

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

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

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

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

Shin-ichi Akizuki<sup>1,\*</sup>, Germán Cuevas-Rodríguez<sup>2</sup>

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](mailto: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 ( $\text{NH}_4^+$ ) 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  $\text{NH}_4^+$ -containing wastewater. In this consortium, nitrifying bacteria can proceed with nitrification reaction using oxygen ( $\text{O}_2$ ) 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  $\text{NH}_4^+$ -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  $\text{NH}_4^+$  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  $\text{O}_2$  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 ( $10.2 \pm 0.3$ ) unsuitable for nitrification, especially under the 5-fold dilution condition, and less  $\text{NO}_3^-$

was produced. In the 1-fold and 2.5-fold dilution conditions, nitrification proceeded from day 20 of the experiment, with  $\text{NH}_4^+$  to  $\text{NO}_3^-$  conversion efficiencies of 70.4% and 56%, respectively. The  $\text{NH}_4^+$  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  $\text{NH}_4^+$  concentration to inoculum SS concentration (Food/microorganism ratio: F/M ratio) and  $\text{NH}_4^+$  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<sup>-1</sup> or higher) but also at low F/M ratios (0.07 mg-N mg-SS<sup>-1</sup>, 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  $\text{O}_2$  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 ( $\text{NH}_4^+$ ) 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  $\text{NH}_4^+$  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  $\text{NH}_4^+$  を硝酸 ( $\text{NO}_3^-$ ) 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  $\text{NO}_3^-$  を窒素ガスまで還元し除去する。硝化細菌が  $\text{NH}_4^+$  から  $\text{NO}_3^-$  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 ( $\text{O}_2$ ) を必要とし (Sharma & Ahlert 1997)、通常、散気装置を用いた機械的曝気が不可欠である (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% もの割合を占める (Drewnowski et al. 2019)。そのため、硝化プロセスに依存する従来の  $\text{NH}_4^+$  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、 $\text{NH}_4^+$  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  $\text{O}_2$  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  $\text{O}_2$  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  $\text{NH}_4^+$  や  $\text{NO}_3^-$  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  $\text{NH}_4^+$  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  $\text{NH}_4^+$  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  $\text{NH}_4^+$  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  $\text{NH}_4^+$  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 ( $\text{NH}_3$ ) 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  $\text{NH}_4^+$  濃度 ( $520 \text{ mg-N L}^{-1}$ ) 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  $\text{NH}_4^+$  除去率は

61.7% に達し、共存系による高  $\text{NH}_4^+$  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  $\text{NH}_4^+$  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  $4^\circ\text{C}$  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、 $\text{NH}_4^+$  濃度、 $\text{NO}_3^-$  濃度、および  $\text{PO}_4^{3-}$  濃度は、それぞれ  $8.19$ 、 $406 \text{ mg-C L}^{-1}$ 、 $436 \text{ mg-N L}^{-1}$ 、 $1.11 \text{ mg-N L}^{-1}$ 、および  $19.9 \text{ mg-P L}^{-1}$  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  $3000 \text{ rpm}$  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  $500 \text{ mL}$  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  $0.5 \text{ g}$ -懸濁態固形物質 (Suspended solid: SS)  $\text{L}^{-1}$  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 O<sub>2</sub> 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、NH<sub>4</sub><sup>+</sup> 濃度、NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 濃度、および PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> 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、NH<sub>4</sub><sup>+</sup> 濃度と NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 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、NH<sub>4</sub><sup>+</sup> 濃度、NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 濃度、および PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> 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)。

NH<sub>4</sub><sup>+</sup> 除去率と NH<sub>4</sub><sup>+</sup> の NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 転換率は、以下の式 (1、2) により算出した。

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

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

ここで、NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N<sub>day 0</sub> は実験開始時の初期 NH<sub>4</sub><sup>+</sup> 濃度を示し、NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N<sub>day x</sub> と NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N<sub>day x</sub> は、それぞれ任意の実験日数経過後の NH<sub>4</sub><sup>+</sup> 濃度および NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 濃度を表している。

NH<sub>3</sub> 濃度は、以下の式 (3) により算出した (Anthonisen et al. 1976)。

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

ここで、NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N、pH、T は、それぞれ反応槽内の NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-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 NH<sub>4</sub><sup>+</sup> 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 O<sub>2</sub> 生成と NH<sub>4</sub><sup>+</sup> 酸化による O<sub>2</sub> 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<sup>-1</sup> 以上の DO 値を示し、硝化細菌が NH<sub>4</sub><sup>+</sup> を NO<sub>3</sub><sup>-</sup> まで完全酸化するために必要な DO 濃度 (1.0 ～ 2.0 mg L<sup>-1</sup>)



(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  $2.0 \text{ mg L}^{-1}$  以下まで低下し、硝化細菌への  $\text{O}_2$  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  $\text{O}_2$  供給は十分行われていたと推察された。

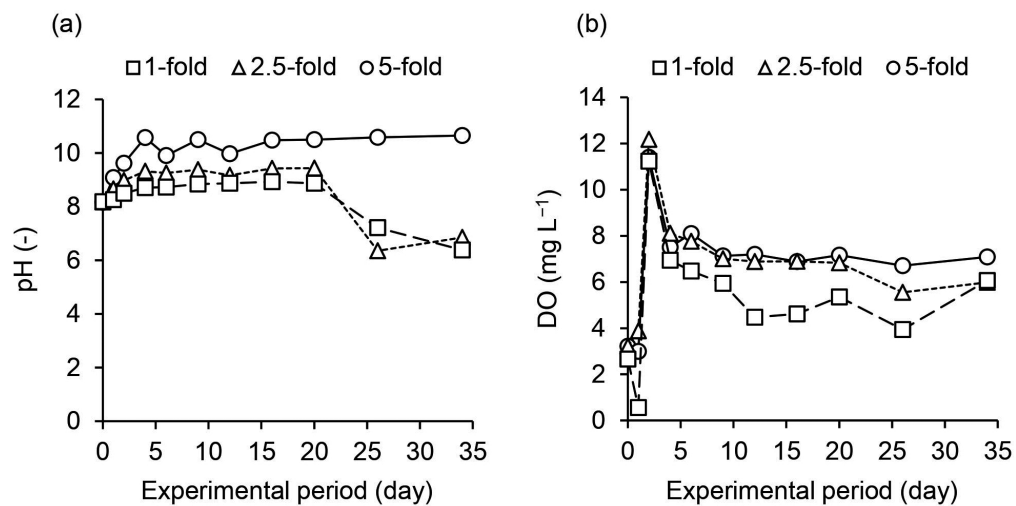


Figure 1. Variations of pH (a) and DO concentration (b) for all conditions.

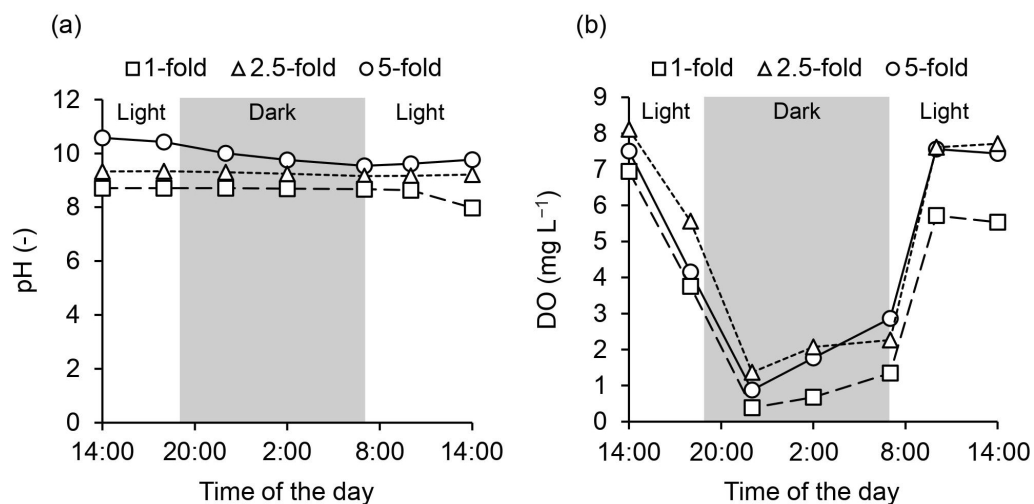


Figure 2. Variations of pH (a) and DO concentration (b) from day 4 to day 5 for all conditions.

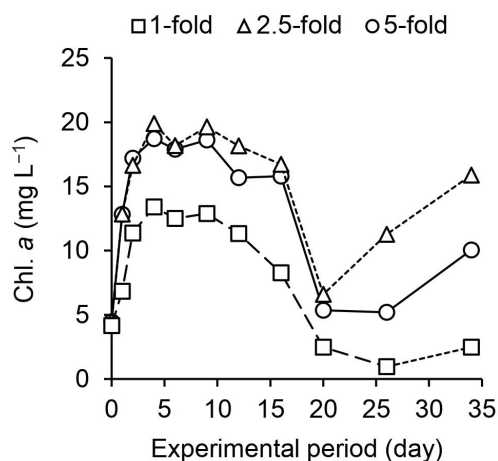


Figure 3. Variations of Chl. *a* concentration for all conditions.

### 3.2. $\text{NH}_4^+$ 処理性能評価

窒素化合物 ( $\text{NH}_4^+$  と  $\text{NO}_3^-$ ) 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  $\text{NH}_4^+$  濃度が大きく減少し、20 日目以降に  $\text{NO}_3^-$  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  $\text{NH}_4^+$  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  $\text{NO}_3^-$  生成は確認されなかった。実験終了時の投入  $\text{NH}_4^+$  の  $\text{NO}_3^-$  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  $\text{NH}_4^+$  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  $\text{NH}_3$  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、 $\text{NH}_3$  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  $\text{NH}_4^+$  濃度が高い 1 倍と 2.5 倍条件で高い  $\text{NH}_3$  濃度を示していた (Fig. 6)。従って、5 倍希釈条件では、 $\text{NH}_3$  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、 $\text{NH}_3$  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  $\text{CO}_2$  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。

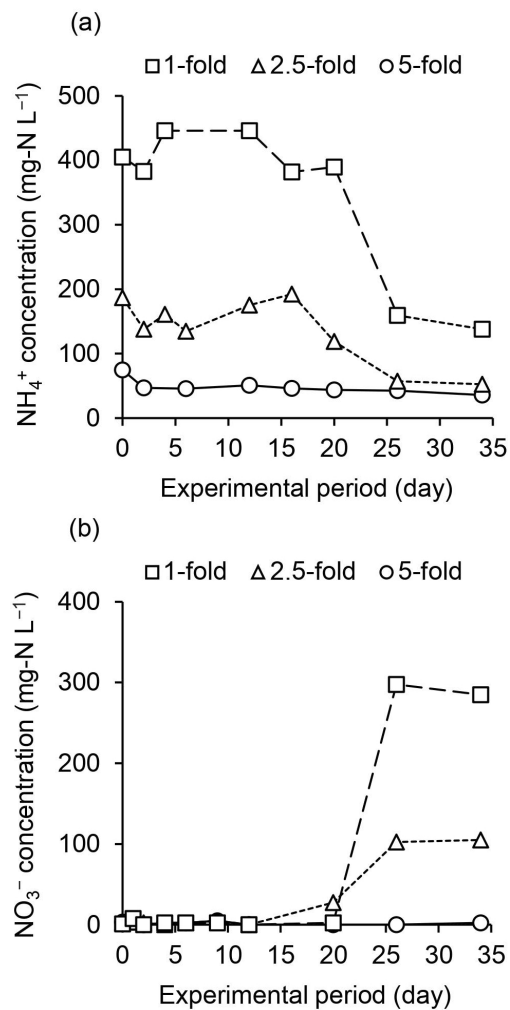


Figure 4. Variations of  $\text{NH}_4^+$  concentration (a) and  $\text{NO}_3^-$  concentration (b) for all conditions.

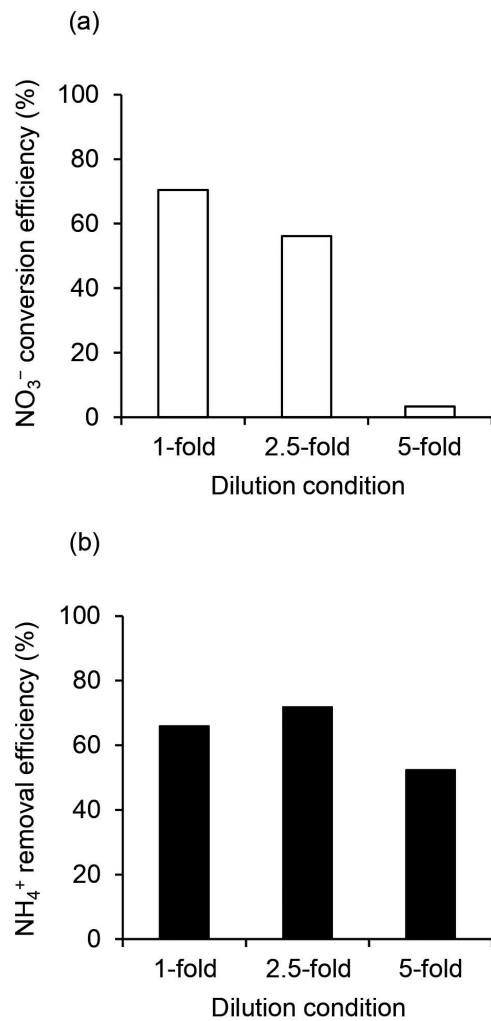


Figure 5.  $\text{NH}_4^+$  to  $\text{NO}_3^-$  conversion efficiency (a) and  $\text{NH}_4^+$  removal efficiency (b) at the end of the experiment for all conditions.

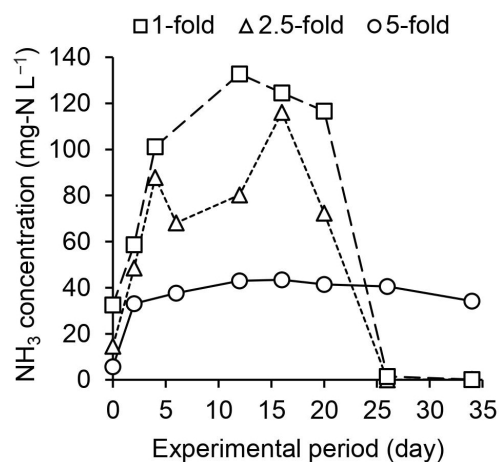


Figure 6. Variations of  $\text{NH}_3$  concentration for all conditions.

### 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  $\text{NH}_4^+$  濃度:  $374 \text{ mg-N L}^{-1}$ ）処理を行い、 $\text{NH}_4^+$  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  $\text{NH}_4^+$  濃度:  $102 \sim 950 \text{ mg-N L}^{-1}$ ）処理を行った。その結果、基質の希釈倍率により  $\text{NH}_4^+$  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  $\text{NH}_4^+$  除去率の関係性を見たところ、いずれの実験でも F/M 比  $0.07 \sim 0.52 \text{ mg-N mg-SS}^{-1}$  の範囲で 50% 以上の除去率を示し、 $0.95 \text{ mg-N mg-SS}^{-1}$  では高  $\text{NH}_4^+$  濃度に起因する  $\text{NH}_3$  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  $0.5 \sim 1.0 \text{ mg-N mg-SS}^{-1}$  の範囲で  $\text{NH}_4^+$  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  $\text{NH}_4^+$  除去には  $0.5 \text{ mg-N mg-SS}^{-1}$  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  $0.07 \text{ mg-N mg-SS}^{-1}$  の条件（5 倍希釈条件）で、他の低 F/M 比の結果と比較して  $\text{NH}_4^+$  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  $\text{NH}_4^+$  treatment in anaerobic digestate using a consortium of microalgae and nitrifying bacteria.

Substrate for anaerobic digester	Inoculum		Initial $\text{NH}_4^+$ (mg-N $\text{L}^{-1}$ )	Initial biomass (mg-SS $\text{L}^{-1}$ )	F/M ratio (mg-N mg-SS $^{-1}$ )	Light intensity		Light/dark cycle (h/h)	Temp. (°C)	$\text{NH}_4^+$ 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)
Slaughter-house 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	
Slaughter-house 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	
			950	1000	0.95	-	3500	12/12	25	12.8	
Slaughter-house wastewater	<i>Nannochloropsis</i> sp., <i>Scenedesmus</i> sp., <i>Chlorella</i> sp.	Aerobic sludge from a full-scale sewage treatment plant	520	1000	0.52	-	3500	12/12	25	66.4	
			270	1000	0.27	-	3500	12/12	25	70.9	
Slaughter-house 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  $\text{NH}_4^+$  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、 $\text{NH}_4^+$  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  $\text{NH}_3$  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  $\text{O}_2$  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  $\text{O}_2$  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。

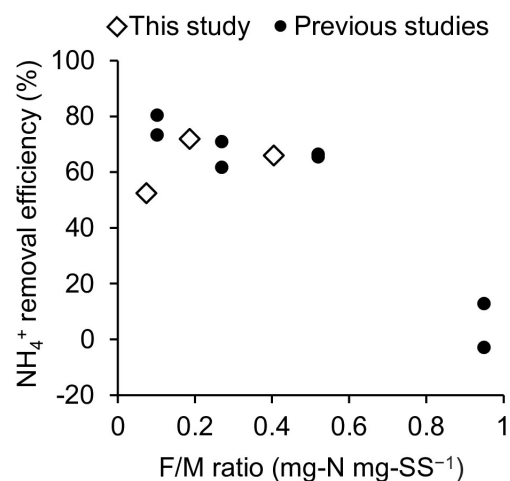


Figure 7. Effect of F/M ratio on  $\text{NH}_4^+$  removal efficiency in a consortium of microalgae and nitrifying bacteria.



#### 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（ $2.0 \text{ mg L}^{-1}$  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（ $10.2 \pm 0.3$ ）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 (20<sup>th</sup> 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

- 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.