

窒素除去に向けたコアシェル型微細藻類 - 硝化菌共存系カプセルの開発

西健斗¹、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

Development of a core-shell capsule with microalgae-nitrifying bacteria consortium for nitrogen removal

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

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

* Corresponding author: ida@soka.ac.jp

2025年5月15日受付, 2025年6月4日受理

Abstract Conventional biological nitrogen removal processes from nitrogen-rich wastewaters, such as those derived from livestock operations or semiconductor manufacturing, are energy-intensive due to the requirement for mechanical aeration during the nitrification process. In recent years, microalgae and nitrifying bacteria consortia have been explored as a sustainable alternative to supply oxygen by microalgae via photosynthesis, thus potentially eliminating the need for mechanical aeration. Among various approaches, photogranules have gained increasing attention for their high treatment efficiency. However, natural photogranule formation requires a prolonged incubation periods ranging from several weeks to months, limiting their practical application. To address this limitation, we developed a photogranule-mimetic microalgae-nitrifying bacteria capsule using a rapid, reverse-dropping method. The capsule was constructed in a core-shell configuration where the liquid core contained nitrifying sludge (3.0 g-SS L⁻¹), and the alginate-based shell (0.5 wt% sodium alginate) immobilized the green microalga *Chlorella sorokiniana* (1.0 g-SS L⁻¹). The capsules were formed by extruding the core suspension containing calcium chloride as a cross-linking agent into the shell solution containing alginate, and shell formation was monitored over various cross-linking durations (5–30 min). Shell thickness increased almost linearly with time, reaching 1.8 mm at 30 min. A cross-linking time of 15 min yielded a shell-to-core volume ratio of approximately 2.0, enabling precise control of biomass distribution and achieving target concentrations in the photobioreactor (0.3 g-SS L⁻¹ nitrifiers, 0.1 g-SS L⁻¹ microalgae) using 2153 capsules per liter. Batch experiments were conducted under white LED illumination (200 μmol photons m⁻² s⁻¹, 12 h light/12 h dark cycles) at pH 7.0 without mechanical aeration. Over a 7-day period, the capsules removed 80.4% of the initial 40 mg-N L⁻¹ ammonium, and complete nitrification was observed within the first 72 hrs. The ammonium removal rate reached 1.0 mg-N mg-TSS⁻¹ h⁻¹, significantly exceeding that of conventional co-im-

mobilized hydrogel systems ($0.43 \text{ mg-N mg-TSS}^{-1} \text{ h}^{-1}$). This enhanced performance was attributed to the improved mass transfer properties of the thin alginate shell and the efficient oxygen diffusion from microalgal photosynthesis into the capsule core. Compared to traditional photogranules, the proposed encapsulation approach offers several advantages: (1) rapid fabrication within minutes compared to biological photogranules synthesis, (2) spatial control over microbial distribution, and (3) elimination of energy-intensive aeration. However, some limitations were also observed. Capsule mechanical integrity decreased over time due to calcium ion leaching and shear stress during operation, suggesting the need for future optimization of encapsulation materials to enhance durability. Nonetheless, this study demonstrates the feasibility of using engineered core-shell capsules to mimic the functionality of natural photogranules, thereby providing a scalable and energy-efficient platform for high-rate, light-driven biological nitrogen removal in wastewater treatment.

Keywords: core-shell capsule, granule sludge, microalgae, nitrifying bacteria

1. 緒言

家畜由来の排水や半導体製造で排出される産業排水は、窒素を多量に含んでおり、これらは一般的に生物学的硝化脱窒法によって処理される。なかでも硝化プロセスには多量の曝気エネルギーを必要とすることから、曝気エネルギーの削減が持続可能な水処理において必要不可欠である。その解決策として、近年、機械的曝気を微細藻類の酸素供給に置き換える「微細藻類-硝化菌共存系」が注目されている。微細藻類と硝化菌を同一リアクターに共存させることで、外部からの光エネルギーにより微細藻類による光合成由来の酸素供給が可能となる。さらに、硝化菌が供給された酸素で硝化し、微細藻類も窒素分を取り込む過程で、安定したpHを維持することができる (Vo et al. 2024)。この共存系による高速処理を目的とした「フォトグラニュール汚泥 (MBGS : microalgal-bacterial granular sludge)」の報告も増加している (Fan et al. 2021)。フォトグラニュールは、グラニュール (造粒) 汚泥の中心部に無酸素環境を作り出し、表面に向かうにつれ好気性微生物、外表面には光合成微生物が付着した構造をとる。これにより、表面において光合成を行い、生成された酸素を用

いてグラニュール汚泥内部で硝化、脱窒素を進めることが可能となる (Jiang et al. 2022)。しかしながら、フォトグラニュールの調製には分散した活性汚泥や種グラニュール汚泥から成長させるなど調製条件にも様々な手法がある上、22日~4ヶ月間という長い形成時間が必要である (Ahmad et al. 2017, Meng et al. 2019)。これらの課題を解決するため、微生物固定化法が短期間かつ粒径制御可能なフォトグラニュールを模擬した担体調製技術として有望であると考えられる。

一般的な微生物固定化法には、包括法やカプセル法などがある。包括法は高分子材料と微生物を混合し、そのまま固定化することで微生物が包括されたゲル状担体で構成される。これは、調製が容易である一方、表面から中心部までの拡散抵抗が大きく、表面や中心部などの特定の部位に任意に微生物分布を制御することができない。一方で、カプセル法では、人工イクラ様の形態をとり、内部 (コア) 液とカプセル (シェル) 膜で構成される。そのため、包括法よりもゲルマトリックスによる拡散抵抗が小さく、微生物の分布を内部液中とカプセル膜中で人為的に分布させることができる。したがって、フォトグラニュールのようなグラニュール内に各種微生物レイヤーを持つ固定化担体には、カプセル法が向いていると

考えられる。Beaらは、カプセル法により部分亜硝化(PN)と嫌気性アンモニウム酸化 (ANAMMOX: anaerobic ammonium oxidation) を1カプセルに固定した単段階独立栄養性窒素除去のコアシェル型カプセルを開発した。高分子材料としてポリビニルアルコール (PVA) とアルギン酸ナトリウム (SA) を用いて、カプセル膜にアンモニア酸化細菌 (AOB: ammonia oxidizing bacteria)、コア部に ANAMMOX の固定化を試み、連続実験において最大 80.4% の高い窒素除去率を示した (Bae et al. 2017)。また、微細藻類をアルギン酸のコアシェル型カプセルに固定化することで、およそ 0.5 d^{-1} の比増殖速度、67.3% のアンモニア除去率を示した研究が報告されている (Tran et al. 2024)。これらのように、硝化菌や微細藻類をそれぞれコアシェル型カプセルに固定化し、排水処理に用いる研究は報告されているが、微細藻類 - 硝化菌共存系で実施した例はまだない。

そこで、本研究では、フォトグラニュールを模擬したコアシェル型カプセルの開発に向けて、コア部に硝化菌、カプセル膜に微細藻類を固定化した微細藻類 - 硝化菌共存系カプセルを提案する (Fig. 1)。カプセル膜では微細藻類が固定化されているため、カプセル表面で光合成が生じ、酸素を膜の内外へ拡散する。コア部に保持されている硝化菌は、生成された酸素を用いて硝化を行い、カプセル外部へ排出する。また、アンモニアはカプセル内部の硝化菌による硝化だけでなく、微細藻類に

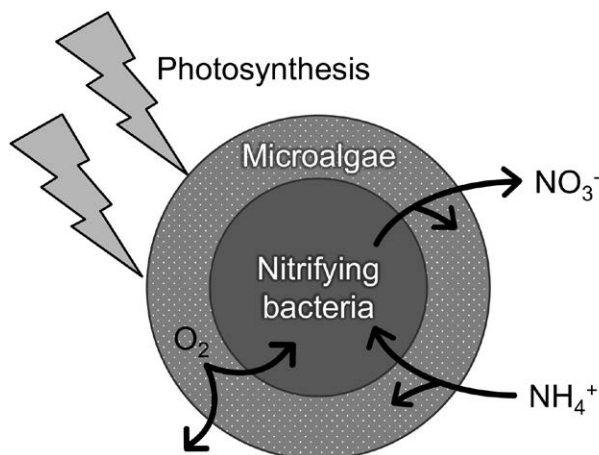


Fig 1. Expected nitrification process in the microalgae-nitrifying bacteria consortium capsule.

よっても取り込まれるため、より迅速なアンモニア除去が期待される。このカプセルが利用可能となれば、高コストな機械的曝気を用いず、短時間で調製可能かつ粒径制御も可能な硝化プロセスが実現できる。そこで、本研究の目的を微細藻類 - 硝化菌共存系カプセルを開発し、その窒素除去性能を評価することとした。まず、カプセル調製条件の検討を行った後、無曝気・光照射下での回分実験を実施した。

2. 材料と方法

2.1. 微細藻類 - 硝化菌共存系カプセルの調製および架橋時間の検討

微細藻類には *Chlorella sorokiniana* (NIES 2173) を、硝化菌には横浜市北部汚泥資源化センターの好気性硝化汚泥を使用した。微細藻類 - 硝化菌共存系カプセルは Fig. 2 に示した逆滴下法によって調製した。まず、カプセルのコア液として、 3.0 g-SS L^{-1} 硝化菌懸濁液に、増粘剤として 8.0 wt% のポリビニルピロリドン (PVP) および、架橋剤として 3.0 wt% 塩化カルシウムを溶解させた。シェル液は、 1.0 g-SS L^{-1} 微細藻類懸濁液に、固定化材料のアルギン酸ナトリウム (SA: sodium alginate) ($80\sim 120 \text{ cP}$) を 0.5 wt% 溶解させた。調製したコア液をシェル液に滴下することで微細藻類 - 硝化菌共存系カプセルを作成した。コア液は 100 mL min^{-1} の押出速度で内径 0.46 mm のノズルへ送液し、シェル液面 10

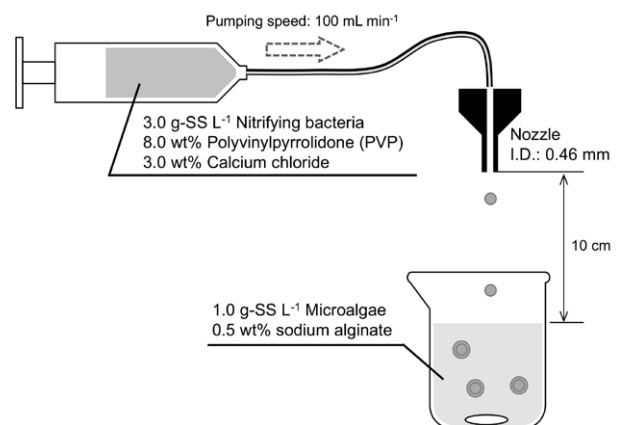


Fig 2. Preparation of microalgae-nitrifying bacteria consortium capsules.

cm の距離から滴下した。滴下後、架橋時間を 5, 10, 15, 30 分として、それぞれの膜厚およびコア - シェルの体積比を評価した。

2.2. 光照射実験方法

2.1 の実験結果より、最適な架橋時間を 15 分とし、上述のカプセル調製方法によって微細藻類 - 硝化菌共存系カプセルを調製した。容積 1000 mL のフラスコに人工排水 ($2.4 \text{ g L}^{-1} (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $1.9 \text{ g L}^{-1} \text{NH}_4\text{Cl}$, $2.8 \text{ g L}^{-1} \text{KH}_2\text{PO}_4$, $2.0 \text{ g L}^{-1} \text{MgSO}_4$, $2.0 \text{ g L}^{-1} \text{NaCl}$, $10.0 \text{ g L}^{-1} \text{NaHCO}_3$, $1.28 \text{ g L}^{-1} \text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) を初期アンモニア濃度 40 mg-N L^{-1} になるよう希釈して使用した。リアクター内の微細藻類濃度は 0.1 g-SS L^{-1} 、硝化菌は 0.3 g-SS L^{-1} となるよう投入カプセル量を調整した。LED 白色光源を用いて、光強度 $200 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ および明暗周期 12 時間 / 12 時間とし、7 日間、硝化実験を実施した (Fig. 3)。pH は pH コントローラーにより pH 7.0 を維

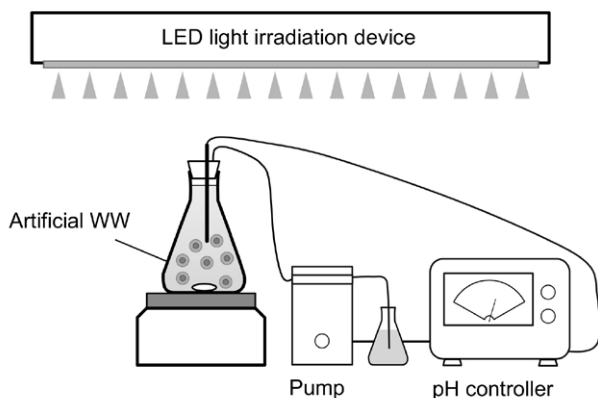


Fig 3. Batch experiments under light irradiation.

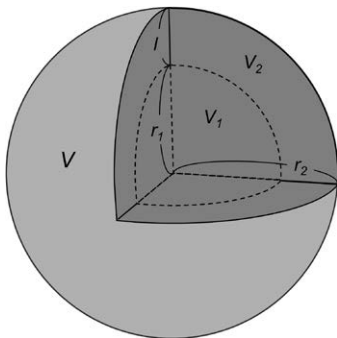


Fig 4. Schematic model for membrane thickness and volume ratio calculations: nitrifiers core with algal shell.

持し、実験期間中、曝気は実施しなかった。

2.3. 分析および計算方法

膜厚測定にデジタルマイクロスコープ (キーエンス, VHX-2000) を用いて、画像からカプセルのコア半径 r_1 およびカプセル半径 r_2 を測定した (Fig. 4)。膜厚 l は式 1 から算出した。

$$l = r_2 - r_1 \quad (1)$$

また、カプセル全体積 V 、コア体積 V_1 およびシェル体積 V_2 としたときの体積比 V_2/V_1 を以下の式から算出した。

$$V_1 = \frac{4}{3} \pi r_1^3 \quad (2)$$

$$V_2 = \frac{4}{3} \pi (r_2 - r_1)^3 \quad (3)$$

光照射実験で得られたサンプルは $0.45 \mu\text{m}$ のガラスフィルター (Advantec, GC-50) でろ過し、各種窒素化合物濃度 (NH_4^+ , NO_2^- , NO_3^-) を高速液体クロマトグラフィー (島津製作所) で分析した。

3. 結果および考察

3.1. 架橋時間による膜厚への影響

調製した微細藻類 - 硝化菌共存系カプセルのデジタルマイクロスコープによる観察結果を Fig. 5 にまとめた。

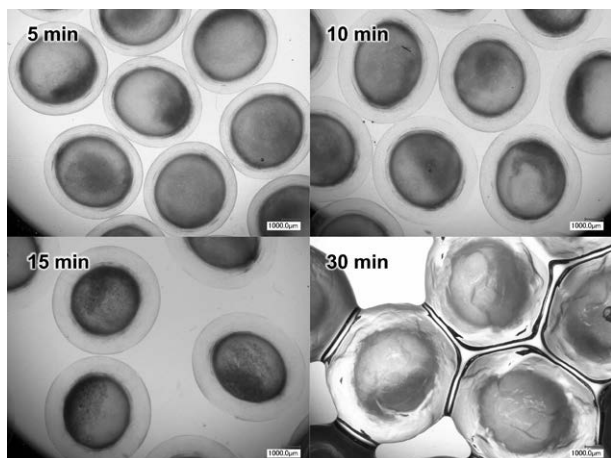


Fig 5. Capsule morphology under varying crosslinking times (5, 10, 15, and 30 min) by digital microscopy.

架橋時間 5 min から 30 min にかけて架橋時間が長くなるにつれ、粒径が大きくなった。アルギン酸ゲルは通常透明であるため、 1.0 g-SS L^{-1} の微細藻類が固定されていても、コア液と膜の境界面を観察することができる。この画像からカプセル粒径およびコア径を測定し、膜厚を算出した。

算出された膜厚 l およびコアに対するシェルの体積比 V_2/V_1 と架橋時間の関係を Fig. 6 に示した。膜厚および体積比は架橋時間の増加に比例して大きくなった。逆滴下法は架橋剤をコア液に含ませ、ポリマーを含むシェル液に滴下させることで、カプセルを形成する。この際、コア液から架橋剤が外側へ拡散することで、カプセル膜が構築されるため膜厚は架橋時間とともに大きくなる。Pereda らによると、アルギン酸 1.0% (w/v) 溶液を、塩化カルシウム 240 g L^{-1} に滴下させたとき、架橋時間 3 min から 30 min では直線的な膜厚の増加が確認されたが、45 min 以降は 30 min の結果と同程度の膜厚であった (Pereda et al. 2019)。本研究でも 30 min 以上の架橋時間は膜厚の増加に大きな影響がなかったと考えられる。調製したカプセルは、膜のみがゲル化 (架橋) しており、コア液は液体状であるため、コア径はどの条件でもほとんど同じであった。また、コア部が液体状であることから圧縮すると人工いくらのように潰れ、中から液体が漏出する。そのため、全体がゲル状の包括

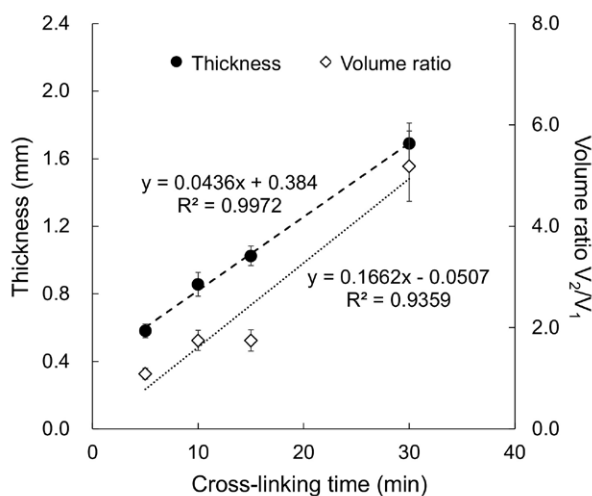


Fig 6. Effect of crosslinking time on capsule shell thickness and volume ratio.

固定化担体に比べて、圧縮強度は比較的低い。既往研究では、 1% (w/v) アルギン酸ナトリウムと乳酸カルシウム 5.0% (w/v) で微細藻類固定化カプセルを調製したとき、乳酸カルシウム 1.25% (w/v) の固定化条件より約 10 倍高い圧縮荷重でカプセルの破断が確認された (Tran et al. 2024)。したがって、より強度の高いカプセルを調製するためには、架橋剤であるカルシウム濃度を上げることが一つの手法である。しかし、膜厚の増加や高い機械的強度は、ゲルマトリックス内の酸素や栄養塩の物質移動速度とトレードオフの関係になることが知られている。Bae らによると、PVA-SA による AOB (シェル) -ANAMMOX (コア) カプセルを調製したとき、カプセルの膜厚を 3.12 mm 以上にすることで溶存酸素 (DO) 濃度 8.0 mg L^{-1} であっても、コア部への酸素拡散を遮断することが確認された。さらに、カプセル膜内における微生物濃度が酸素拡散を有意に低下させることを明らかにした (Bae et al. 2017)。本実験での膜厚は、 1.8 mm 以下であったことから、コア部までの酸素拡散は生じやすい環境であると考えられる。

また、これまで我々は、微細藻類と硝化菌のバイオマス比率が、窒素除去性能に大きく影響を与えることを明らかにしてきた (Nishi et al. 2022)。その知見に基づき、最終的に光照射実験において、リアクター内の微細藻類と硝化菌の比率をそれぞれ 0.1 g-SS L^{-1} および 0.3 g-SS L^{-1} にするため、最適な架橋時間を検討した。カプセル調製前濃度はすでに決定しているため、上述の濃度にするためには、コアに対するシェルの体積比 V_2/V_1 とゲルの投入量 (投入個数) により調整する必要がある。算出した結果、体積比が 2.0 のとき、リアクター内に調製したカプセルを 2153 個投入することで、上述の濃度に調整可能ながわかった。したがって、体積比の結果より本研究では架橋時間 15 min が適切であると決定し、光照射実験にはこの架橋時間で調製した微細藻類 - 硝化菌共存系カプセルを使用した。

3.2. 窒素除去性能評価

実験期間中の窒素化合物濃度を測定した結果を

Fig. 7に示した。アンモニア濃度は実験時間の経過に伴い低下した。実験開始から72時間後までは硝酸、亜硝酸濃度が増加した。しかし、亜硝酸は72時間以降で低下し、硝酸は168時間まで増加し続けたことから、実験後半にかけて完全硝化が進行した。この結果は、Fig. 1に示した理想的な硝化プロセスが実現した裏付けであり、無曝気・光照射のみで微細藻類の光合成で酸素を生成し、続いてコアへの酸素拡散および硝化、膜外へ窒素酸化物の拡散が良好に進んだことが確認された。実験期間におけるアンモニア除去率は80.4%を示し、アンモニア除去速度は $0.4 \text{ mg-N L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ であった。Morán-Valenciaらによると、微細藻類 - バクテリア共存系を包括固定化ゲルに固定化したとき、最大 $0.43 \text{ mg-N mg-TSS}^{-1} \text{ h}^{-1}$ のアンモニア除去速度を示した (Morán-Valencia et al. 2023)。本研究でのアンモニア除去速度は、 $1.0 \text{ mg-N mg-TSS}^{-1} \text{ h}^{-1}$ であり、包括固定化ゲルに比べて高いアンモニア除去速度であったことから、その要因は包括ゲルとカプセルゲルの違いであるマトリックス部分の物質移動速度による影響であったと考えられる。一方で、微細藻類 - バクテリア共存系のフォトグラニュール汚泥でチーズホエイ排水を処理した研究では、 $19.2 \text{ mg-N mg-TSS}^{-1} \text{ h}^{-1}$ のアンモニア除去速度が得られた (Bucci et al.2024)。フォトグラニュール汚泥が

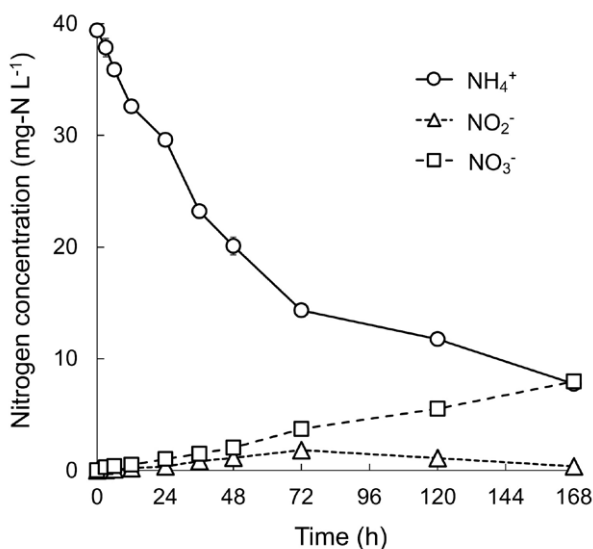


Fig 7. Changes in nitrogen compound concentrations during light irradiation experiment.

非常に高いアンモニア除去速度を示した理由として、ゲルなどによる能動的固定化よりグラニュール汚泥の受動的固定化は、高い微生物密度を持ち、単位体積あたりの反応活性が高くなるためであると考えられる (Li et al. 2024)。したがって、能動的固定化法ではフォトグラニュール汚泥のような高い処理速度を得られないが、固定化後の培養によってフォトグラニュール汚泥と同程度の性能まで向上させることができる可能性がある。また、実験終了時のカプセルは非常に壊れやすい状態になっており、これはアルギン酸ゲル中におけるカルシウムイオンの漏出や攪拌によるせん断力が影響したと考えられる。微細藻類カプセルの既往研究において、実験終了時の破断応力は実験開始前に比べ5分の1まで低下していたと報告されていることから (Tran et al. 2024)、今後は、機械的強度の高い固定化材料の検討が必要である。

4. 結論

本研究で提案した微細藻類 - 硝化菌共存系カプセルは、これまでのフォトグラニュール汚泥形成までの時間を大幅に短縮し、任意の微生物分布をカプセル内に構築することで、フォトグラニュール汚泥の構造に似た担体を実現した。まず、逆滴下法により調製したカプセルは、膜厚が架橋時間と比例して増加した。本研究では、光照射実験での微細藻類、及び硝化菌濃度をそれぞれ 0.1 g-SS L^{-1} 、 0.3 g-SS L^{-1} にするため、体積比 V_2/V_1 が2.0となる15 minが最適な架橋時間であると決定した。また必要なカプセルの投入個数は、2153個であった。窒素除去性能評価では、架橋時間15 minで調製した微細藻類 - 硝化菌共存系カプセルを用いて光照射実験を行った結果、微細藻類の光合成により生成した酸素が、硝化反応に十分な量でコアまで拡散したため、無曝気条件下でも完全硝化を達成した。得られたアンモニア除去速度 ($1.0 \text{ mg-N mg-TSS}^{-1} \text{ h}^{-1}$) は既往研究の包括固定化ゲルを用いた場合より高く、これはカプセルのマトリックス内での優れた物質移動特性に起因すると考えられた。しかし、フォトグラニュール汚泥による高いアンモ

ニア除去速度には及ばず、固定化後の培養条件を最適化するなどの改善が必要であることが示唆された。また、実験終了後にはカプセルの機械的強度が著しく低下したことから、今後は機械的強度や安定性の高い固定化材料の検討が課題となる。

引用文献

- Ahmad JSM, Cai W, Zhao Z, Zhang Z, Shimizu K, Lei Z, Lee DJ (2017) Stability of algal-bacterial granules in continuous-flow reactors to treat varying strength domestic wastewater. *Bioresour Technol* 244: 225–233
- Bae H, Choi M, Chung YC, Lee S, Yoo YJ (2017) Core-shell structured poly(vinyl alcohol)/sodium alginate bead for single-stage autotrophic nitrogen removal. *Chem Eng J* 322: 408–416
- Bucci P, Montero EJ, García-Depraect O, Zaritzky N, Caravelli A, Muñoz R (2024) Assessment of the performance of a symbiotic microalgal-bacterial granular sludge reactor for the removal of nitrogen and organic carbon from dairy wastewater. *Chemosphere* 351: 141250
- Fan S, Zhu L, Ji B (2021) Deciphering the effect of light intensity on microalgal-bacterial granular sludge process for non-aerated municipal wastewater treatment. *Algal Res* 58: 102437
- Jiang Q, Chen H, Fu Z, Fu X, Wang J, Liang Y, Yin H, Yang J, Jiang J, Yang X, Wang H, Liu Z, Su R (2022) Current progress, challenges and perspectives in the microalgal-bacterial aerobic granular sludge process: A review. *Int J Environ Res Public Health* 19: 13950
- Li Y, Wu X, Liu Y, et al. (2024) Immobilized microalgae: principles, processes and its applications in wastewater treatment. *World J Microbiol Biotechnol* 40: 150
- Meng F, Xi L, Liu D, Huang W, Lei Z, Zhang Z, Huang W (2019) Effects of light intensity on oxygen distribution, lipid production and biological community of algal-bacterial granules in photo-sequencing batch reactors. *Bioresour Technol* 272: 473–481
- Morán-Valencia M, Nishi K, Akizuki S, Ida J, Cuevas-Rodríguez G, Cervantes-Avilés P (2023) Nitrogen removal from wastewater by an immobilized consortium of microalgae-bacteria in hybrid hydrogels. *Water Sci Technol* 87(3): 527–538
- Nishi K, Akizuki S, Toda T, Matsuyama T, Ida J (2023) Effects of different biomass ratios of light-tolerant microalgae-nitrifying bacteria consortia on ammonia removal. *Biochem Eng J* 193: 108872
- Pereda M, Poncelet D, Renard D (2019) Characterization of core-shell alginate capsules. *Food Biophys* 14: 467–478
- Tran DTT, Nguyen NK, Yadav AS, Chuang A, Burford M, Malekpour Galogahi F, Sreejith KR, Nguyen NT (2024) Calcium alginate core-shell liquid beads encapsulated with microalgae for wastewater treatment. *Adv Energy Sustain Res* 5: 2400112
- Vo TPT, Danaee S, Chaiwong C, Pham BT, Poddar N, Kim M, Kuzhiumparambil U, Songsomboon C, Pernice M, Ngo HH, Ralph PJ, Vo PHN (2024) Microalgae-bacteria consortia for organic pollutants remediation from wastewater: A critical review. *J Environ Chem Eng* 12: 114213