 緒言

水素は、エネルギー利用時に CO₂ を排出しないことから新たな再生可能エネルギーとして注目されている。2022 年現在、日本の一次エネルギー供給における化石燃料の比率は 83.4% であり、再生可能エネルギーはわずか 7.5% であることから（経済産業省資源エネルギー庁 2022）、持続可能な社会実現のためには、化石燃料から水素をはじめとする再生可能エネルギーへの移行が必要である。現在、水素は天然ガスなどの水蒸気改質（Dawood et al. 2020）による生産が一般的であるが、改質によって水素と同時に二酸化炭素も生成するため、大規模な生産には二酸化炭素の回収が必要となる（ブルー水素）。そのため、化石燃料等を使用せず、太陽光エネルギー等を使って水分解から水素を作る方法（グリーン水素）が求められている。近年、太陽光と光触媒を使用した水分解は、グリーン水素製造の有望な方法として期待されている。

光触媒による水分解は、本多・藤嶋効果（Fujishima & Honda 1972）の発見以降、その開発と最適化に向けて多くの研究が行われてきた。TiO₂ は最も多く用いられている代表的な材料であるが、より高活性な光触媒材料を求めて多くの研究者が新たな光触媒の開発に取り組んでいる（Reddy et al. 2003, Sakata et al. 2014）。Kudo らは、タンタル酸塩が水分解に対して高い活性を示すことを報告した（Kudo & Kato 1997, Kudo et al. 1999）。また、タンタルと同族のニオブ酸塩についても同様に、水分解用の光触媒として報告されている。タンタル酸塩とニオブ酸塩は各金属の原子半径がほぼ等しいことから同形構造を持つことが多く、金属種の違いによる水分解性能の比較が評価されてきた（Kudo et al. 2000, Kato et al. 2002, Tian et al. 2007）。

従来の高活性な光触媒は、広いバンドギャップにより吸収できる光波長が紫外光までに限定されているものが多い。しかし、紫外光は太陽光スペクトルに含まれるエネルギーのうちの 5% しか存在しないため、太陽光の利用を目的とした光触媒においては、光利用効率の観点

から可視光応答化が求められており、近年は可視光応答型光触媒の研究が非常に活発になっている（Ohno et al. 1999, Yin et al. 2006）。先述したタンタル酸塩は、可視光応答型光触媒として水分解に高い光触媒活性を示すことが知られているが、これらに非金属元素の N を添加し、その酸化還元電位（エネルギー準位）を使用して価電子帯を負側にシフトさせる取り組みは、Ta の高い還元力を維持したままさらにバンドギャップを狭小可能なため、より広範囲の可視光を吸収する手法として有効である。これにより生成する酸窒化物 TaON のバンドギャップは、Ta の 5d 軌道から N の 2p 軌道までとなっており、O の 2p 軌道よりバンドギャップは狭くなっている。このように酸素原子を窒素原子に置換する窒素ドーピングの検討は、光触媒の可視光応答化の研究で注目されている（Hitoki et al. 2002）。タンタル酸塩と同様に、ニオブ酸塩にも窒素ドーピング可能なことが報告されており（Li et al. 2017）、その中でも Wu らは、二重ペロプスカイト構造光触媒 Sr₄Nb₂O₉N の合成に成功している（Wu et al. 2016）。ペロプスカイトは、一般に ABX₃ の構造式を持ち、B カチオンと X アニオンが BX₆ 八面体を形成し、A カチオンが八面体の隙間に充填された構造を取っている。この結晶構造により、電荷の移動が効率良く進行することが知られており、光触媒活性の向上に寄与することが期待される。加えて、二重ペロプスカイトはコーナーリンクされた BX₆ と B'X₆ の交互の八面体がより補完的に作用することにより、単一ペロプスカイト以上の効果が期待される（Xu et al. 2019）。Wu らはこのような光触媒に窒素ドーピングを行い、水の酸化半反応における高効率の酸素発生特性を実証した。一方で、水素製造実験においては少量の水素しか検出されなかった。彼らはその原因を粒子表面の窒素欠乏によるものだと指摘していた。Ivanova らは貴金属及び金属酸化物を含む様々な助触媒を La ドープ NaTaO₃ に担持させ、犠牲剤存在下での水素及び酸素の生成メカニズムを詳細に調査した（Ivanova et al. 2018）。結果として、メタノールが犠牲還元剤として用いられる場合、金属酸化物 NiO を担持した時が最も高い水分解活性（水素、

酸素の両方の生成)を示すことを明らかにした。したがって、犠牲剤と助触媒を適切に選定することができれば、Sr₄Nb₂O₉Nも水素製造に適した光触媒として機能する可能性が残されている。

しかし、二重ペロブスカイト構造光触媒 Sr₄Nb₂O₉Nは、直接窒化法によるアンモニア雰囲気下での高温 (900-1000 °C) かつ長時間 (10 時間) の反応が必要となるため、より安全且つ簡便な合成法の開発が求められている。一方、Yin らは、メカノケミカル法を用いた窒素ドープ型酸化チタン光触媒の合成法を報告している (Yin et al. 2006)。メカノケミカル法とは、固体の粉碎によって起こる物質表面の結合状態変化を利用した合成法で、従来法に比べて安全且つ簡便な合成法であると言える。

そこで本研究では、メカノケミカル法を用いて、従来の直接窒化法よりも安全且つ簡便に窒素ドープ型光触媒 Sr₄Nb₂O₉Nを調製し、その調製条件が光触媒能 (水素生成能) にどのような影響を与えるのか検討を行った。ここではメカノケミカル法の調製条件であるボールミルの回転速度と回転時間が、得られた光触媒の水素生成活性に及ぼす影響を調査した。

2. 材料と方法

2.1. メカノケミカル法による Sr₄Nb₂O₉N の調製

前駆体 Sr₄Nb₂O₉ は、固相合成法を用いて調製した。固相合成法は、常温で反応しない物質や常温で反応にくい物質を、1000 °C から 1500 °C の高温条件下で合成する手法である。出発物質には、SrCO₃ (99.9%) および Nb₂O₅ (99.9%) を用いた。まず、これらを乳鉢中でエタノールを加えながら 90 分混合した。その後、アルミナ製容器に移し、マッフル炉 (KDF S7, デンケン) を用いて、1000 °C の空気雰囲気下で、9 時間焼成した。

合成した前駆体 Sr₄Nb₂O₉ に全体の 15 wt% となる量の尿素 CO (NH₂)₂ を混合し、得られた試料 2.0 g をメカノケミカル合成における Sr₄Nb₂O₉N の出発原料とした。ジルコニア製バイアル容器に出発原料とジルコニア

ボール 7 個を投入した。容器内部は窒素雰囲気下にし、遊星型ボールミル (フリッチュ, P7) を用いて任意の回転速度および回転時間でメカノケミカル合成を行った。容器内部の窒素によるパージ操作の時間は 5 分間とした。また、ここでの回転速度とはボールミル本体のプレートの公転速度を指し、本研究で使用した遊星型ボールミル P7 では、容器の自転速度が公転速度の 2 倍となるよう設計されている。メカノケミカル処理後、容器から試料を取り出して、空气中 400 °C で 1 時間加熱処理を行った。本研究では、メカノケミカル法による回転速度および回転時間の影響を評価するため、回転速度を 100 ~ 700 rpm、回転時間を 0.5 ~ 3 時間の範囲で変更し、実験を行った。

2.2. 特性評価

得られた試料は、X 線回折 (XRD, Bruker, D8 ADVANCE) を用いて構造解析を行った。粒子を試料板の凹部に入れ、ガラス板で試料面が平らになるよう均一に充填した。充填した試料板を X 線回折装置にセットし、2θ を 10° ~ 90° の範囲で測定した。試料の結晶構造解析には、COD (Crystallography Open Database) のピークデータ (Card number: 1525890) を用いた。

比表面積を評価するため、高機能比表面積測定装置 (ASAP2020, micromeritics, Adsorption Porosimeter, Shimadzu) を用いて BET 比表面積の測定を行った。

BET 比表面積は、式 (1) の BET 式によって提案された多分子層吸着理論に基づいて算出される比表面積のことである。

$$\frac{P}{V(1-x)} = \frac{1}{V_m C} + \frac{x(C-1)}{V_m C} \quad (1)$$

V は吸着量、x は相対圧 (吸着気体の飽和蒸気圧 P₀ に対する吸着平衡圧 P の比)、V_m は単分子吸着量、C は吸着熱に関するパラメータである。

光吸収特性を評価するために、積分球を用いた紫外可視近赤外分光光度計 (V-650, JASCO) を用いて拡散反射法によって吸収波長測定を行った。

2.3. 光触媒能評価

光触媒能評価は、可視光照射下でのアルコール-水混合物の分解反応によって生成される水素を経時的に測定し、その生成速度により評価した。実験前に、含浸法により助触媒である NiO を 0.5 wt% となるよう $\text{Sr}_4\text{Nb}_2\text{O}_9\text{N}$ に担持させた。0.03 M 硝酸ニッケル水溶液に $\text{Sr}_4\text{Nb}_2\text{O}_9\text{N}$ を浸漬し、ホットプレート (Magnetic Stirrer with Heater RCH-3L, EYELA) 上で乾燥するまで加熱した。その後、マッフル炉で昇温速度 $10^\circ\text{C min}^{-1}$ で 367°C まで熱し、1 時間焼成した。

光触媒能実験は、バッチ式反応器を用いて行った (Fig. 1)。まず、120 mL のパイレックス瓶に、犠牲剤として 40 vol% メタノール水溶液 100 mL と NiO を担持した $\text{Sr}_4\text{Nb}_2\text{O}_9\text{N}$ を 0.1 g 加え、超音波分散を 10 分間行った。その後、暗所で攪拌することで吸着平衡とした。30 分間窒素パージを行い、密閉した後、実験を開始した。キセノンランプ (USHIO, UXR-300DU) に紫外カットフィルター (ASAHI SPECTRA, コールドフィルター 1200) と取り付けすることで可視光 ($\lambda \geq 410 \text{ nm}$) を照射した。サンプリングはガスタイトシリンジを用いて、20 mL のガスヘッドスペースから経時的に行い、GC-TCD (Shimadzu, GC-2014) で分析した。この時、反応器内のガス体積を一定にするために、サンプリングした分と同体積分の窒素ガスをパイレックス瓶に補充した。

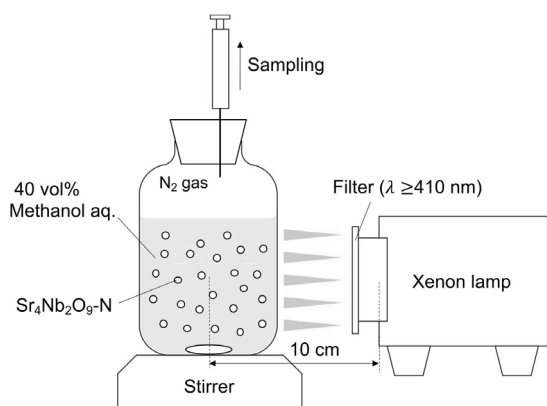


Fig. 1. Reactor diagram for photocatalytic performance.

3. 結果および考察

3.1. $\text{Sr}_4\text{Nb}_2\text{O}_9\text{N}$ の特性評価

Fig. 2 に固相合成法で調製した前駆体試料 $\text{Sr}_4\text{Nb}_2\text{O}_9$ および、メカノケミカル法で調製をした窒素ドープ型光触媒試料 $\text{Sr}_4\text{Nb}_2\text{O}_9\text{N}$ の XRD パターンを示す。 $\text{Sr}_4\text{Nb}_2\text{O}_9\text{N}$ は、回転速度 600 rpm で 1 時間処理した試料の結果を示した。結果より、メカノケミカル処理前後のいずれの試料も $\text{Sr}_4\text{Nb}_2\text{O}_9$ 特有のピークを示していることから、 $\text{Sr}_4\text{Nb}_2\text{O}_9$ の合成に成功したことが分かった。また、窒素ドープ前後で結晶構造の変化もほとんどなく、窒素ドープを行っても $\text{Sr}_4\text{Nb}_2\text{O}_9$ の結晶構造が保持されることが分かった。しかし、 $\text{Sr}_4\text{Nb}_2\text{O}_9\text{N}$ のピーク強度が $\text{Sr}_4\text{Nb}_2\text{O}_9$ と比較して小さいことから、窒素ドープにより結晶化度が低下したことが確認された。

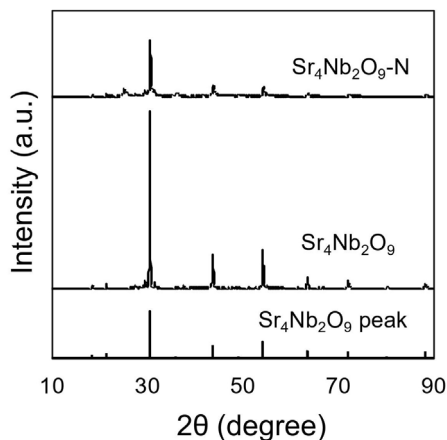


Fig. 2. XRD pattern of synthesized $\text{Sr}_4\text{Nb}_2\text{O}_9$ and $\text{Sr}_4\text{Nb}_2\text{O}_9\text{N}$.

Fig. 3 に前駆体試料 $\text{Sr}_4\text{Nb}_2\text{O}_9$ および、窒素ドープ型光触媒試料 $\text{Sr}_4\text{Nb}_2\text{O}_9\text{N}$ の UV-vis 吸光スペクトルを示した。メカノケミカル処理後の吸収スペクトルは前駆体に比べ、吸収端波長が長波長側へシフトしていることが観察された。この結果より、メカノケミカル処理を用いた窒素ドープにより、試料の光吸収が可視光応側へ大きくシフトしたことが確認された。

ここで、以降の光触媒性能の比較のため、2つの値を定義した。一つは、XRD の最も高いピークの強

度を最強線ピーク強度とし、「結晶化度 (Intensity)」の指標として用いた。もう一方は、UV-vis 吸光スペクトルの結果から吸収端波長を決定し、 $\text{Sr}_4\text{Nb}_2\text{O}_9\text{N}$ の光吸収スペクトルの吸収端波長までの積算の吸収量と前駆体の光吸収スペクトルの同じく吸収端までの積算の吸収量との差分を光吸収増加量とし、窒素ドーピングにより増加した「光吸収量 (Abs. area)」の指標として用いた。

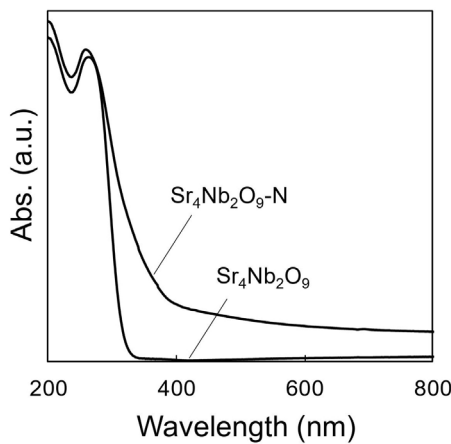


Fig. 3. UV-vis spectra of $\text{Sr}_4\text{Nb}_2\text{O}_9$ and $\text{Sr}_4\text{Nb}_2\text{O}_9\text{N}$.

3.2. 回転速度による影響

メカノケミカル法での処理において回転時間を1時間に固定し、回転速度を 100~700 rpm で変化させた時の、結晶化度および光吸収量の関係を Fig. 4 (a) に示した。結晶化度は、回転速度の増加に伴い、単調に減少した一方、光吸収量は増加した。したがって、結晶化度と光吸収量の間にはトレードオフの関係があると考えられる。

次に、回転速度による BET 比表面積への影響を Fig. 4 (b) に示した。回転速度の増加に伴い、比表面積は 600 rpm まで増加したが、700 rpm では急激に減少する傾向が観察された。このように、ある回転速度以上で比表面積が増加から減少に転ずる要因の一つとして、逆粉碎現象が考えられる。逆粉碎とは、メカノケミカル法でしばしばみられる現象で、ボールミルで微粉碎を過剰に行うと逆に粉碎した微粒子同士が再凝集

し、比表面積が小さくなる現象である。そこで、各回転速度条件における粒子径を観察するために電子顕微鏡 FE-SEM を用いて観察を行い、結果を Fig. 5 に示した。前駆体 $\text{Sr}_4\text{Nb}_2\text{O}_9$ は、一次粒子径が 400 nm 程度であったが、回転速度の増加に伴い一次粒子径は小さくなった。しかし、600 rpm で一次粒子径は最小となり、700 rpm では、600 rpm に比べ比較的大きな粒子が散見された。この結果は、比表面積が 600 rpm まで増加し、その後減少した結果と一致した。以上の結果を比較検討したところ、メカノケミカル法の回転時間を1時間に固定した場合、600 rpm の回転速度で調製した試料が結晶化度、可視光吸収量、比表面積において最もバランス良く高いことが明らかとなった。

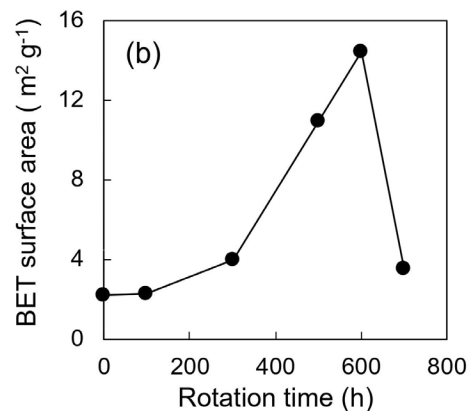
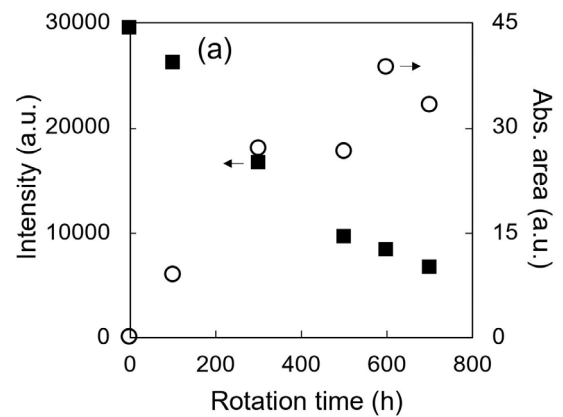


Fig. 4. (a) Crystallinity and light absorption area of $\text{Sr}_4\text{Nb}_2\text{O}_9\text{N}$ synthesized at each rotation speed. The “■” symbol shows data for the intensity and the “○” symbol shows data for absorbent area. (b) BET surface area of $\text{Sr}_4\text{Nb}_2\text{O}_9\text{N}$ synthesized at each rotation speed.

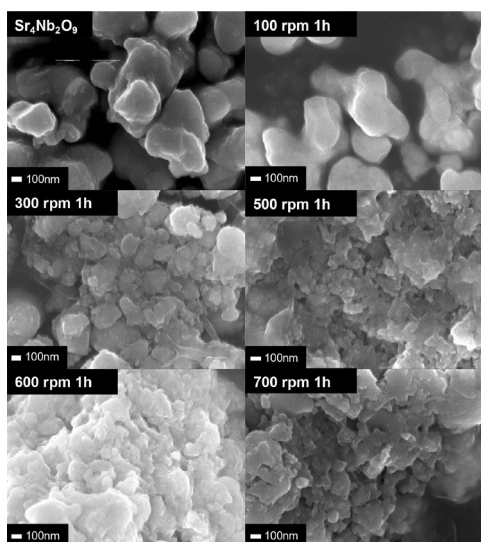


Fig. 5. SEM image of precursor and $\text{Sr}_4\text{Nb}_2\text{O}_9\text{-N}$ synthesized at each rotation speed.

3.3. 回転時間による影響

メカノケミカル法の回転速度を 600 rpm で固定し、回転時間を 0.5 ~ 3 時間で変化させた時の結晶化度および光吸収量の変化を Fig. 6 (a) に示した。回転時間の増加とともに、結晶化度は減少し、光吸収量は増加する傾向が確認された。特に結晶化度は、1 時間の粉碎で急激な減少が見られたが、可視光吸収量は 2 時間の粉碎でピークに達した。以上の結果より、結晶化度と光吸収増加量はどちらも短時間で大きく変化し、その後一定値に近づく傾向を示すことが明らかとなった。

また、試料の比表面積と回転時間の関係から (Fig. 6 (b))、1 時間までは比表面積は増加し、それ以上の時間で粉碎を続けると逆粉碎現象により粒子の再凝集による比表面積の低下が生じた。これらの試料を電子顕微鏡で観察した結果を Fig. 7 に示した。比表面積の結果と同様に、0.5 時間および 1 時間では、一次粒子径が小さいものの、2 時間および 3 時間の試料では粒子径の増大が観察された。

以上の結果より、回転速度および回転時間が増加するほど、結晶化度は減少し、逆に可視光吸収量は大きくなる傾向があり、回転速度 600 rpm で 1 時間の粉碎条件を境にそれ以上の回転速度、または回転時間では逆粉碎現象が起き、粒子が粉碎から再凝集に切り替わることがわかった。

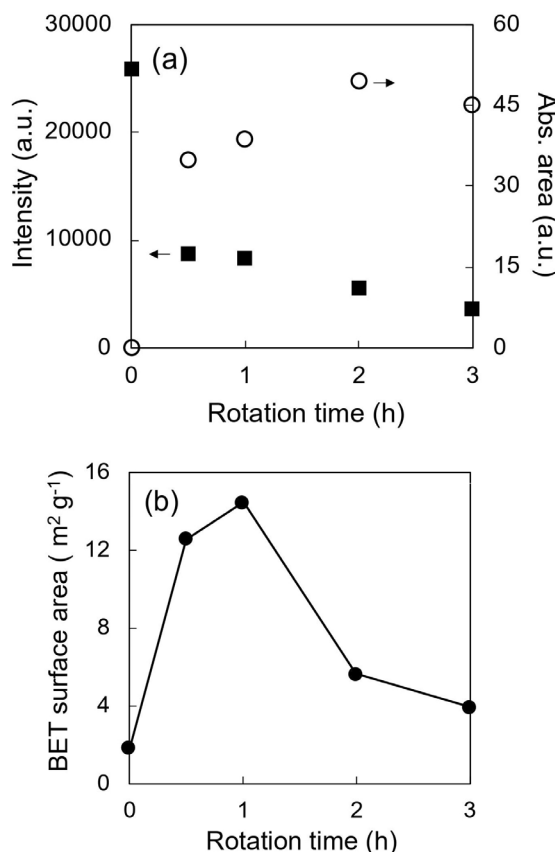


Fig. 6. (a) Crystallinity and light absorption increase of $\text{Sr}_4\text{Nb}_2\text{O}_9\text{-N}$ synthesized at each rotation time. The “■” symbol shows data for the intensity and the “○” symbol shows data for absorbent area. (b) BET surface area of $\text{Sr}_4\text{Nb}_2\text{O}_9\text{-N}$ synthesized at each rotation time.

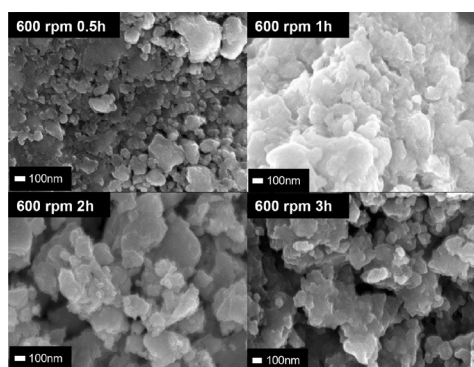


Fig. 7. SEM image of precursor and $\text{Sr}_4\text{Nb}_2\text{O}_9\text{-N}$ synthesized at each rotation time.

3.4. 光触媒能評価

メカノケミカル法の回転時間を 1 時間に固定し、回転速度を 100、300、600 rpm で変化させて得られた

$\text{Sr}_4\text{Nb}_2\text{O}_9\text{N}$ の水素生成速度を Fig. 8 (a) に示した。結果より、回転速度 600 rpm で調製した試料が最も水素生成速度が速く、3 条件の中で最も高い光触媒能を示した。この試料の特性結果に着目すると、光触媒に影響を与える特性である、結晶化度、可視光吸収量、比表面積がそれぞれ他の試料よりもバランス良く高い特性を示していたため、光触媒能が大きくなったと考えられる。

続いて、メカノケミカル法の回転速度を 600 rpm で固定し、回転時間を 0.5、1、2、3 時間で変化させた時の、 $\text{Sr}_4\text{Nb}_2\text{O}_9\text{N}$ の水素生成速度を Fig. 8 (b) に示した。結果より、回転速度が 1 時間の試料までは水素生成速度が向上するが、それ以上の回転時間で調製した試料では、回転時間が増加するほど水素生成速度が低下することが示された。これは、逆粉碎現象が起きた後も粉碎を続けると、結晶化度と比表面積が徐々に減少していくため、総合的に光触媒として適さない粒子特性に変化するためと考えられる。

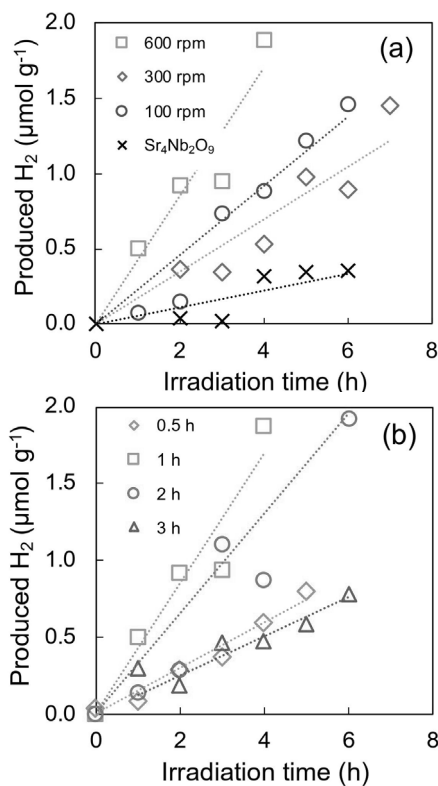


Fig. 8. (a) H_2 production by light irradiation of $\text{Sr}_4\text{Nb}_2\text{O}_9\text{N}$ synthesized at each rotation speed. (b) H_2 production by light irradiation of $\text{Sr}_4\text{Nb}_2\text{O}_9\text{N}$ synthesized at each rotation time.

4. 結論

本研究では、メカノケミカル法を用いて $\text{Sr}_4\text{Nb}_2\text{O}_9\text{N}$ を調製し、その調製条件が得られた試料の水素生成能にどのような影響を与えるかの検討を行った。メカノケミカル処理における回転時間を 1 時間で固定し、回転速度を 0 ~ 700 rpm で変化させ、得られる粒子の特性を評価したところ、結晶化度は単調に減少する一方、光吸収量は増加し、比表面積は 600 rpm 付近で最大となることがわかった。また、回転速度を 600 rpm で固定し、回転時間を 0.5 ~ 3 時間で変化させた結果、結晶化度は短時間で急激に減少後、緩やかに減少した一方、光吸収量は急激に増加後飽和し、比表面積は 1 時間ほどで最大となった後、減少することがわかった。また、水素生成能評価においては、メカノケミカル処理条件が回転速度 600 rpm、回転時間 1 時間の窒素ドープ試料が最も高い水素生成速度を示すことがわかった。この試料は、結晶化度が低いものの、可視光吸収量は中程度で、比表面積は最も高い特性を示していた。本研究の結果は、従来法と比較してより安全且つ簡便なメカノケミカル法を用いて可視光応答型の水素生成光触媒の調製が可能であり、その調製条件が高活性に大きな影響を与えることを示している。今後は、メカノケミカル法の他の調製条件である、窒素源の投入量および種類の検討や、粉碎時の試料投入量を変えることで、これらのパラメーターが水素生成速度に与える影響を明らかにする必要がある。これらを通して、水素生成のための $\text{Sr}_4\text{Nb}_2\text{O}_9\text{N}$ 調製におけるメカノケミカル法の最適な調製条件の探索を行っていく。

引用文献

- Dawood F, Anda M, Shafiullah GM (2020) Hydrogen production for energy: An overview. *Int J Hydrogen Energy*. 45: 3847-3869.
- Fujishima A, Honda K (1972) Electrochemical photolysis of water at a semiconductor electrode. *Nature* 238: 37-38.

- Hitoki G, Takata T, Kondo JN, Hara M, Domen K (2002) An oxynitride, TaON, as an efficient water oxidation photocatalyst under visible light irradiation ($\lambda \leq 500$ nm). *Chem Commun* 2: 1698–1699.
- Ivanova I, Kandiel TA, Cho YJ, Choi W, Bahnemann D (2018) Mechanisms of photocatalytic molecular hydrogen and molecular oxygen evolution over La-doped NaTaO₃ particles: Effect of different cocatalysts and their specific activity. *ACS Catal* 8: 2313–2325.
- Kato H, Kobayashi H, Kudo A (2002) Role of Ag⁺ in the band structures and photocatalytic properties of AgMO₃ (M: Ta and Nb) with the perovskite structure. *J Phys Chem B* 106: 12441–12447.
- 経済産業省資源エネルギー庁 総務課戦略企画室, 令和4年度(2022年度)におけるエネルギー需給実績, 令和6年4月12日公表.
- Kudo A, Kato H (1997) Photocatalytic decomposition of water into H₂ and O₂ over novel photocatalyst K₃Ta₃Si₂O₁₃ with pillared structure consisting of three TaO₆ chains. *Chem Lett* 26: 867–868.
- Kudo A, Kato H, Nakagawa S (2000) Water splitting into H₂ and O₂ on new Sr₂M₂O₇ (M = Nb and Ta) photocatalysts with layered perovskite structures: Factors affecting the photocatalytic activity. *J Phys Chem B* 104: 571–575.
- Kudo A, Nakagawa S, Kato H (1999) Overall water splitting into H₂ and O₂ under UV irradiation on NiO-loaded ZnNb₂O₆ photocatalysts consisting of d10 and d0 ions. *Chem Lett* 28: 1197–1198.
- Li Y, Xiong FQ, Ou R, Wan L, Yin C, Che R, Yang M (2017) Chloride flux growth of crystalline strontium niobates and nitridation to perovskite SrNbO₂N. *Ceram Int* 43: 7695–7700.
- Ohno T, Tanigawa F, Fujihara K, Izumi S, Matsumura M (1999) Photocatalytic oxidation of water by visible light using ruthenium-doped titanium dioxide powder. *J Photochem Photobiol A Chem* 127: 107–110.
- Reddy VR, Hwang DW, Lee JS (2003) Photocatalytic water splitting over ZrO₂ prepared by precipitation method. *Korean J Chem Eng* 20: 1026–1029.
- Sakata Y, Nakagawa T, Nagamatsu Y, Matsuda Y, Yasunaga R, Nakao E, Imamura H (2014) Photocatalytic properties of gallium oxides prepared by precipitation methods toward the overall splitting of H₂O. *J Catal* 310: 45–50.
- Tian M, Shanguan W, Yuan J, Wang S, Ouyang Z (2007) Promotion effect of nanosized Pt, RuO₂ and NiO_x loading on visible-light-driven photocatalysts K₄Ce₂M₁₀O₃₀ (M = Ta, Nb) for hydrogen evolution from water decomposition. *Sci Technol Adv Mater* 8: 82–88.
- Wu F, Lv M, Sun X, Xie Y, Chen H, Ni S, Liu G, Xu X (2016) Efficient photocatalytic oxygen production over nitrogen-doped Sr₄Nb₂O₉ under visible-light irradiation. *Chem Cat Chem* 8: 615–623.
- Xu X, Zhong Y, Shao Z (2019) Double perovskites in catalysis, electrocatalysis, and photo(electro)catalysis. *Trends Chem* 1: 410–424.
- Yin S, Ihara K, Aita Y, Komatsu M, Sato T (2006) Visible-light induced photocatalytic activity of TiO₂-xAy (A = N, S) prepared by precipitation route. *J Photochem Photobiol A Chem* 179: 105–114.

微細藻類－硝化細菌共存系によるメタン発酵消化液中窒素の省エネルギー処理

秋月真一^{1,*}, ヘルマンクエバス - ロドリゲス²

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

Energy-saving treatment of nitrogen in anaerobic digestate from methane fermentation by a consortium of microalgae and nitrifying bacteria

Shin-ichi Akizuki^{1,*}, Germán Cuevas-Rodríguez²

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

2) *Division of Engineering, University of Guanajuato, Av. Juarez 77, CP 36000, Guanajuato, GTO, Mexico*

* *Corresponding author: akizuki@soka.ac.jp*

2024年5月6日受付、2024年5月8日受理

Abstract Biological nitrification-denitrification processes are widely used to remove ammonium (NH_4^+) from wastewater. The nitrification process requires mechanical aeration using a diffuser, which consumes an enormous amount of electricity, making it hardly a sustainable treatment method, and there is a need to develop a more energy-efficient treatment technology. Recently, a consortium of microalgae and nitrifying bacteria in a single reactor has attracted attention as an energy-saving treatment method for NH_4^+ -containing wastewater. In this consortium, nitrifying bacteria can proceed with nitrification reaction using oxygen (O_2) produced by photosynthesis of microalgae instead of mechanical aeration, and power consumption can be significantly reduced compared to the conventional nitrification process. Previous studies on the treatment of NH_4^+ -containing wastewater by the consortium have mainly involved experiments using synthetic wastewaters, and there are few reports on anaerobic digestate from methane fermentation, which are generally known to have high NH_4^+ concentrations, especially those conducted without dilution. In this study, batch treatments of anaerobic digestate at different dilution ratios of 1-fold (without dilution), 2.5-fold, and 5-fold were conducted to evaluate the usefulness of a consortium of microalgae and nitrifying bacteria for nitrogen removal from the digestate. Under all dilution conditions, dissolved oxygen concentrations suitable for nitrification reactions ($>2.0 \text{ mg L}^{-1}$) were maintained throughout the experimental period due to O_2 supply by microalgae photosynthesis, except for a part of the dark period (i.e., from 10 pm to 2 am). On the other hand, the increase in pH due to photosynthesis resulted in a high pH environment (10.2 ± 0.3) unsuitable for nitrification, especially under the 5-fold dilution condition, and less NO_3^-

was produced. In the 1-fold and 2.5-fold dilution conditions, nitrification proceeded from day 20 of the experiment, with NH_4^+ to NO_3^- conversion efficiencies of 70.4% and 56%, respectively. The NH_4^+ removal efficiencies under 1-fold, 2.5-fold, and 5-fold dilution conditions were 65.9%, 71.9%, and 52.4%, respectively. The results of reported studies on anaerobic digestate treatment using a consortium of microalgae and nitrifying bacteria, including this study, were summarized, and the relationship between the ratio of NH_4^+ concentration to inoculum SS concentration (Food/microorganism ratio: F/M ratio) and NH_4^+ removal efficiency was investigated. The summarized result from different studies indicated that treatment performance can be reduced not only at high F/M ratios (0.5 to 1.0 mg-N mg-SS⁻¹ or higher) but also at low F/M ratios (0.07 mg-N mg-SS⁻¹, the 5-fold dilution condition in this study). The inhibition of the consortium at high and low F/M ratios could both be improved by controlling pH to near neutral. pH control can be done without the addition of chemicals by adjusting light intensity or the addition ratio of inoculums to mitigate the action of microalgae. However, excessive suppression leads to a decrease in O₂ supply, so it is essential to set appropriate conditions. There are few examples of studies that aim to stabilize and improve the performance of treatment by intentionally controlling the functions of microalgae and nitrifying bacteria by adjusting light intensity and the addition ratio of inoculums. These studies are the subject of future work.

Keywords: *Chlorella*; F/M ratio; high-strength ammonia wastewater; nitrification; photo-oxygenation

1. 序論

嫌気性細菌及び古細菌の働きを利用し、人間活動由来の有機性廃棄物・廃水をバイオガスへと変換するメタン発酵技術は、持続可能な社会の形成に不可欠な要素として広く普及が望まれる。2000年代以降は、特に東南アジアや中南米等の開発途上国地域を中心に急速にメタン発酵施設の導入が進み、世界の年間バイオガス生成量は2012年から2022年にかけて約2倍の33 Mtoe (toe: 石油換算トン)に増加した(Koonaphapdeelert et al. 2020)。メタン発酵では、原料中の有機性炭素分は加水分解菌、酸生成菌、メタン生成菌の連続的な代謝により分解・ガス化される。一方で、発酵槽内には、無機態窒素を代謝する独立栄養微生物が十分に存在しないため、窒素化合物は除去されず主にアンモニウム (NH_4^+)として残存する

(Uludag-Demirer et al. 2008)。そのため、メタン発酵槽からの排液(消化液)をそのまま水環境中に放流することはできず、適切な後段処理が求められる。

廃水中の NH_4^+ 成分除去には、生物学的硝化-脱窒素プロセスが広く利用されている(Wiesmann 1994)。硝化プロセスでは、硝化細菌の働きで NH_4^+ を硝酸 (NO_3^-) まで酸化し、続く脱窒素プロセスにおいて脱窒素細菌の働きで NO_3^- を窒素ガスまで還元し除去する。硝化細菌が NH_4^+ から NO_3^- までの完全硝化を行うためには、1 mg-N あたり約 4.6 mg の多量の酸素 (O₂) を必要とし(Sharma & Ahlert 1997)、通常、散気装置を用いた機械的曝気は不可欠である(Gu et al. 2017)。この曝気システムは、廃水処理施設内で消費される総電力の 50% ~ 90% の割合を占める(Drewnowski et al. 2019)。そのため、硝化プロセスに依存する従来の NH_4^+ 含有廃水処理法は、インフラ整備とその維持管理に財源を配分可

能な先進国では普及できる一方で、経済的基盤の脆弱な地域での普及は難しい。実際に、開発途上地域では、メタン発酵施設の導入は進む一方で、消化液の適正処理が十分行われず、水環境汚染が深刻化する例が多い (Foresti 2001)。そのため、消化液をより省エネルギーで処理可能な手法の開発が求められている。

2010年代以降、 NH_4^+ 含有廃水の省エネルギー型処理法として、微細藻類と硝化細菌を単一槽内で協働させる微細藻類-硝化細菌共存系に注目が集まっている (Karya et al. 2013, Vargas et al. 2016)。この共存系では、硝化細菌は機械的曝気の代わりに微細藻類の光合成により生成した O_2 を利用して硝化プロセスを進めることができ、従来の硝化プロセスよりも消費電力を大幅に抑えることができる。例えば、微細藻類-硝化細菌共存系による豚舎排泄物のメタン発酵消化液処理を行った Wang et al. (2015) の研究では、微細藻類の光合成により、硝化に必要な O_2 量の 74% を供給できたと報告している。更に、*Chlorella* 属を始めとする多くの微細藻類は、廃水中に含まれる NH_4^+ や NO_3^- 等の窒素源を取り込み、窒素除去に寄与することも知られている (Taziki et al. 2015, Wang et al. 2009)。

既存の微細藻類-硝化細菌共存系による NH_4^+ 含有廃水処理に関する研究は、人工培地を用いた実験が主であり (Karya et al. 2013, Kwon et al. 2019, Sepehri et al. 2020, Vargas et al. 2016, Vergara et al. 2016)、実廃水を用いた場合でも、希釈により NH_4^+ 濃度を調整した実験が多い (Akizuki et al. 2019, Casagli et al. 2021, Wang et al. 2015)。特に、一般的に高 NH_4^+ 濃度と知られる消化液に関しては、無希釈で処理を実施した研究例は限られている (Akizuki et al. 2021, Wang et al. 2020)。これは、基質中の NH_4^+ 濃度が高い場合、微細藻類の光合成に伴う槽内 pH の上昇により遊離アンモニア (NH_3) 濃度が増加し易く、微細藻類と硝化細菌の両微生物の活性を阻害するためである。しかし、Akizuki et al. (2021) の研究では、比較的高い NH_4^+ 濃度 (520 mg-N L^{-1}) の希釈消化液の回分処理において、硝化の進行に伴い最終的な NH_4^+ 除去率は

61.7% に達し、共存系による高 NH_4^+ 含有廃水処理の可能性が示されている。本研究では、微細藻類-硝化細菌共存系による消化液処理への有用性を検証するために、異なる倍率 (1 倍、2.5 倍、5 倍) で希釈した消化液中の NH_4^+ 処理性能を回分実験により評価した。

2. 材料と方法

2.1. 基質と播種試料

メタン発酵消化液は、グアナファト州レオン市内にある屠畜場施設の畜場廃水を原料としたメタン発酵処理槽から採取した。採取した消化液は直ちにグアナファト大学工学部内の実験室に運搬し、保持粒子径 $0.5 \mu\text{m}$ のガラス繊維濾紙 (GC-50, Advantec) を用いてろ過し、使用まで 4°C の冷蔵庫で保管した。ろ液の pH、溶存有機炭素 (Dissolved organic carbon: DOC) 濃度、 NH_4^+ 濃度、 NO_3^- 濃度、および PO_4^{3-} 濃度は、それぞれ 8.19 、 406 mg-C L^{-1} 、 436 mg-N L^{-1} 、 1.11 mg-N L^{-1} 、および 19.9 mg-P L^{-1} であった。

微細藻類には、同州ペンハモ市の屠畜場施設の畜場廃水を原料としたメタン発酵処理槽から排出された消化液から集積培養した藻類群集 (優占種: *Chlorella* sp.) を用いた。硝化細菌源には、同州グアナファト市の下水処理場 (オキシデーションディッチ法) から採取した好気性汚泥を用いた。微細藻類は、遠心分離機 (Centrifugent, CRM Globe) を用いて 3000 rpm で 5 分間遠心し、汚泥は数時間静置して上澄みを除去した。濃縮された微細藻類と汚泥を播種試料として用いた。

2.2. 回分実験条件

反応槽として有効容積 500 mL のガラス製三角フラスコを用い、微細藻類試料と汚泥試料をそれぞれ 0.5 g -懸濁態固形物質 (Suspended solid: SS) L^{-1} となるように添加した。希釈倍率が処理性能に与える影響を評価するために、ろ液を無希釈 (1 倍希釈) で用いた条件に加え、蒸留水を用いて 2.5 倍と 5 倍に希釈した計 3 条件の実験をそれぞれ 2 連で実施した。実験は、温度

25 ± 2℃、光照射強度 10000 lux の条件で 34 日間実施した。光照射は市販の白色 LED を用いて行い、午前 7 時～午後 19 時を明期、午後 19 時～午前 7 時を暗期とし、明暗周期は 12 時間毎とした。反応槽は振とう機 (AGO60-90, Prendo) 上で約 130 rpm の速度で連続的に攪拌し、いずれの条件においても、機械的曝気による槽内への O₂ 供給は行わなかった。

実験試料の採取は午後 12 時～15 時の間に実施した。槽内の pH と溶存酸素 (Dissolved oxygen: DO) 濃度の日周変動を調べるために、実験 4 日目の午後 14 時～5 日目の午後 14 時にかけて 3～5 時間間隔の試料採取を行った。

2.3. 分析項目

基質の pH、DOC 濃度、NH₄⁺ 濃度、NO₃⁻ 濃度、および PO₄³⁻ 濃度を測定し、播種試料の SS 濃度を測定した。反応槽内の懸濁態試料に関しては、pH、DO 濃度、クロロフィル *a* (Chl. *a*) 濃度を測定し、懸濁態試料をガラス繊維濾紙 (GC-50, Advantec) によりろ過したろ液に関しては、NH₄⁺ 濃度と NO₃⁻ 濃度を測定した。

pH と DO 濃度は、それぞれ pH メーター (Multiparameter Orion 4-star plus, Thermo Scientific) と DO メーター (SensION 5, Hach) を用いて測定した。DOC 濃度は、全有機炭素計 (TOC-L, 島津製作所) を用いて測定し、NH₄⁺ 濃度、NO₃⁻ 濃度、および PO₄³⁻ 濃度は、Hach 水質検査キット (比色法) と吸光光度計 (DR2800, Hach) を用いて測定した。SS 濃度は、常法 (American Public Health Association 1998) に準拠して測定した。Chl. *a* は *N, N*-ジメチルホルムアミドにより抽出し、吸光光度計 (DR2800, Hach) を用いて定量した (Wellburn 1994)。

NH₄⁺ 除去率と NH₄⁺ の NO₃⁻ 転換率は、以下の式 (1、2) により算出した。

$$\text{NH}_4^+ \text{除去率 (\%)} = \left(1 - \frac{\text{NH}_4^+ - \text{N}_{\text{day } x}}{\text{NH}_4^+ - \text{N}_{\text{day } 0}}\right) \times 100 \quad (\text{式 } 1)$$

$$\text{NO}_3^- \text{転換率 (\%)} = \frac{\text{NO}_3^- - \text{N}_{\text{day } x}}{\text{NH}_4^+ - \text{N}_{\text{day } 0}} \times 100 \quad (\text{式 } 2)$$

ここで、NH₄⁺-N_{day 0} は実験開始時の初期 NH₄⁺ 濃度を示し、NH₄⁺-N_{day x} と NO₃⁻-N_{day x} は、それぞれ任意の実験日数経過後の NH₄⁺ 濃度および NO₃⁻ 濃度を表している。

NH₃ 濃度は、以下の式 (3) により算出した (Anthonisen et al. 1976)。

$$\text{NH}_3 (\text{mg-N L}^{-1}) = \frac{\text{NH}_4^+ - \text{N} \times 10^{\text{pH}}}{\exp\left(\frac{6344}{273+T}\right) + 10^{\text{pH}}} \quad (\text{式 } 3)$$

ここで、NH₄⁺-N、pH、T は、それぞれ反応槽内の NH₄⁺-N 濃度、pH 値、温度を表している。

3. 結果と考察

3.1. pH、DO 濃度および Chl. *a* 濃度の経時変化

微細藻類-硝化細菌共存系内の pH は、微細藻類の光合成に伴う pH 上昇と硝化細菌による NH₄⁺ 酸化に伴う pH 低下のバランスにより変動する。基質の希釈条件によらず、pH は実験開始直後から 6 日目にかけて増加する傾向を示し、光合成の進行が示唆された (Fig. 1a)。その後、pH は 20 日目まで一定の値を維持し、6 日目から 20 日目までの pH の平均値は、1 倍、2.5 倍、5 倍希釈条件でそれぞれ 8.9 ± 0.1、9.3 ± 0.1、10.2 ± 0.3 を示した。硝化プロセスに適した pH 範囲は 7.0～9.0 であるため (Antonioni et al. 1990, Park et al. 2007, Wu et al. 2006)、特に 5 倍希釈条件では、実験期間を通して硝化に不適な pH 環境であった。1 倍と 2.5 倍希釈条件では、実験 20 日目～26 日目にかけて pH の低下が見られ、硝化の進行が示唆された。

pH と同様に、微細藻類-硝化細菌共存系内の DO 濃度は、光合成による O₂ 生成と NH₄⁺ 酸化による O₂ 消費のバランスで変動する。希釈条件に関わらず、DO 濃度は実験開始直後から 2 日目にかけて増加し、4 日以降は実験終了時まで一定の値を維持した (Fig. 1b)。無希釈条件の 1 日目を除き、いずれの条件でも実験期間を通して 2.7 mg L⁻¹ 以上の DO 値を示し、硝化細菌が NH₄⁺ を NO₃⁻ まで完全酸化するために必要な DO 濃度 (1.0～2.0 mg L⁻¹)

(Hwang et al. 2006, Ruiz et al. 2006) が維持されていた。実験期間を通して、試料採取は光照射が行われている明期中に行っていたため、特に暗期における pH と DO 濃度の変動を調査するために、実験 4 日目～5 日目にかけて 3～5 時間間隔で試料採取を行った (Fig. 2)。24 時間周期の中で pH には大きな変動は見られなかった一方で、DO 濃度は暗期の午後 22 時～午前 2 時にかけて 2.0 mg L^{-1} 以下まで低下し、硝化細菌への O_2 供給が一時的に制限されていた可能性が示された。

Chl. a 濃度は、基質の希釈条件に関わらず実験

開始直後から 4 日目にかけて増加し、その後 20 日目までに減少した (Fig. 3)。特に 2.5 倍と 5 倍希釈条件で高い Chl. a 濃度を示し、両条件で示された比較的高い pH 環境は、微細藻類の光合成によるものであると考えられる。20 日目以降は全条件で再度 Chl. a 濃度の増加が見られ、一度減少した微細藻類が再生産することで、槽内の DO 濃度が維持されていた。

これらの結果から、本実験では、実験開始直後から微細藻類による光合成が活発に生じ、実験期間を通して夜間の一部を除き硝化細菌への O_2 供給は十分行われていたと推察された。

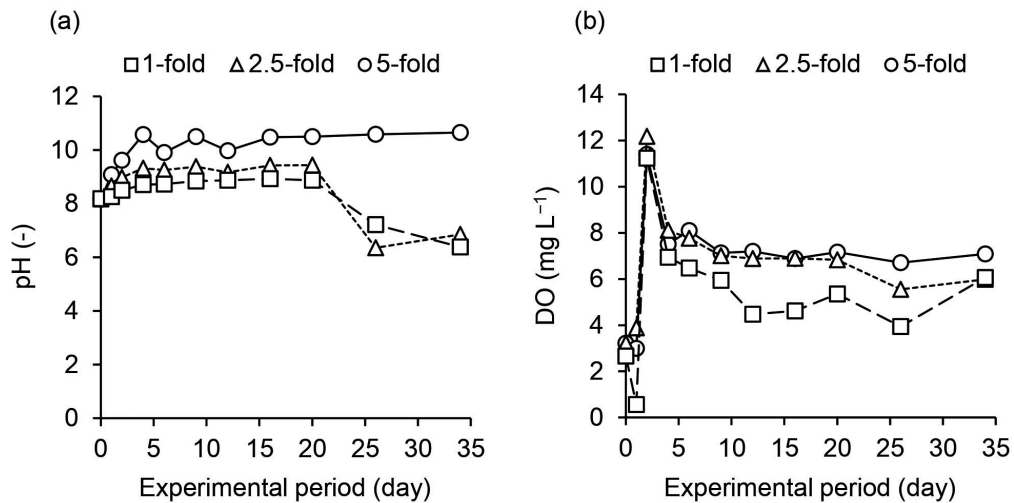


Figure 1. Variations of pH (a) and DO concentration (b) for all conditions.

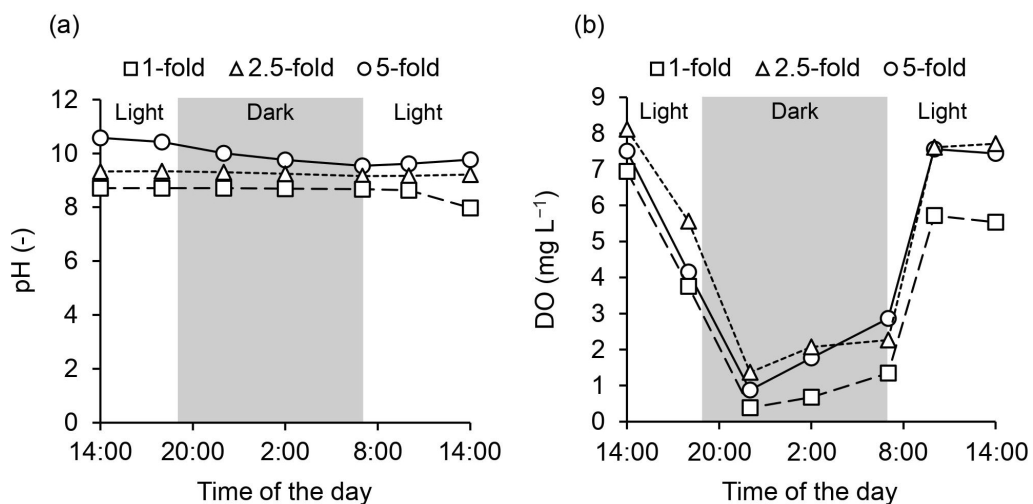


Figure 2. Variations of pH (a) and DO concentration (b) from day 4 to day 5 for all conditions.

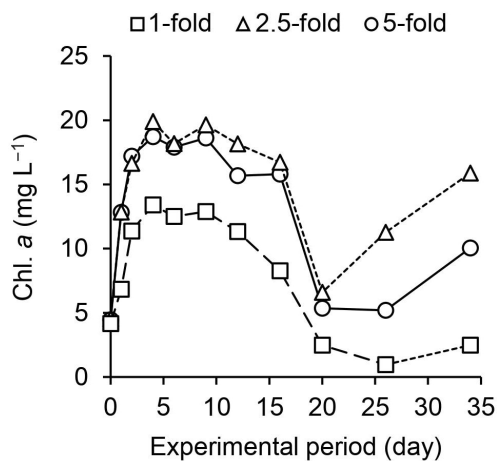


Figure 3. Variations of Chl. *a* concentration for all conditions.

3.2. NH₄⁺ 処理性能評価

窒素化合物 (NH₄⁺ と NO₃⁻) 濃度の経時変化は、基質の希釈条件により差が見られた (Figs. 4a, b)。1 倍と 2.5 倍希釈条件では、実験開始からそれぞれ 20 日目、16 日目以降に NH₄⁺ 濃度が大きく減少し、20 日目以降に NO₃⁻ 濃度の増加が確認された。5 倍希釈条件では実験開始直後に NH₄⁺ 濃度の減少が見られたが、その後実験期間を通して大きな減少は見られず、顕著な NO₃⁻ 生成は確認されなかった。実験終了時の投入 NH₄⁺ の NO₃⁻ 転換率は、1 倍、2.5 倍、5 倍希釈条件でそれぞれ 70.4%、56.2%、3.3% を示した (Fig. 5a)。実験終了時の NH₄⁺ 除去率は、1 倍、2.5 倍、5 倍希釈条件でそれぞれ 65.9%、71.9%、52.4% となり、1 倍と 2.5 倍希釈条件では硝化の進行により比較的高い除去率に達した (Fig. 5b)。

1 倍と 2.5 倍希釈条件でのみ硝化が進行した理由の一つとして、5 倍希釈条件では、実験期間を通して 10 を越える比較的高い pH を示したため (Fig. 1a)、他条件よりも NH₃ 濃度が高くなり、硝化細菌に阻害を与えた可能性がある。しかし、NH₃ 濃度の経時変化を見ると、硝化の進行が開始するまで、むしろ基質 NH₄⁺ 濃度が高い 1 倍と 2.5 倍条件で高い NH₃ 濃度を示していた (Fig. 6)。従って、5 倍希釈条件では、NH₃ 阻害よりも、高い pH 自体により硝化の進行が阻害されていた可

能性がある。Park et al. (2007) が実験データに基づき提示した硝化細菌の基質利用速度と pH の関係性についてのモデルでは、9 ~ 10 の pH 値を境に活性が急激に低下し、本研究でも同様の傾向を示したと考えられる。5 倍希釈条件で高い pH 値が維持された理由として、NH₃ 濃度が比較的低いことで微細藻類が増殖しやすい環境であったことに加え、消化液が持つ緩衝効果が希釈により低下していたことが影響してことも考えられる。消化液にはバイオガス中の CO₂ 由来の炭酸イオンと重炭酸イオンが平衡して存在し、中性付近で緩衝効果を持つが、希釈によりそれが損なわれ、結果として微細藻類の光合成に伴う pH 上昇が顕著に生じた可能性がある。

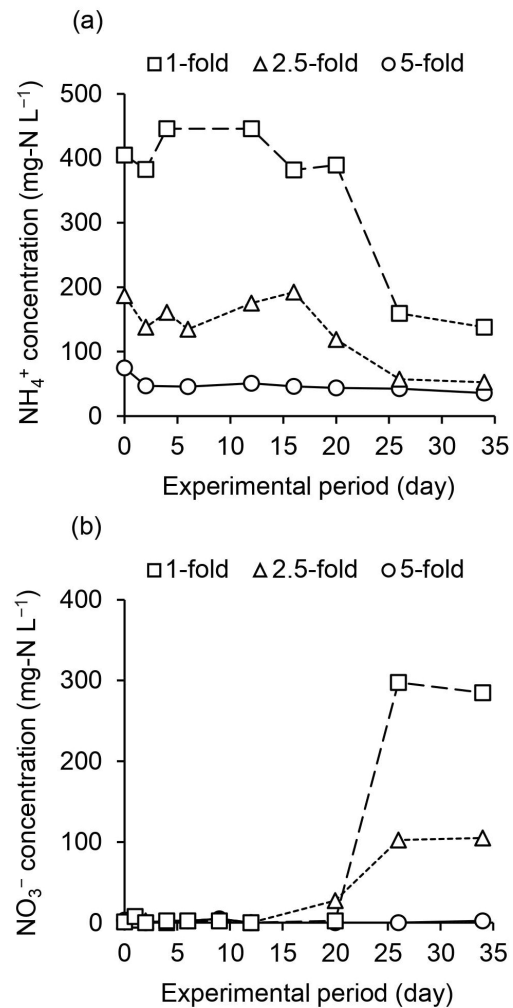


Figure 4. Variations of NH₄⁺ concentration (a) and NO₃⁻ concentration (b) for all conditions.

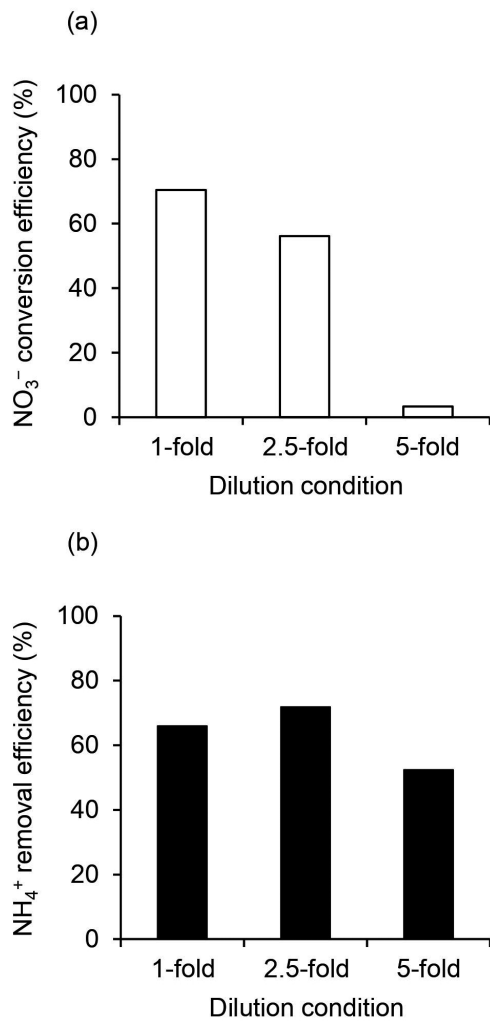


Figure 5. NH_4^+ to NO_3^- conversion efficiency (a) and NH_4^+ removal efficiency (b) at the end of the experiment for all conditions.

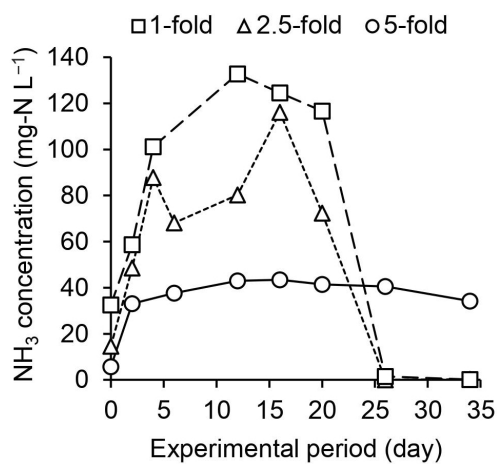


Figure 6. Variations of NH_3 concentration for all conditions.

3.3. 消化液中窒素処理への微細藻類-硝化細菌共存系の利用可能性

本研究を含めた、微細藻類-硝化細菌共存系を用いた消化液中の窒素処理に関する研究成果を Table 1 にまとめた。基質を処理開始時に単発的に投入し一定期間後の処理性能を評価する回分実験と、基質供給と処理水の引き抜きを連続的に行う連続実験の性能を単純に比較することは難しいため、回分実験の研究のみを示している。Wang et al. (2020) は、*Desmodesmus* sp. CHX1 と市販の硝化細菌剤を播種試料とし、養豚場廃水を原料としたメタン発酵消化液（初期 NH_4^+ 濃度: 374 mg-N L⁻¹）処理を行い、 NH_4^+ 除去率 41.8% を示した。Akizuki et al. (2019, 2021) は、主な微細藻類源として *Chlorella* sp. または *Nannochloropsis* sp. を用い、細菌源として下水処理場の好気性汚泥を用い、いずれも屠殺場廃水を原料としたメタン発酵消化液（初期 NH_4^+ 濃度: 102 ~ 950 mg-N L⁻¹）処理を行った。その結果、基質の希釈倍率により NH_4^+ 除去率は -2.9% ~ 80.4% と大きく変動することを示した。

Food/microorganism 比 (F/M 比) は、生物学的廃水・廃棄物処理における処理性能に影響を与える重要な指標であり、窒素含有廃水処理においても適切な F/M 比で処理を行う必要性が報告されている (He et al. 2009, Wu et al. 2013)。微細藻類-硝化細菌共存系による消化液処理における F/M 比と NH_4^+ 除去率の関係性を見たところ、いずれの実験でも F/M 比 0.07 ~ 0.52 mg-N mg-SS⁻¹ の範囲で 50% 以上の除去率を示し、0.95 mg-N mg-SS⁻¹ では高 NH_4^+ 濃度に起因する NH_3 阻害が生じ (Akizuki et al. 2021)、15% 以下の低い除去率を示した (Fig. 7)。従って、F/M 比 0.5 ~ 1.0 mg-N mg-SS⁻¹ の範囲で NH_4^+ 除去率が急激に低下する閾値が存在する可能性があり、安定的な NH_4^+ 除去には 0.5 mg-N mg-SS⁻¹ 以下に抑える必要があると考えられる。一方で、単一のデータではあるものの、本研究の F/M 比 0.07 mg-N mg-SS⁻¹ の条件 (5 倍希釈条件) で、他の低 F/M 比の結果と比較して NH_4^+ 除去率が低い値となった。これは、前述した光合成に伴う pH 上昇により硝化プロセスの進行

Table 1. Studies on the NH_4^+ treatment in anaerobic digestate using a consortium of microalgae and nitrifying bacteria.

Substrate for anaerobic digester	Inoculum		Initial NH_4^+ (mg-N L^{-1})	Initial biomass (mg-SS L^{-1})	F/M ratio (mg-N mg-SS $^{-1}$)	Light intensity		Light/dark cycle (h/h)	Temp. ($^{\circ}\text{C}$)	NH_4^+ removal (%)	References
	Microalgae	Nitrifying bacteria				($\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	(lux)				
Piggery wastewater	<i>Desmodesmus</i> sp. CHX1	Commercial bacterial reagents	374	n.d.	n.d.	-	8000	24/0	25	41.8	Wang et al. (2020)
Slaughterhouse wastewater	<i>Chlorella</i> sp., <i>Scenedesmus</i> sp., diatoms	Aerobic sludge from a full-scale sewage treatment plant	102	1000	0.102	140	-	12/12	25	80.4	Akizuki et al. (2019)
			102	1000	0.102	140	-	24/0	25	73.3	
Slaughterhouse wastewater	<i>Chlorella vulgaris</i>	Aerobic sludge from a full-scale sewage treatment plant	950	1000	0.95	-	3500	12/12	25	-2.9	Akizuki et al. (2021)*
			520	1000	0.52	-	3500	12/12	25	65.4	
			270	1000	0.27	-	3500	12/12	25	61.7	
Slaughterhouse wastewater	<i>Nannochloropsis</i> sp., <i>Scenedesmus</i> sp., <i>Chlorella</i> sp.	Aerobic sludge from a full-scale sewage treatment plant	950	1000	0.95	-	3500	12/12	25	12.8	Akizuki et al. (2021)*
			520	1000	0.52	-	3500	12/12	25	66.4	
			270	1000	0.27	-	3500	12/12	25	70.9	
Slaughterhouse wastewater	<i>Chlorella</i> sp.	Aerobic sludge from a full-scale sewage treatment plant	405	1000	0.41	-	10000	12/12	25	65.9	This study
			187	1000	0.19	-	10000	12/12	25	71.9	
			74.8	1000	0.07	-	10000	12/12	25	52.4	

*: Total ammonia nitrogen concentration instead of NH_4^+ concentration; n.d.: not described.

が抑制されたためと考えられ、低過ぎる F/M 比条件では、 NH_4^+ 除去率が低下する懸念がある。

高 F/M 比と低 F/M 比における共存系の阻害は、いずれも pH を中性付近に制御することで改善できると考えられる。つまり、pH 制御により、高 F/M 比では NH_3 による阻害の軽減が、低 F/M 比では高 pH 環境による阻害の軽減が期待できる。pH 制御には HCl 等の pH 調整剤の添加が有効であるが、薬剤添加コストがかかることが欠点である。本研究の DO 濃度の結果 (Fig. 1b) から、いずれの希釈条件においても、実験期間を通して微細藻類による O_2 供給が十分行われていたと考えられたため、例えば光強度を調整する (屋外光を利用する場合、遮光ネット等を使用する) ことで、微細藻類の光合成を抑制し pH 上昇を制御する手法が提案できる。他にも、微細藻類と硝化細菌の播種比率により、共存系内の pH が変化した報告 (Sepehri et al. 2020) があり、播種比率の調整によって pH 上昇を抑制できる可能性もある。一方で、微細藻類の働きを過度に抑制することは、共存系の利点である光合成由来の O_2 供給量の低下に

繋がるため、適切な条件設定が不可欠である。光強度や播種試料の添加割合を調整し、微細藻類と硝化細菌の各々の機能を意図的に制御することで処理の安定化・性能向上を狙う研究例は少なく、今後取り組むべき研究課題と考えられる。

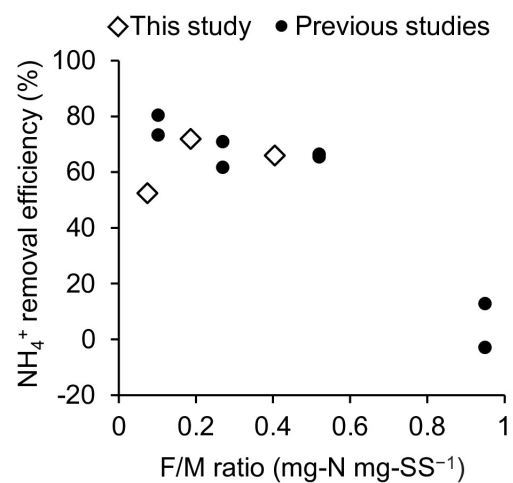


Figure 7. Effect of F/M ratio on NH_4^+ removal efficiency in a consortium of microalgae and nitrifying bacteria.

4. 結論

本研究では、従来の機械的曝気を行わず、光合成由来の O_2 供給により窒素除去を行う微細藻類-硝化細菌共存系を用いたメタン発酵消化液処理への有用性を評価するために、異なる倍率（1倍、2.5倍、5倍）で希釈した消化液の回分処理を実施した。いずれの希釈条件においても、微細藻類の光合成に伴う O_2 供給により、夜間の一部（午後22時～午前2時）を除き実験期間を通して硝化プロセスに適した DO 濃度（ 2.0 mg L^{-1} 以上）を維持した。一方で、光合成に伴う pH 上昇により、特に5倍希釈条件において硝化に不適な高 pH 環境（ 10.2 ± 0.3 ）となり、 NO_3^- の生成が見られなかった。1倍と2.5倍希釈条件では、実験20日目から硝化プロセスが進み、 NH_4^+ の NO_3^- 転換率はそれぞれ70.4%、56.2%に達した。1倍、2.5倍、5倍希釈条件における NH_4^+ 除去率は65.9%、71.9%、52.4%を示した。本研究を含めた既存の微細藻類-硝化細菌共存系を用いた消化液処理の成果を整理し、 NH_4^+ 濃度と播種試料 SS 濃度の比率（F/M 比）と NH_4^+ 除去率の関係性を見た結果、高 F/M 比（ $0.5 \sim 1.0 \text{ mg-N mg-SS}^{-1}$ 以上）だけではなく、低 F/M 比（ $0.07 \text{ mg-N mg-SS}^{-1}$ 、本研究の5倍希釈条件）でも処理性能が低下する可能性が示された。

5. 謝辞

本研究は、日本学術振興会 海外特別研究員制度（201860754）の支援を受けて実施された。実験で用いた好気性汚泥は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 energy-saving ammonia removal from anaerobic digestate of slaughterhouse wastewater. *J Water Process Eng* 31: 100753.
- Akizuki S, Cuevas-Rodríguez G, Toda T (2021) Effect of ammonia concentration on a microalgal-nitrifying bacterial photobioreactor treating anaerobic digester effluent. *Biochem Eng J* 173: 108057.
- American Public Health Association (1998) *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (20th ed), American Public Health Association, Washington, DC, 1220 pp.
- Anthonisen AC, Loehr RC, Prakasam TBS, Srinath EG (1976) Inhibition of nitrification by ammonia and nitrous acid. *J Water Pollut Control Fed* 48: 835–852.
- Antoniou P, Hamilton J, Koopman B, Jain R, Holloway B, Lyberatos G, Svoronos SA (1990) Effect of temperature and pH on the effective maximum specific growth rate of nitrifying bacteria. *Water Res* 24: 97–101.
- Casagli F, Rossi S, Steyer JP, Bernard O, Ficara E (2021) Balancing microalgae and nitrifiers for wastewater treatment: Can inorganic carbon limitation cause an environmental threat? *Environ Sci Technol* 55: 3940–3955.
- Drewnowski J, Remiszewska-Skwarek A, Duda S, Łągód G (2019) Aeration process in bioreactors as the main energy consumer in a wastewater treatment plant. Review of solutions and methods of process optimization. *Processes* 7: 311.
- Foresti E (2001) Perspectives on anaerobic treatment in developing countries. *Water Sci Technol* 44: 141–148.
- Gu Y, Li Y, Li X, Luo P, Wang H, Robinson ZP, Wang X, Wu J, Li F (2017) The feasibility and challenges of energy self-sufficient wastewater treatment plants. *Appl Energy* 204: 1463–1475.
- He SB, Xue G, Wang BZ (2009) Factors affecting simultaneous nitrification and de-nitrification (SND) and its kinetics model in membrane bioreactor. *J Hazard Mater* 168: 740–710.
- Hwang S, Jang K, Jang H, Song J, Bae W (2006) Factors

Akizuki S, Cuevas-Rodríguez G, Toda T (2019) Microalgal-nitrifying bacterial consortium for energy-saving ammonia removal from anaerobic digestate of slaughterhouse

- affecting nitrous oxide production: A comparison of biological nitrogen removal processes with partial and complete nitrification. *Biodegradation* 17: 19–29.
- 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.
- Koonaphapdeelert S, Aggarangsi P, Moran J (2020) “Introduction to Biomethane.” In: *Biomethane: Production and Applications* (eds Koonaphapdeelert S, Aggarangsi P, Moran J). Springer Publishing, Singapore, pp. 1–15.
- 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.
- Park S, Bae W, Chung J, Baek SC (2007) Empirical model of the pH dependence of the maximum specific nitrification rate. *Process Biochem* 42: 1671–1676.
- Ruiz G, Jeison D, Rubilar O, Ciudad G, Chamy R (2006) Nitrification–denitrification via nitrite accumulation for nitrogen removal from wastewaters. *Bioresour Technol* 97: 330–335.
- Sepehri A, Sarrafzadeh MH, 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.
- Sharma B, Ahlert RC (1977) Nitrification and nitrogen removal. *Water Res* 11: 897–925.
- Taziki M, Ahmadzadeh H, Murry-Ewers MA, Lyon S (2015) Nitrate and nitrite removal from wastewater using algae. *Curr Biotechnol* 4: 426–440.
- Uludag-Demirer S, Demirer G.N, Frear C, Chen S (2008) Anaerobic digestion of dairy manure with enhanced ammonia removal. *J Environ Manag* 86: 193–200.
- 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.
- Vergara C, Muñoz R, Campos J. L, Seeger M, Jeison D (2016) Influence of light intensity on bacterial nitrifying activity in algal-bacterial photobioreactors and its implications for microalgae-based wastewater treatment. *Int Biodeter Biodegr* 114: 116–121.
- Wang L, Min M, Li Y, Chen P, Chen Y, Liu Y, Wang Y, Ruan R (2009) Cultivation of green algae *Chlorella* sp. in different wastewaters from municipal wastewater treatment plant. *Appl Biochem and Biotechnol* 162: 1174–1186.
- Wang M, Yang H, Ergas SJ, van der Steen P (2015) A novel shortcut nitrogen removal process using an algal-bacterial consortium in a photo-sequencing batch reactor (PSBR). *Water Res* 87: 38–48.
- Wang M, Zhang SC, Tang Q, Shi LD, Tao XM, Tian GM (2020) Organic degrading bacteria and nitrifying bacteria stimulate the nutrient removal and biomass accumulation in microalgae-based system from piggery digestate. *Sci Total Environ* 707: 134442.
- Wellburn AR (1994) The spectral determination of Chlorophylls *a* and *b*, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *J Plant Physiol* 144: 307–313.
- Wiesmann U (1994) “Biological nitrogen removal from wastewater.” In: *Biotechnics/Wastewater* (ed Fiechter A). Springer Publishing, Berlin, Heidelberg, pp. 113–154.
- Wu J, Chen F, Huang X, Geng W, Wen X (2006) Using inorganic coagulants to control membrane fouling in a submerged membrane bioreactor. *Desalination* 197: 124–136.
- Wu YJ, Whang LM, Chang MY, Fukushima T, Lee YC, Cheng SS, Hsu SF, Chang CH, Shen W, Yang CY et al. (2013) Impact of food to microorganism (F/M) ratio and colloidal chemical oxygen demand on nitrification performance of a full-scale membrane bioreactor treating thin film transistor liquid crystal display wastewater. *Bioresour Technol* 141: 35–40.

海産カイアシ類 *Pseudodiaptomus nihonkaiensis* の培養における微細藻類餌料の検討

高山佳樹^{1,*}、古閑伸一^{2,3}、戸田龍樹²

1) 横浜国立大学大学院環境情報研究院 〒240-8501 神奈川県横浜市保土ヶ谷区常盤台 79-7

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) 現所属 三機工業株式会社 〒104-8506 東京都中央区明石町 8-1

Examination of dietary microalgae to culture marine copepod *Pseudodiaptomus nihonkaiensis*

Yoshiki Takayama^{1,*}, Shinichi Koga^{2,3}, Tatsuki Toda²

1) Graduate School of Environment and Information Science, Yokohama National University, 79-7, Tokiwadai, Hodogaya-ku, Yokohama, Kanagawa, 240-8501, Japan

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

3) Present address SANKI ENGINEERING CO., LTD., 9-1, Akashi-cho, Chuou-ku, Tokyo 104-8506, Japan

* Corresponding author: takayama-yoshiki-fb@ynu.ac.jp

2024年5月4日受付、2024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. Marine fish larvae fed with copepods show better survival and growth. Despite obvious advantages of copepods as the live feed, their use is still limited owing to low productivity and cost-efficiency when mass cultivated. Diet affects copepod egg production, survival and growth rates, hatching success, and population growth. One difficulty with the mass cultivation of copepods is, however, the varied dietary requirements of individual species. Species of the genus *Pseudodiaptomus*, egg-carrying copepods that occur widely, can dominate marine coastal waters, and are preyed upon by commercially significant marine fish. Consequently, some *Pseudodiaptomus* species are used as experimental live feed in marine aquaculture. *Pseudodiaptomus nihonkaiensis* Hirakawa is a dominant species during warm water seasons in Sagami Bay, Japan. Because of the potential suitability of *P. nihonkaiensis* as a prey source for larval fishes, the nauplii individuals were fed with three mono-microbial diets and one mixed-microbial diet as the control condition to determine which of them was the most favorable for the survival and reproduction of this copepod in culture.

The nauplii were incubated in 500 mL glass bottles under four diet conditions (mono-diet of *Chaetoceros gracilis*, *Rhodomonas salina*, and *Isochrysis galbana*, and a mixed diet of *C. gracilis* + *R. salina* + *I. galbana* at 1:1:1 carbon ratio) for 15 days. Survival rate and development stages of the copepods were measured during the incubation duration. At day 12 and 15, ovigerous rate and sac size were also measured.

There was no significant difference in ovigerous rate and egg sac size among four diet conditions. Survival rate from nauplii to adult stage was $10.0 \pm 11.1\%$, $35.3 \pm 20.4\%$, $46.7 \pm 6.1\%$, $29.3 \pm 4.2\%$ when fed with *C. gracilis*, *R. salina*, *I. galbana* and mixed diet, respectively. The malformation was observed in the copepodid individuals fed with *R. salina* and the mixed diet.

These results might suggest that *R. salina* has a nutritional problem for the growth in *P. nihonkaiensis*. The ratio of individuals developed until the adult stages was maximized under the mono-diet of *I. galbana*, so this mono-diet can be considered a favorable diet for *P. nihonkaiensis* cultivation in the present study.

Keywords: aquaculture; calanoid copepod; malformation; ovigerous rate; survival rate

1. はじめに

カイアシ類は多くの海産仔稚魚の主要な餌資源であり、その消化管内容物の80%を占めることが知られている (Tanaka et al. 1987, Mauchline 1998)。カイアシ類は多価不飽和脂肪酸を多く含有し、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考えられている (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行われ、カイアシ類を給餌した仔稚魚はワムシやアルテミア等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知られている (Shields et al. 1999, Barroso et al. 2013)。このような背景から天然域から採集されたカイアシ類が仔稚魚の餌料に使用されるが、採集する季節や海況によって収量や種組成が変動し、寄生生物や病原菌が魚類種苗生産へ混入するといった課題がある (荻原 2014)。そのため、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求められているが、ワムシ等の既存生物餌料の培養と比較した際にはその生産性は低く (Molejón & Alvarez-Lajonchère 2003)、未だ困難な技術とされている。カイアシ類の培養において、給餌する餌料はカイアシ類の卵生産速度、孵化率、生存率や成長速度に影響し、個体群の増加を決定づける (Camus & Zeng 2008, Pan et al. 2014)。対象とするカイアシ類種ごと、また発達段階毎に好適な餌料種が異なる例が示されており

(高山ら 2022, Takayama et al. 2023a, Takayama et al. 2023b)、生産性を最大化するため、対象とするカイアシ類種ごとに好適な餌料を検討する必要がある。

Pseudodiaptomus 属カイアシ類は沿岸域において見出される普通種であり、幼生及び幼体初期は浮遊性、以降成体までは半底生性と生活様式が発達に伴い変化し (Walter 1989)、半底生性である生活史後期では、日中は底上に生息し、夜間に浮上する日周鉛直移動を行うことが知られている (Hirakawa 1997)。自然環境では高個体密度のスウォームを形成することが報告されており (Blanda et al. 2015)、*P. nihonkaiensis* では九州北部の平戸島志々伎湾において、アマモ場の周囲に最大 $86.1 \text{ inds. L}^{-1}$ のスウォームが観察されている (Kimoto et al. 1988)。また、本属の *P. annandalei* は低酸素環境 (Blanda et al. 2015)、高温環境 (Doan et al. 2019) などの環境負荷への耐性を示し、*Tetraselmis chui* などの高度多価不飽和脂肪酸 (HUFA) に乏しい餌料藻類を給餌した場合でも、体内に HUFA を蓄積することが報告されている (Rayner et al. 2017)。*Pseudodiaptomus* 属は水産養殖における優れた生物餌料候補として、チャイロマルハタ *Epinephelus coioides* (Lee et al. 2010)、クロウミウマ *Hippocampus kuda* (Thuong & Hoang 2015) 等を対象に初期生物餌料として試験的に使用されている。*P. nihonkaiensis* は朝鮮半島南部、日本列島では新潟以南から琉球列島に分布し (Fig. 1)、本研究の実験で使用した個体を単離した相模湾真鶴港では高水温期に優

占する (Natori 2018)。本研究では、*P. nihonkaiensis* の培養における好適な餌料藻類を検討するため、異なる微細藻類種を給餌した際のノープリウス幼生の成体期までの生存率とメス成体による卵生産を明らかにした。

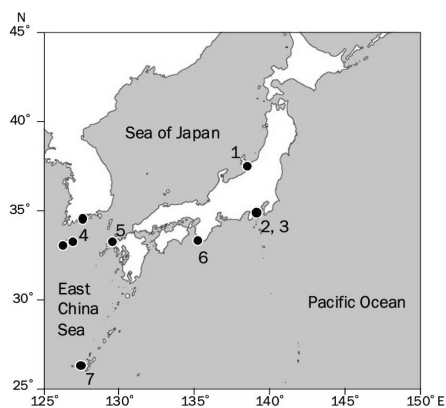


Figure 1. Reported localities for *Pseudodiaptomus nihonkaiensis*. (1) Hirakawa 1983, (2) Hira-hara 2018, (3) Natori 2018, (4) Soh et al. 2001, (5) Kimoto et al. 1988, (6) Shimode & Shirayama 2004, (7) Omori et al. 2015

2. 材料および方法

2.1. 微細藻類餌料

本研究では、水産養殖分野で一般的な餌料藻類として、クリプト藻 *Rhodomonas salina*、珪藻 *Chaetoceros gracilis*、ハプト藻 *Isochrysis galbana* の3種を用いた (Table 1)。全ての微細藻類は 50 mL の三角フラスコを用い回分培養した。培養に用いた器具はあらかじめオートクレーブ (121°C、20 分間) を使用し滅菌した。培養には相模湾真鶴半島沖 3 km に設けた定点 M (35° 09′ 45″ N, 139° 10′ 00″ E) にて採水した表層海水を数か月間保管後、塩分を 35 に調整し、孔径 0.22 μm のメンブレンフィルター (Merck Millipore) で濾過したものを基本海水とし、f/2 培地を作成し餌料藻類の培養に用いた。培養は水温 25°C、光強度 120 μmol m⁻² s⁻¹、明暗周期各 12 時間条件に設定したインキュベーター (FLI-301N, EYELA) 内で実施した。培地中の餌料藻類の細胞濃度は血球計算版を用い、生物顕微鏡下 (OPTIPHOT-2, Nikon) で計数した。

Table 1. Cell size of microalgae used in the present study. Cell size was referred from Takayama et al. (2022).

Microalgae	Cell size (μm)
<i>Chaetoceros gracilis</i>	5.9 ± 0.6
<i>Rhodomonas salina</i>	10.3 ± 2.7
<i>Isocrysis galbana</i>	4.5 ± 1.1
Mixed diet (<i>C. gracilis</i> + <i>R. salina</i> + <i>I. galbana</i>)	—

2.2. 動物プランクトン試料と培養海水の採集

動物プランクトン試料は相模湾の北西域に位置する真鶴港 (35° 09′ 49″ N, 139° 10′ 33″ E; 水深 6 m) で採集した。動物プランクトン試料は 2021 年 8 月の日没直後に、目合い 180 μm の動物プランクトンネット (口径 30 cm、長さ 100 cm) を海底付近から海面まで複数回傾斜曳きすることで得た。実験に使用した培養海水は、定点 M において表層海水をバケツで採水し、現場において目合い 180 μm のナイロンメッシュで大型の動植物プランクトンを取り除き、目合い 0.22 μm のメンブレンフィルターで濾過滅菌 (FSW < 0.22 μm) したものをを用いた。採集された動物プランクトン試料を直ちに実験室へ移送し、実体顕微鏡 (WILD M10, Leica Co., Ltd.) で *P. nihonkaiensis* のメス成体のみを、Hirakawa (1983) が報告した形態学的特徴を基に選別した。選別された個体は濾過滅菌海水で満たした容量 3 L のプラスチック容器内に移し、現場水温である水温 25°C、明暗周期 12 時間:12 時間の条件に設定したインキュベーター (Biotron, NK system) で馴致培養を 1 週間行った。馴致中は *R. salina*、*I. galbana*、*C. gracilis* を炭素比 1:1:1 で混合した餌料を 2.0 μg-C mL⁻¹ (Kjørboe et al. 1985) で給餌した。給餌の際には培地の混入による水質悪化を防ぐため、3000 rpm で 5 分間の遠心分離を行い、上澄みを取り除いた。馴致培養期間中に生産されたノープリウス幼生を実体顕微鏡下で選別し、以下に示した培養実験に供した。

2.3. *Pseudodiaptomus nihonkaiensis* の好適餌料の検討

選別された *P. nihonkaiensis* のノープリウス幼生 50 個

体を塩分 36 の濾過滅菌海水 ($< 0.22 \mu\text{m}$) で満たした容量 500 mL のマヨネーズ瓶内に気泡が入らないように収容し、水温 25°C 、明暗周期 12 時間に設定したインキュベーター (Biotron, NK system) 内で 15 日間培養した。培養期間中は餌料藻類の沈降を防ぐため、5 rpm に設定した回転式シェーカー (IKA Roller 10 digital) 上で攪拌した。餌料条件は実験区として *R. salina* 単一餌料区、*I. galbana* 単一餌料区、*C. gracilis* 単一餌料区の 3 条件、対象区として上述 3 種の微細藻類を炭素比 1:1:1 で混合した混合餌料区の合計 4 条件とした。培養実験は各条件 3 連で行い、各餌料を $2.0 \mu\text{g-C mL}^{-1}$ の濃度で毎日給餌した。また、培養海水の水質悪化を防ぐため、2 日おきに培養海水の 50% を新たな濾過海水に交換した。3 日に 1 回の頻度で各容器内の個体をシャーレに集め、実体顕微鏡下でノープリウス幼生、コペポダイト幼体、オス成体、メス成体に分けて計数することで、カイアシ類の個体数と発達段階を求めた。

ノープリウス期における生存率 (%) は以下の (1) 式で算出した。

$$\text{Nauplius stage survival} = \frac{C \text{ ind}}{N \text{ ind}} \times 100 \quad (1)$$

$N \text{ ind}$ は実験に使用したノープリウス幼生の初期個体数 (ind.) を、 $C \text{ ind}$ はコペポダイト1期まで発達した個体数 (ind.) を示す。コペポダイト期における生存率 (%) は以下の (2) 式で算出した。

$$\text{Copepodid stage survival} = \frac{A \text{ ind}}{C \text{ ind}} \times 100 \quad (2)$$

$A \text{ ind}$ は成体 (コペポダイト 6 期) まで発達した個体数 (ind.) を示す。ノープリウスから成体までの生存率 (%) は以下の (3) 式で算出した。

$$\text{Nauplius to adult survival} = \frac{A \text{ ind}}{N \text{ ind}} \times 100 \quad (3)$$

容器内にメス成体が出現した培養 12 日目、15 日目には卵嚢を有するメスの個体数を計数することで、メス成体に占める携卵メスの割合である携卵率 (%) を求めた。また、ひとつの卵嚢内の卵数を計数することで卵嚢サイズ (eggs sac^{-1}) を求めた。

3. 結果

3.1. 生存率

培養 3 日目にすべての給餌区においてコペポダイト幼体が出現し、成体の出現は培養 6 日目に混合餌料区において、9 日目にすべての給餌区において確認された (Fig. 2)。 *Chaetoceros gracilis* 給餌区では培養開始から培養 6 日目にかけて生残率が $82.0 \pm 20.1\%$ 減少したのに対し、*Rhodomonas salina* 給餌区では $45.3 \pm 16.8\%$ 、*Isocrysis galbana* 給餌区では $27.3 \pm 5.2\%$ 、混合餌料区では $42.0 \pm 23.7\%$ 減少した。

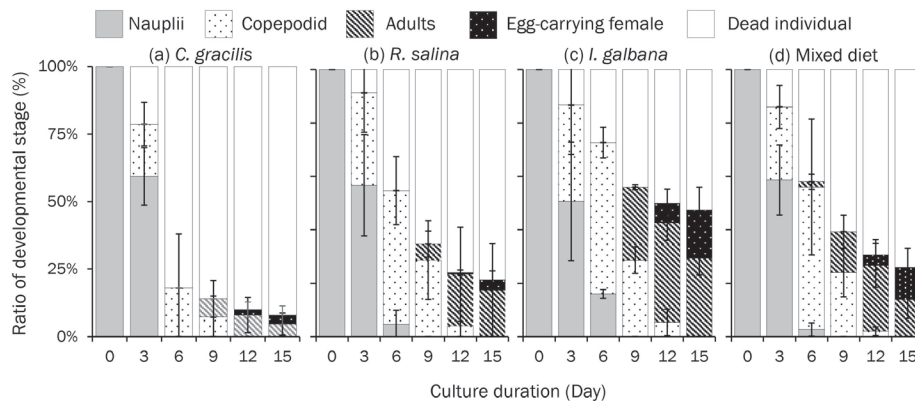


Figure 2. Temporal variations in the ratio of developmental stage of *Pseudodiaptomus nihonkaiensis* fed with (a) *Chaetoceros gracilis*, (b) *Rhodomonas salina*, (c) *Isocrysis galbana*, and (d) mixed diet (*C. gracilis* + *R. salina* + *I. galbana*). Colors of bar graphs show development stage of the copepods. Error bars show the standard deviations ($n=3$).

ノープリウス幼生期の生残率は *C. gracilis* 餌料区で $26.6 \pm 19.0\%$ 、*R. salina* 餌料区で $50.0 \pm 15.6\%$ 、*I. galbana* 餌料区で $58.0 \pm 7.2\%$ 、混合餌料区で $56.0 \pm 27.4\%$ を示したが (Fig. 3a)、餌料区間で統計的な有意差は認められなかった。コペポダ幼生期の生残率は *C. gracilis* 餌料区で $26.1 \pm 24.2\%$ 、*R. salina* 餌料区で $43.4 \pm 40.1\%$ 、*I. galbana* 餌料区で $81.6 \pm 7.6\%$ 、混合餌料区で $58.9 \pm 21.0\%$ を示したが (Fig. 3b)、餌料区間で統計的な有意差は認められなかった (One-way

ANOVA, $p > 0.05$)。ノープリウス幼生から成体までの生残率は *C. gracilis* 餌料区で $10.0 \pm 11.1\%$ 、*R. salina* 餌料区で $35.3 \pm 20.4\%$ 、*I. galbana* 餌料区で $46.7 \pm 6.1\%$ 、混合餌料区で $29.3 \pm 4.2\%$ であり (Fig. 3c)、*I. galbana* 餌料区は *C. gracilis* 餌料区に比べ、有意に高い生残率を示した (One-way ANOVA, Tukey-Kramer, $p < 0.05$)。

R. salina 給餌区と混合餌料区において、尾肢部の欠損 (Fig. 4b)、第一触覚の歪曲や折れ (Fig. 4c)、脱皮殻の癒着といった形態異常が観察された (Fig. 4d)。

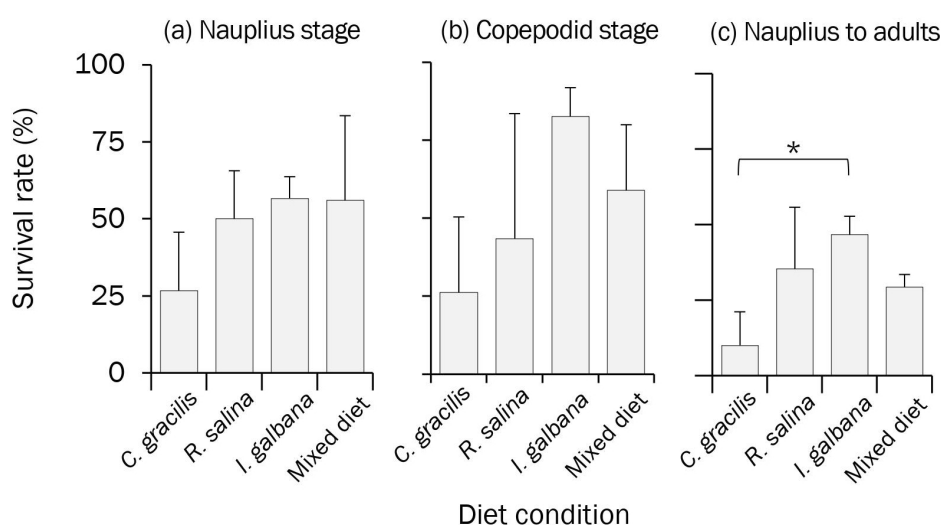


Figure 3. The comparison of survival rate until nauplius to copepodite, copepodite to adult and nauplius to adult of *Pseudodiaptomus nihonkaiensis* reared different conditions of algal diets. Error bars indicate standard deviations ($n = 3$). An asterisk on the top of bars indicates significantly difference (One-way ANOVA, Tukey-Kramer, $p < 0.05$).

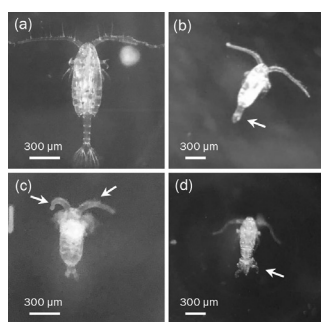


Figure 4. Images of observed malformation in *Pseudodiaptomus nihonkaiensis* fed by mono-diet condition of *Rhodomonas salina* and Mixed diet. (a) adult male without deformity, (b) adult without caudal ramus, (c) copepodite with shrunken first antennae, and (d) copepodite with shells attached due to failure to molt.

3.2. 卵生産

異なる餌料藻類を用いたノープリウス幼生の培養実験を15日間実施したところ、培養12日目に携卵メス成体の出現がすべての給餌区で確認され、携卵率は培養12日目の *C. gracilis* 給餌区で $10.7 \pm 18.6\%$ 、*R. salina* 給餌区で $8.3 \pm 14.4\%$ 、*I. galbana* 給餌区で $18.9 \pm 19.8\%$ 、混合餌料区で $25.0 \pm 43.3\%$ であり (Fig. 5a)、培養15日目では *C. gracilis* 給餌区で $29.2 \pm 29.8\%$ 、*R. salina* 給餌区で $22.5 \pm 27.2\%$ 、*I. galbana* 給餌区で $43.3 \pm 32.2\%$ 、混合餌料区で $50.3 \pm 45.0\%$ であった (Fig. 5b)。両日ともに給餌区間で統計的な有意差は認められなかった (One-way ANOVA, $p > 0.05$)。

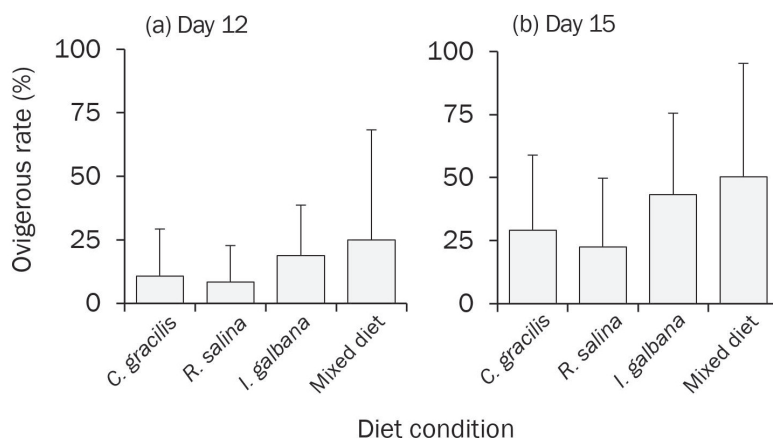


Figure 5. The comparison of ovigerous rate of *Pseudodiaptomus nihonkaiensis* adult female reared under different conditions of algal diets (a) on day 12 and (b) day 15. Error bars indicate standard deviations ($n = 3$). A significantly difference was not detected among diet conditions (One-way ANOVA, $p > 0.05$).

卵嚢サイズは *C. gracilis* 給餌区で 13.0 ± 3.8 eggs sac^{-1} 、*R. salina* 給餌区で 10.3 ± 6.3 eggs sac^{-1} 、*I. galbana* 給餌区で 11.0 ± 3.3 eggs sac^{-1} 、混合餌料区では 15.9 ± 3.9 eggs sac^{-1} であったが、給餌区間で統計的な有意差は認められなかった (Fig 6) (One-way ANOVA, $p > 0.05$)。

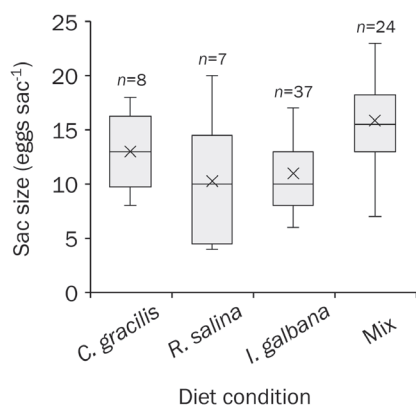


Figure 6. The comparison of average of the sac size of *Pseudodiaptomus nihonkaiensis* reared under different conditions of algal diets. Error bars indicate standard deviations. Horizontal lines and cross marks in the box plots show average value and median, respectively. A significantly difference was not detected among diet conditions (One-way ANOVA, $p > 0.05$).

4. 考察

幼生・幼体期の生存率の改善はカイアシ類の大量培養におけるボトルネックのひとつである。本研究と同様の餌料藻類種を用い、*Acartia steueri*を対象とした先行研究におけるノープリウス幼生から成体までの生存率は、単一餌料区で最大 10.5%、混合餌料区で 20.4%と報告されている (高山ら 2022)。本研究では、異なる4つの餌料条件で *P. nihonkaiensis* のノープリウス幼生の培養を行った好適餌料の検討を行った結果、ノープリウス幼生から成体までの生存率は *Isochrysis galbana* 餌料区において 46.7%と最も高い値を示した。*I. galbana* はドコサヘキサエン酸 (DHA) を豊富に含有することが知られ、*A. tonsa*、*A. sinjiensis*、*Gladioferens imparipes*、*Parvocalanus crassirostris* のノープリウス幼生期から成体までの発達、生存を促す好適餌料とされている (Drillet et al. 2011)。これらのカイアシ類種と同様に、*P. nihonkaiensis* のノープリウス幼生から成体までの発達における好適餌料は *I. galbana* と示唆された。

Rhodomonas salina は多くのカイアシ類種の好適餌料藻類として用いられているが (高山 2023)、本研究の *P. nihonkaiensis* では、*R. salina* を単一で給餌した条件、他2種の藻類と混合した条件でのみ奇形個体

が出現した。*Acartia sinjiensis*、*A. steueri* では必須脂肪酸含量の低い緑藻 *Tetraselmis suecica* を単一で給餌した際に遊泳脚や第一触覚の捻れ、眼の欠如といった奇形が発生するが、他の微細藻類を混合することで奇形が改善されることから必須脂肪酸といった特定の栄養素の不足から形態異常が引き起こされると推測されている (Knuckey et al. 2005, 高山ら 2022)。本研究では、*R. salina* に他の微細藻類 2 種を混合した条件においても奇形個体が出現したことから、特定の栄養素の不足ではなく、*R. salina* が奇形を引き起こす何らかの物質を有するのかもしれない。この仮説の検証のためには、再現性の確認や、摂餌速度の測定、化学組成を調査する必要がある。

本研究における *P. nihonkaiensis* の携卵率と卵嚢サイズは、いずれの餌料区においても同程度の値が示されたことから、本種は幅広い種類の餌料を利用し卵生産を行えると考えられた。今後は本研究で検証できなかった、各餌料が孵化率に与える影響を検証する必要がある。

謝辞

本研究の一部は JSPS 科研費 < JP19H03035, 21K14902 > による助成を受け実施された。試料採集にあたって横浜国立大学臨海環境センターの皆様にご協力いただいた。厚く御礼申し上げます。

引用文献

- 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.
- Blanda E, Drillet G, Huang C, Hwang JS, Jakobsen H, Rayner TA, Su HM, Wu CH, Hansen BW (2015) Trophic interactions and productivity of copepods as live feed from tropical Taiwanese outdoor aquaculture ponds. *Aquaculture*, 445: 11–21.
- Camus T, Zeng C (2008) Effects of photoperiod on egg production and hatching success, naupliar and copepodite development, adult sex ratio and life expectancy of the tropical calanoid copepod *Acartia sinjiensis*. *Aquaculture* 280: 220–226.
- Doan NX, Vu MTT, Pham HQ, Wisz MS, Nielsen TG, Dinh KV (2019) Extreme temperature impairs growth and productivity in a common tropical marine copepod. *Sci Rep* 9: 4550.
- 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.
- 萩原篤志 (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.
- Hirahara M (2018) Energy accumulation and starvation tolerance of the embayment copepod *Acartia steueri* Smirnov (Calanoida: Acartiidae). Ph.D. thesis, Soka University.
- Hirakawa K (1983) A new species of *Pseudodiaptomus* (Copepoda: Calanoida) from the coast of Niigata, the Japan Sea. *Bull Plankton Soc Jap* 30: 65–69.
- Hirakawa K (1997) Family Pseudodiaptomidae. In M Chihara & M Murano (Eds.), *An illustrated guide to marine plankton in Japan*. Tokai University Press, Tokyo, Japan, pp. 893–897.
- Kimoto K, Nakashima J, Morioka Y (1988) Direct observations of copepod swarm in a small inlet of Kyushu, Japan. *Bull Seikai Regio Fisher Res Lab* 66: 41–58.
- Kiørboe T, Møhlenberg F, Hamburger K (1985) Bioenergetics of the planktonic copepod *Acartia tonsa*: relation between feeding, egg production and respiration, and composition of specific dynamic action. *Mar Ecol Prog Ser* 26: 35–97.
- Knuckey RM, Semmens GL, Mayer RJ, Rimmer MA (2005) Development of an optimal microalgal diet for

- the culture of the calanoid copepod *Acartia sinjiensis*: effect of algal species and feed concentration on copepod development. *Aquaculture* 249: 339–351.
- Lee CH, Dahms HU, Cheng SH, Souissi S, Schmitt FG, Kumar R, Hwang JS (2010) Predation of *Pseudodiaptomus annandalei* (Copepoda: Calanoida) by the grouper fish fry *Epinephelus coioides* under different hydrodynamic conditions. *J Exp Mar Biol Eco* 393(12): 17–22.
- 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. PhD thesis, Soka University, Japan
- Omori M, Cha SJ, Isokawa H (2015) Species composition, abundance and seasonal variation of planktonic copepods at coral reefs of Akajima Island, Okinawa, Japan. *Bull Plankton Soc Jap* 62(2): 98–109.
- Pan YJ, Souissi S, Souissi A, Wu CH, Cheng SH, Hwang JS (2014) Dietary effects on egg production, egg-hatching rate and female life span of the tropical calanoid copepod *Acartia bilobata*. *Aquac Res* 45: 1659–1671.
- Rayner TA, Huwang JS, Hansen BW (2017) Minimizing the use of fish oil enrichment in live feed by use of a self-enriching calanoid copepod *Pseudodiaptomus annandalei*. *J Plankton Res* 39(6): 1004–1011.
- Shields RJ, Bell JG, Luizi 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.
- Shimode S, Shirayama Y (2004) Diel changes in vertical distribution of copepods community in Tanabe Bay, Japan. *J Mar Biol Assoc UK*, 84: 607–615.
- Soh HY, Suh HL, Yu OH, Ohtsuka S (2001) The first record of two demersal calanoid copepods, *Pseudodiaptomus poplesia* and *P. nihonkaiensis* in Korea, with remarks on morphology of the genital area. *Hydrobiologia* 448: 203–215.
- 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.
- Takayama Y, Yamasaki T, Toda T (2023a) Evaluation of microalgal diet to culture adult *Oithona oculata* Farran (Copepoda, Cyclopoida). *Aquac Res* 2023: 2089803.
- Takayama Y, Yusoff FMD, Toda T (2023b) Evaluation of dietary microalgae in the culture of *Acartia steueri* (Copepoda, Calanoida). *J Sustain Sci Manag* 18: 186–198.
- 高山佳樹, 平原南萌, 戸田龍樹 (2022) 浮遊性カイアシ類 *Acartia steueri* の幼生・幼体の培養における微細藻類餌料の検討. *プランクトン工学研究* 2: 32–43.
- 高山佳樹 (2023) 海産浮遊性カイアシ類の大量培養. *プランクトン工学研究* 3: 1–19.
- Tanaka M, Ueda H, Azeta M (1987) Near-bottom copepod aggregations around the nursery ground of the juvenile red sea bream in Shijiki Bay. *Bull Japan Soc Sci Fish* 53: 1537–1544.
- Thuong TD, Hoang T (2015) Rearing the spotted seahorse *Hippocampus kuda* by feeding live and frozen copepods collected from shrimp ponds. *Aquac Res* 46(6): 1356–1362.
- Walter CT (1989) Review of the New World Species of *Pseudodiaptomus* (Copepoda: Calanoida), with a Key to the Species. *Bull Mar Sci* 45 (3): 590–628.

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10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, Davey MP, Smith A et al. (2020) Bionic 3D printed corals. Nat Commun 11: 1748. (著者が10名を越える場合)
- 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.
- Bazargan A (ed) (2022) Photocatalytic Water and Wastewater Treatment. IWA Publishing, London, 220 pp.

単行本の章

- 佐々木健 (1993) “光合成細菌の生理と生態.” 嫌気性微生物 (上木勝司・永井史郎編著). 養賢堂, 東京, pp. 145–166.
- Khalifa O, Banat F, Hasan SW (2021) “Integrated and hybrid processes for oily wastewater treatment.” Integrated and Hybrid Process Technology for Water and Wastewater Treatment (eds Mohammad AW, Ang WL). Elsevier Publishing, Amsterdam, pp. 313–337.

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)

2024年6月21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 美光印刷 (株)
〒198-0024 東京都青梅市新町9丁目 2183 番地 5
Tel: 0428-30-5433

第4号（2024年6月）目次

◆ 総説

有機質廃棄物のコンポスト化における微生物接種の効果 中崎清彦	1
-----------------------------------	---

◆ 原著論文

Isolation of lipid-rich marine diatoms from the coastal waters of the Goto Islands, Japan Mari Yasuda, Minamo Hirahara, Masatoshi Kishi, Tatsuki Toda, Shuichi Yamamoto, Ken Furuya	17
--	----

メカノケミカル法による $\text{Sr}_4\text{Nb}_2\text{O}_9\cdot\text{N}$ の調製と光触媒能評価 西健斗、廣川心、松山達、井田旬一	24
--	----

微細藻類-硝化細菌共存系によるメタン発酵消化液中窒素の省エネルギー処理 秋月真一、ヘルマン クエバス-ロドリゲス	32
---	----

海産カイアシ類 <i>Pseudodiaptomus nihonkaiensis</i> の培養における微細藻類餌料の検討 高山佳樹、古閑伸一、戸田龍樹	42
---	----