

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）

伴 修平（滋賀県立大学）

中崎清彦（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 (中崎清彦 nakasaki@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、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} 、 $\mu\text{g C m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ 、 $\text{g C m}^{-2} \text{ y}^{-1}$ 、 $\mu\text{mol (photons) s}^{-1} \text{ m}^{-2}$ 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：エチオピアで作成したレースウェイ型微細藻類培養ポンド

Bulletin of Plankton Eco-Engineering Research

No. 5

June 2025

Contents

Original papers

Changes in phosphorus forms and phosphorus fertilizer effect of chemically treated biochars derived from different organic waste

Yuka Masubuchi, Shinjiro Sato 1

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

Kento Nishi, Tatsushi Matsuyama, Junichi Ida 18

Effects of short hydraulic retention time on UASB reactor performance inoculated with pre-aggregated anaerobic digestion granular sludge

Fujiwara, Daiki Maruyama, Kanako Kimura, Shin-ichi Akizuki, Nigus Gabbiye Habtu, Shinjiro Sato, Tatsuki Toda 25

Impact of impeller rotational speed on sludge velocity distribution in a double helical ribbon reactor: A CFD-based study

Mfor E. Agborambang, Gen Satoyoshi, Masaaki Fujiwara, Pranshu Bhatia, Tatsuki Toda, Kouji Yoshida, Ryosuke Okimune 37

Note

Can zooplankton be cultivated in space? ~Ingestion rate of copepods under microgravity environment~

Yoshiki Takayama, Shinichi Akizuki 46

Cellular characteristics of *Chromochloris zofingiensis* in different nutritional

Anupreet Kaur Chowdhary, Masatoshi Kishi, Tatsuki Toda 51

異なる廃棄物原料由来のバイオ炭の化学処理によるリン酸の形態変化とリン施肥効果

増渕由香、佐藤伸二郎*

1) 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

Changes in phosphorus forms and phosphorus fertilizer effect of chemically treated biochars derived from different organic waste

Yuka Masubuchi, Shinjiro Sato*

1) *Graduate School of Science and Engineering, Soka University*

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

2025年5月18日受付, 2025年6月3日受理

Abstract As phosphorus (P) resources become increasingly depleted, biochar is attracting attention as means to recycle P resources. Biochar is a carbonized organic material at high temperatures under limited oxygen environment and can be used as P fertilizer by using P-rich biological waste as a raw material leading to effective waste management. However, the challenge has been that P in biochar is in forms that are difficult for plants to utilize. In this study, biochars were made from different raw materials such as chicken manure (CM) and sewage sludge (SS), and calcium carbonate (CaCO_3 : Ca) and potassium acetate (CH_3COOK : K) were added in an attempt to change the forms of P in biochar and make it more readily available to plants. Both raw materials were mixed at 0%, 2.5%, 5%, 10%, and 20% (w/w) CaCO_3 and 0% and 5% (w/w) CH_3COOK , then pyrolyzed at 400 °C, 600 °C, and 800 °C, followed by measurements of P availability and species in biochars. A bioassay pot experiment was conducted using K-treated SS biochar with or without nitrogen (N) fertilizer to test P fertilizer effect of biochar for a plant (Japanese mustard spinach). Experimental results showed that when CaCO_3 was added to raw materials before pyrolysis, P was fixed in biochar in a stable form and expected to be effective as a slow-release fertilizer, particularly at the highest pyrolysis temperature, confirmed by P sequential extraction and X-ray diffraction (XRD) results. On the other hand, P sequential extraction and XRD confirmed that when CH_3COOK was added, P was transformed from stable forms into forms that were readily available and easily absorbable by plants. From the bioassay experiment, the plant biomass was highest with an application of K-treated SS biochar coupled with N fertilizer, which was not significant with that with chemical fertilizer. However, SS biochar alone, Ca-treated SS biochar, or K-treated SS biochar without N fertilizer showed reduced

biomass, which was equivalent with that with no amendments at all (soil only). Nevertheless, P absorbed by the plant was not significantly different among all treatments, indicating all biochars may have provided enough P to plant. It was shown that even Ca- or K-treated biochar alone did not suffice to replace chemical fertilizer unless added with N fertilizer especially for leafy plant such as spinach. In conclusion, the study showed that Ca-treatment of raw materials with 0~5% rate could enhance stable forms of P, but K-treatment with 5% rate could improve available forms of P after high temperature pyrolysis, and that particularly K-treated biochar could be used as an alternative to P fertilizers by modifying the biochar production process.

Keywords: Biochar, chicken manure, phosphorus fertilizer, phosphorus fractions, sewage sludge

1. 序論

植物の生育に必要な土壌三大要素として窒素（N）、リン（P）、カリウム（K）がある。近年リン資源の枯渇が示唆され、豊富なリンを含む廃棄物からのリン再利用の研究などが進められている（Rittmann et al. 2011）。豊富なリンを含む資源として下水汚泥や鶏糞などがあるが、原料のまま土壌施用すると環境汚染につながるものが指摘されている。従って、原料を熱分解しバイオ炭とし、土壌に施用する研究が行われている（Manogaran et al. 2022）。

バイオ炭中のリンはほとんどが無機リンである。無機リンは原料中に含まれる様々な金属イオンと結合していて、難溶化している（Lu et al. 2023）。その中でも、鉄（Fe）やアルミニウム（Al）と結合した難溶性リンの形態となり微生物の分解が困難になるため、植物利用が低いことが問題である。そのため、バイオ炭にカルシウム（Ca）やカリウム（K）を添加させることで、Fe や Al との結合を防げることが知られている。炭酸カルシウムを原料と共に炭化を行うことで、緩効性リンとして期待できる Ca 結合形態のリンに移行することが知られている（Zhu et al. 2023）。また、酢酸カリウムと共に炭化を行うことで、易溶性リン形態に移行することが報告されている（Buss et al. 2022）。

バイオ炭中のリンの形態を検討することは、バイオ炭をリン肥料として利用検討する上で重要である。バイオ炭

中のリン形態は異なる溶液によって溶解された抽出液に含まれるリン量を測定することで化学的に分析することが可能である。土壌中のリン酸の形態を分析する方法として、Hedley 逐次分画法が一般的によく使われており（Xu et al. 2016）、その手法をバイオ炭のリン酸の形態の分析に応用することが可能である。しかし、これらの処理による原料による違いや、炭化温度、Ca や K の混合比によるリンの形態変化については既往研究が少ないため、さらなる研究を行う必要がある。

従って、本研究では異なる原料を用いた化学処理バイオ炭の作成と、それらのバイオ炭のリン酸形態の変動、さらに作物栽培によるバイオ炭の肥料効果を明らかにすることを目的とした。

2. 材料と方法

2.1. 実験材料

2.1.1. バイオ炭原料

リン酸形態実験に使用した鶏糞は、東京都八王子市の養鶏場から 2023 年 6 月に採取し、創価大学内屋外で初期乾燥させた後、85℃の乾燥機内で乾燥させた。乾燥させた鶏糞は篩で粒径 2 mm 以下に揃えた。

発酵残渣は、琵琶湖流域で回収された下水汚泥を基質とした中温メタン発酵残渣を遠心分離機（Allegra X-30R, Beckman Coulter）を用いて 4700 rpm で 10 分間、25℃の条件で遠心分離した。固液分離をした固形

分は、60℃の乾燥機内で乾燥させた。乾燥させた発酵残渣は篩で粒径 2 mm 以下に揃えた。

ポット栽培実験で使用した発酵残渣は、採取された下水汚泥を基質とし、滋賀県立大学内にて 200 L 中温メタン発酵槽から採取したメタン発酵汚泥を 4500 rpm で 10 分間遠心分離した。上澄み液と沈殿物に分け、遠心後の固形分を窒素でパージしたポリタンク内で 3 日間放置した。放置後、得られた上澄み液と同量の水道水を投入して軽く混ぜ、3.5 mol L⁻¹ NaOH 溶液を加えて pH を 10 に調整した。その後 1.5 日間攪拌した。pH 処理液を取り出し固液分離をした固形分を廃液タンクに保存し冷蔵した。4℃で冷蔵された発酵残渣を屋外で初期乾燥させた後、60℃の乾燥機内で乾燥させた。乾燥させた発酵残渣は篩で粒径 2 mm 以下に揃えた。

2.1.2. バイオ炭

未処理バイオ炭は 2 mm 以下に揃えた各原料を、45℃の乾燥機内で一晩乾燥させた。これを坩堝に入れ、さらに通気孔の空いた金属容器に密閉し、昇温速度 5℃ min⁻¹、炭化温度 400℃、600℃、800℃、保持時間 2 時間で電気マuffle 炉 (FUW242PA, ADVANTEC) にて炭化した。作製したバイオ炭は篩で粒径を 500 μm 以下に揃えた。発酵残渣および鶏糞原料の未処理バイオ炭を、未発酵炭および未鶏糞炭と略称する。

炭酸カルシウム処理では、未処理バイオ炭と同様の手順で粒径を揃えた各原料に対して、重量比 2.5%、5%、10%、20% の混合比になるように炭酸カルシウムを加え、乾燥状態で 5 分間混合した。これを昇温速度 5℃ min⁻¹、炭化温度 400℃、600℃、800℃、保持時間 2 時間で炭化した。作製したバイオ炭は篩で粒径を 500 μm 以下に揃えた。発酵残渣および鶏糞原料の炭酸カルシウム処理バイオ炭を、Ca 発酵炭および Ca 鶏糞炭と略称する。

酢酸カリウム処理では、未処理バイオ炭と同様の手順で粒径を揃えた発酵残渣 30 g あるいは鶏糞 40 g に対して、重量比 5% の混合比となるように酢酸

カリウム 1.5 g あるいは 2 g を 20 mL あるいは 60 mL の純水に溶かして、300 mL ビーカーに移し混合した。3 時間静置し含浸させた後、60℃の乾燥機内で乾燥させた後に、昇温速度 5℃ min⁻¹、炭化温度 400℃、600℃、800℃、保持時間 2 時間で炭化した。作製したバイオ炭は篩で粒径を 500 μm 以下に揃えた。発酵残渣および鶏糞原料の酢酸カリウム処理バイオ炭を、K 発酵炭および K 鶏糞炭と略称する。

2.1.3. 供試土壌

栽培実験には、滋賀県立大学内の環境科学部圃場実験施設から 2024 年 11 月に採取した土壌を用いた。篩を用いて 9.5 mm 以下にした湿土壌を 45℃の乾燥機内で 2～3 日間乾燥させた。土壌は篩を用いて粒径を 2 mm 以下に揃えてから実験に使用した。

2.1.4. 化成肥料

栽培実験では、窒素肥料は尿素 (N 46% 含有、朝日工業)、リン肥料は過リン酸石灰 (P₂O₅ 17.5% 含有、朝日工業)、カリウム肥料は塩化加里 (K₂O 60% 含有、たまごや) を用いた。これらを坩堝と乳鉢に取り、すりつぶして粉状にしてから使用した。

2.2. 実験方法

2.2.1. リン酸形態実験

原料およびバイオ炭のリン酸逐次抽出は、Hedley 逐次分画法をもとにバイオ炭用に改編された手法 (Xu et al. 2016) に従い測定した。

逐次抽出実験は 50 mL 遠沈管に原料およびバイオ炭 0.2 g と各溶液 20 mL を加え、往復振盪機を用いて 160 rpm で 16 時間振盪した。振盪後、遠心分離機で 30 分間遠心分離を行い、液分を PR 製フィルターホルダーに 0.8 μm メンブレンフィルターを用いてサンプルをろ過し、分析試料とした。この際に、メンブレンフィルター上に残った固形分を、遠心分離後の固形分が入った 50 mL 遠沈管に、測り取った次の溶液 20 mL を用いて流し入れた。これを 16 時間振盪し同様の操作を行っ

た。各溶液は純水、 $0.5 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaHCO}_3$ 、 $0.1 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaOH}$ 、 $1 \text{ mol L}^{-1} \text{ HCl}$ の順番で行った。各溶液で抽出されたろ液を $0.45 \mu\text{m}$ メンブレンフィルターを用いてサンプルをろ過し、分析試料とした。 $1 \text{ mol L}^{-1} \text{ HCl}$ 抽出後に残った固形分とろ紙に残った固形分は全量を 50 mL コニカルビーカーに純水を用いて流し入れた。ビーカーのサンプルを乾燥後、原料およびバイオ炭の全リンと同様に堆肥等有機物分析法（財団法人日本土壌協会 2010）に従って、バイオ炭を分解することで得た溶液を残渣リンとして用いた。

分析試料をpH調整した後、オートアナライザー（FIAlyzer 2000, FIALab Instruments）を用いてリン・モリブデンブルー吸光光度法によってろ液のリン酸濃度を測定した。

2.2.2. ポット栽培実験

ポット栽培実験は、創価大学理工学部実験室内（ $25^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ ）に設置された光源付き3段ラック内で行われ、2024年12月2日から2025年1月7日までの36日間、コマツナ（*Brassica rapa* var. *perviridis*）を栽培した。栽培試験区は、化学肥料とバイオ炭のどちらも施用しない土壌のみの区（無肥区）、化学肥料のみの区（化肥区）、未発酵炭1%（w/w）施用区（未発酵炭区）、Ca発酵炭1%（w/w）施用区（Ca発酵炭区）、K発酵炭1%（w/w）施用区（K発酵炭区）、K発酵炭1%（w/w）と窒素肥料施用区（K発酵炭N区）、K鶏糞炭1%（w/w）と窒素肥料施用区（K鶏糞炭N区）の7区とした。これらの試験区において、それぞれ5反復で栽培を行った。

ポット（4号、 0.4 L ）の底に軽石を敷き詰め、その上を不織布で覆い、土壌 300 g を充填した。各施用物は 300 g の土壌とよく混合して、ポットに充填した。化学肥料は東京都の褐色森林土におけるコマツナ施肥基準（ $\text{N:P}_2\text{O}_5:\text{K}_2\text{O} = 14:12:12 \text{ kg } 10 \text{ a}^{-1}$ ）に合わせて施肥をした。これらのポットに土壌の最大容水量の50%になるように逆浸透膜水を加え、一晩静置した。

コマツナの種子は土壌を一晩静置した翌日に、土壌

表層約 1 cm を攪拌し1ポットにつき8粒播種し、35日間、土壌水分含有量を50%に維持した。水やりは9:00～13:00の間に毎日行った。10日目に間引きを行い、生育の良い固体をポット当たり2株だけ残した。その後26日間栽培を続けた。

栽培後は地上部（葉部・茎部）と地下部（根部）に分けて収穫した。その後植物体を 45°C の乾燥機内で3日以上乾燥させてから、分析に用いた。K鶏糞炭N区は発芽して生育したのは5ポット中8株だけであり、そのうち収穫できたのは2株だけであった。K鶏糞炭N区以外の植物体は2株合計で算出し、K鶏糞炭N区は1ポット1株の2連の平均値で算出した。植物体は乾燥重量、全炭素、全窒素、全リン、全カリウムを分析した。

2.3. 分析方法

2.3.1. pHと導電率

土壌のpHは土壌環境分析法（土壌環境分析編集委員会 1997）に従い、風乾土壌 10 g と純水 20 mL を往復振盪機で 160 rpm で1時間振盪した後、pHメーター（LAQUA F-71, HORIBA）で測定した。バイオ炭のpHは標準の方法（Singh et al. 2017）に従い、風乾バイオ炭 2 g と純水 20 mL を往復振盪機で 160 rpm で1時間振盪した後、pHメーターで測定した。

土壌の導電率は土壌環境分析法（土壌環境分析編集委員会 1997）に従い、風乾土壌 5 g と純水 25 mL を往復振盪機で 160 rpm で1時間振盪した後、ECメーター（SEVEN Easy, METTLER TOLEDO）で測定した。バイオ炭の導電率は標準の方法（Singh et al. 2017）に従い、風乾バイオ炭 2 g と純水 20 mL を往復振盪機で 160 rpm で1時間振盪した後、ECメーターで測定した。

2.3.2. 水溶性リン酸、可給態リン酸、全リン

原料およびバイオ炭の水溶性リン酸は、風乾試料 0.2 g と純水 30 mL を往復振盪機で 160 rpm で16時間振盪した後、遠心分離で5分間遠心分離し、上澄み液を

0.45 μ m メンブレンフィルターでろ過し、分析試料とした。

土壌の可給態リンは、標準の Mehlich 3 抽出法 (Kuo 1996) に従い、風乾土壌 2 g と Mehlich 3 抽出溶液 20 mL を往復振盪機で 200 rpm で 5 分間振盪した後、0.45 μ m メンブレンフィルターでろ過し、分析試料とした。原料およびバイオ炭の可給態リンは標準の 2% ギ酸抽出法 (Rajan et al. 1992) に従い、風乾試料 0.25 g と ギ酸 25 mL を往復振盪機で 160 rpm で 30 分間振盪した後、0.45 μ m メンブレンフィルターでろ過し、分析試料とした。

原料およびバイオ炭の全リンは、堆肥等有機物分析法 (財団法人日本土壌協会 2010) に従い、風乾試料 0.5 g を硝酸、濃硫酸および過塩素酸で全量分解した後、0.45 μ m メンブレンフィルターでろ過し、分析試料とした。植物体の全リンは、硝酸・過塩素酸分解法 (植物栄養実験法編集委員会 1990) に従い、風乾地上部試料 0.1 g を全量分解した後、0.45 μ m メンブレンフィルターでろ過し、分析試料とした。

水溶性リン酸、可給態リン酸、全リンおよび逐次抽出後の分析試料は、測定前に pH 調整を行った。希釈倍率に合わせた試料量をメスフラスコに入れ、pH 指示薬 (0.25% w/v 2,4-ジニトロフェノール) を 2 滴ほど加え、NaOH あるいは HCl で調整後、純水で定量して、オートアナライザーを用いてリン・モリブデンブルー吸光光度法によって試料のリン酸濃度を測定した。

2.3.3. 表面結晶構造

バイオ炭の表面の結晶構造は、X 線回析装置 (D8 ADVANCE, BRUKER) を用いて、測定範囲は 10° ~ 70° 、電圧は 40 kV、電流は 40 mA、 2θ は 26° で測定した。

2.3.4. 植物体乾燥重量

収穫したコマツナの地上部 (葉部、茎部) と地下部 (根部) は、超音波洗浄機 (AS482, アズワン) と水道水を用いて洗浄してから重量測定に用いた。乾燥重量は洗浄後の水分を十分にふき取ってから 75°C の乾燥機内で完全に乾燥させてから電子天秤 (ASP413, アズワン)

を用いて測定した。

2.4. 統計分析

実験の分析結果は、各分析項目別に試験区に対しての分散分析 (一元配置、 $p < 0.05$) を行った。また、各分析項目別に Tukey 法を用いて多重比較分析 ($p < 0.05$) を行った。統計解析には、STATISTICA6.1 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA) を用いた。

3. 結果

3.1. 炭酸カルシウム処理バイオ炭

3.1.1. pH

発酵残渣原料の pH は 7.41 で、 400°C と 600°C の発酵炭では炭酸カルシウム処理によるわずかな pH の上昇が見られ、 800°C 発酵炭では炭酸カルシウム処理による pH の大幅な上昇が見られた (Fig. 1a)。鶏糞原料の pH は 6.68 で、各温度の鶏糞炭では炭酸カルシウム処理によって pH の上昇が見られたが、炭酸カルシウム混合比による大きな変化は見られなかった (Fig. 1b)。

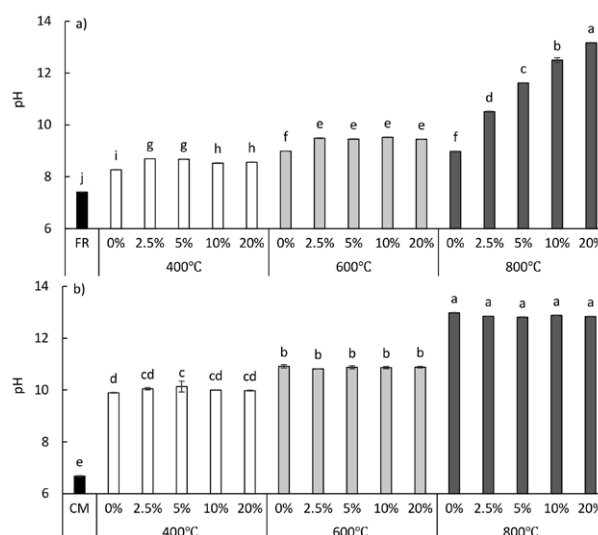


Fig 1. pH of fermentation residue (FR) and FR-biochars (a) and chicken manure (CM) and CM-biochars (b) processed with different calcium carbonate rates and pyrolysis temperatures

Different letters denote significant differences among treatments by 5%.

3.1.2. 水溶性リン酸、可給態リン酸、全リン

発酵残渣原料の水溶性リン酸は 1.57 g kg^{-1} で、炭酸カルシウム混合比の増加と共に水溶性リン酸が減少した (Fig. 2a)。鶏糞原料の水溶性リン酸は 4.03 g kg^{-1} で、炭化後に水溶性リン酸の減少が見られた (Fig. 2b)。炭化温度の上昇と共に水溶性リン酸が減少し、 800°C 鶏糞炭では水溶性リン酸がほとんど抽出されなかった。 400°C 鶏糞炭では炭酸カルシウム混合比の増加と共に、水溶性リン酸の減少が見られた。

発酵残渣原料の可給態リン酸は 9.10 g kg^{-1} で、炭酸カルシウム処理によって可給態リン酸が最大であったのは 800°C の発酵炭であった (Fig. 3a)。 400°C と 600°C の発酵炭と比較し、それぞれの炭酸カルシウム混合比で 800°C 発酵炭において可給態リン酸が高い値となった。鶏糞原料の可給態リン酸は 10.8 g kg^{-1} で、炭化後に可給態リン酸の増加が見られた (Fig. 3b)。 400°C と 600°C の鶏糞炭では、炭酸カルシウム混合比の増加と共に可給態リン酸の減少が見られた。 800°C 鶏糞炭では 2.5% および 5% の炭酸カルシウム混合比の場合において、 800°C の鶏糞炭よりも可給態リン酸が増加したが、

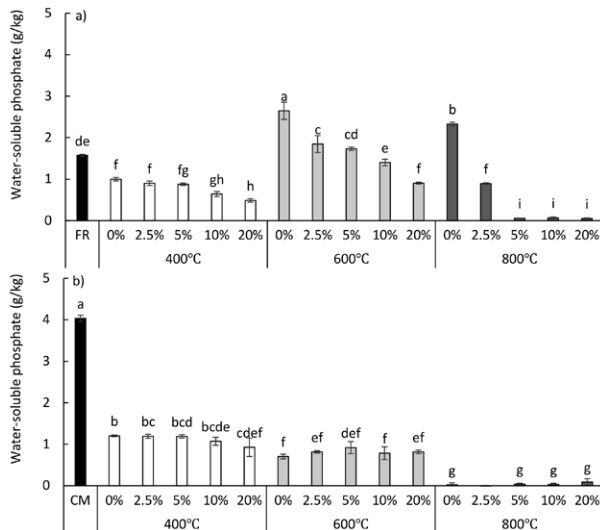


Fig 2. Water-soluble phosphate of fermentation residue (FR) and FR-biochars (a) and chicken manure (CM) and CM-biochars (b) processed with different calcium carbonate rates and pyrolysis temperatures. Different letters denote significant differences among treatments by 5%.

炭酸カルシウム混合が多いと可給態リン酸が減少した。

発酵残渣原料の全リンは 37.5 g kg^{-1} で、炭化温度の上昇と共に全リン濃度が増加した (Fig. 4a)。鶏糞

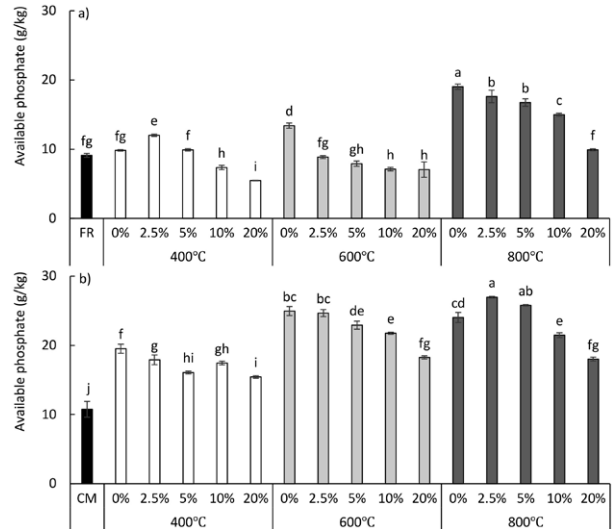


Fig 3. Available phosphate of fermentation residue (FR) and FR-biochars (a) and chicken manure (CM) and CM-biochars (b) processed with different calcium carbonate rates and pyrolysis temperatures. Different letters denote significant differences among treatments by 5%.

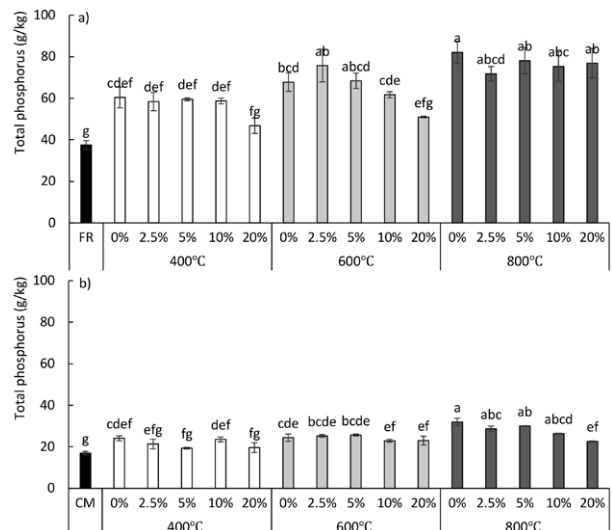


Fig 4. Total phosphorus of fermentation residue (FR) and FR-biochars (a) and chicken manure (CM) and CM-biochars (b) processed with different calcium carbonate rates and pyrolysis temperatures. Different letters denote significant differences among treatments by 5%.

原料の全リンは 17.0 g kg^{-1} で、炭化後に全リンの濃度が増加し、炭酸カルシウム混合比の増加に伴って減少傾向であった (Fig. 4b)。

3.1.3. 逐次抽出リン酸形態

発酵炭の水抽出リン酸と NaHCO_3 抽出リン酸の割合は、原料および炭酸カルシウム処理炭を通して比較的 low、それぞれ 0 ~ 3% および 2 ~ 6% の範囲で変動した (Fig. 5a)。 NaHCO_3 抽出リン酸は、800℃ 発酵炭で原料よりも低い割合を示した。 NaOH 抽出リン酸の割合は原料で 58% であり、400℃ および 600℃ の発酵炭では大きな変化は見られなかった (54 ~ 64%)。しかし、800℃ 発酵炭では炭酸カルシウム混合比の増加に伴い大幅な減少 (21 ~ 56%) が観察された。 HCl 抽出リン酸の割合は、炭化により原料 (20%) と比較して増加し、400℃ および 600℃ の発酵炭では炭酸カルシウム混合比の増加に伴い減少したが、800℃ 発酵炭では増加する傾向が見られた。残渣リンの割合は、原料の 14% と比較して全ての処理区で低く (2 ~ 11%)、炭化温度による明確な傾向は見られなかった。

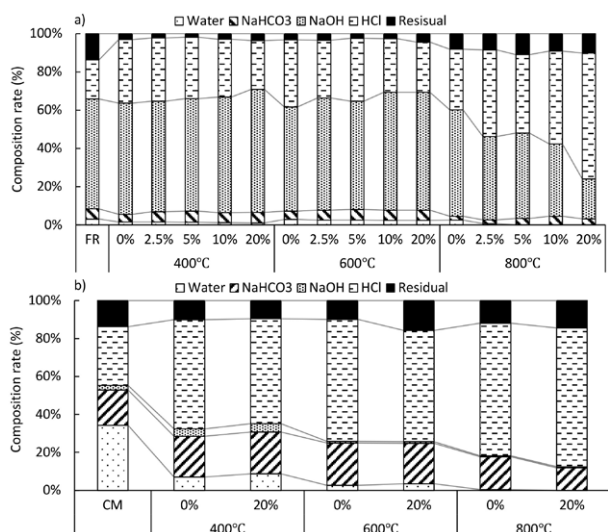


Fig 5. Phosphorus fraction composition rate of fermentation residue (FR) and FR-biochars (a) and chicken manure (CM) and CM-biochars (b) processed with different calcium carbonate rates and pyrolysis temperatures

鶏糞炭の水抽出リン酸の割合は、原料の 34% から炭化処理により大幅に減少し (0 ~ 9%)、炭酸カルシウム混合による顕著な影響は見られなかった (Fig. 5b)。 NaHCO_3 抽出リン酸の割合は、400℃ および 600℃ の鶏糞炭では原料 (19%) とほぼ同程度 (21 ~ 22%) であったが、800℃ 鶏糞炭では減少し (17%)、炭酸カルシウム混合によりさらに低下した (12%)。 NaOH 抽出リン酸の割合は原料で 2% と低く、400℃ 鶏糞炭でわずかに増加 (4 ~ 5%) したものの、高温では減少し、全ての処理区で全リンに占める割合は低かった (0 ~ 5%)。 HCl 抽出リン酸の割合は、炭化温度の上昇に伴い増加し、炭酸カルシウム混合による顕著な影響は見られなかった。残渣リンの割合は、原料 (14%) と比較して未鶏糞炭で減少し (10 ~ 12%)、炭化温度の上昇に伴い減少する傾向が見られた。600℃ および 800℃ の鶏糞炭では、炭酸カルシウム混合により残渣リンが増加した。

3.1.4. 表面結晶構造

400℃ 発酵炭では、未処理炭において目立ったピークが見られなかったが、炭酸カルシウム処理により方解石

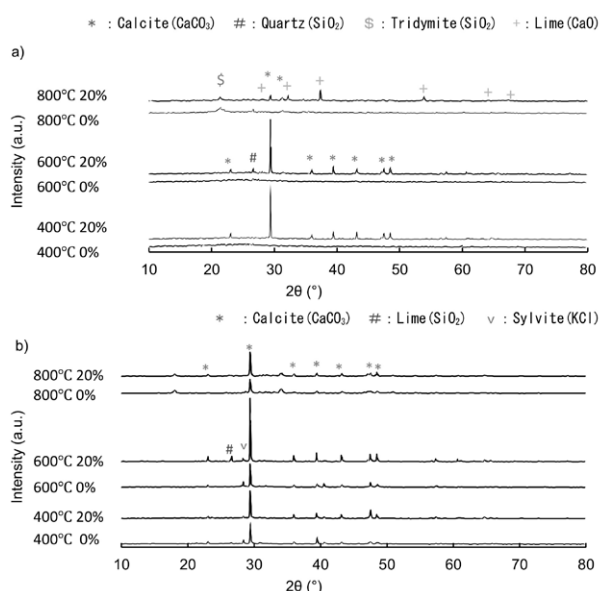


Fig 6. X-ray diffraction pattern of fermentation residue-biochars (a) and chicken manure-biochars (b) processed with different calcium carbonate rates and pyrolysis temperatures

(Calcite; CaCO_3) の結晶が見られた (Fig. 6a)。混合比の増加と共に方解石の結晶度が増加した。石英 (Quartz; SiO_2) の結晶も見られた。炭酸カルシウム処理により方解石のピークが見られたと考えられる。600℃発酵炭では、400℃発酵炭と同様に方解石と石英のピークが見られ、炭酸カルシウム混合比の増加に伴い結晶度が増加した。800℃発酵炭でも同様に方解石と石英のピークが見られた。しかし、石英のピークは小さくなり、トリディマイト (Tridymite; SiO_2) のピークが強く現れた。また、10%以上の混合比における試験区では石灰 (Lime; CaO) のピークが現れた。

400℃と600℃の鶏糞炭では、方解石とシルバイト (Sylvite; KCl) の結晶構造が見られた (Fig. 6b)。方解石は炭酸カルシウム混合比の増加に伴って結晶度が増加したが、シルバイトは混合比の増加によって結晶度の減少が見られた。800℃鶏糞炭ではシルバイトの結晶が見られず、方解石のピークのみ見られた。

3.2. 酢酸カリウム処理バイオ炭

3.2.1. pH

発酵残渣原料の pH は 7.5 で、原料と比較して炭化後に pH の上昇が見られた (8.45 ~ 9.44; Fig. 7a)。酢酸カリウム処理により、未処理炭よりも高い値となった (9.33 ~ 9.96)。鶏糞原料の pH は 6.94 で、炭化後に pH の上昇が見られた (10.2 ~ 13.4; Fig. 7b)。酢酸カリウム処理により、未処理炭よりも高い値となった (10.9 ~ 13.4)。

3.2.2. 水溶性リン酸、可給態リン酸、全リン

発酵残渣原料の水溶性リン酸は 1.48 g kg^{-1} で、全ての炭化温度において酢酸カリウム処理によって未処理炭よりも高い水溶性リン酸が抽出された (Fig. 8a)。鶏糞原料の水溶性リン酸は 2.68 g kg^{-1} で、炭化後に水溶性リン酸が減少した (Fig. 8b)。800℃鶏糞炭では、水溶性リン酸がほとんど抽出されなかった。400℃と600℃の鶏糞炭では、酢酸カリウム処理によって未処理炭よりも低い水溶性リン酸が抽出された。

発酵残渣原料の可給態リン酸は 10.1 g kg^{-1} で、全ての炭化温度において酢酸カリウム処理により未処理炭

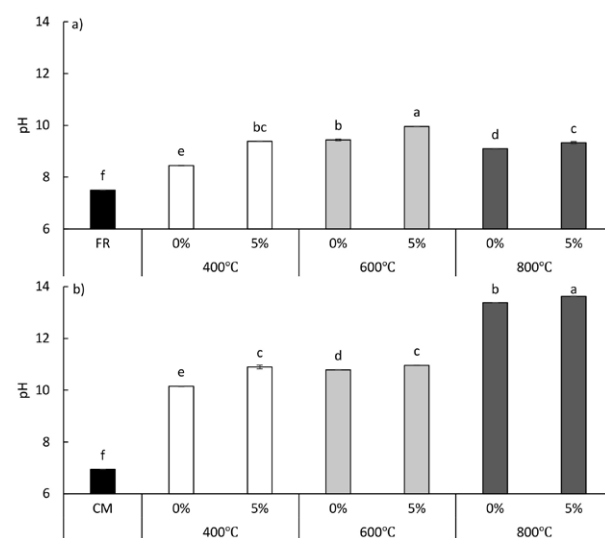


Fig 7. pH of fermentation residue (FR) and FR-biochars (a) and chicken manure (CM) and CM-biochars (b) processed with different potassium acetate rates and pyrolysis temperatures

Different letters denote significant differences among treatments by 5%.

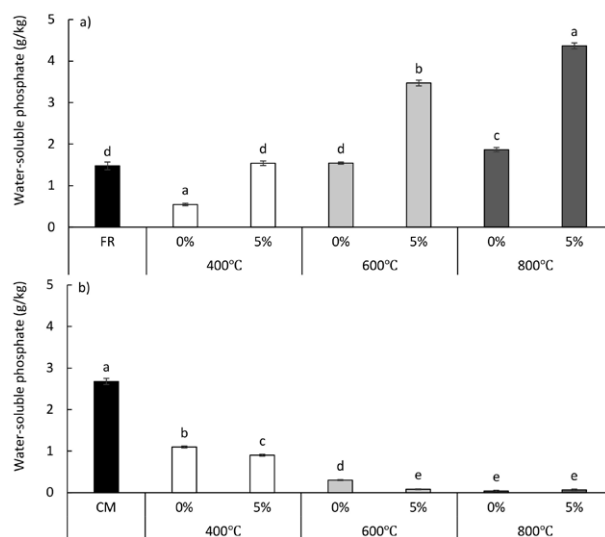


Fig 8. Water-soluble phosphate of fermentation residue (FR) and FR-biochars (a) and chicken manure (CM) and CM-biochars (b) processed with different potassium acetate rates and pyrolysis temperatures

Different letters denote significant differences among treatments by 5%.

よりも高い濃度が抽出された (Fig. 9a)。最大の可給態リン酸は、酢酸カリウム 5% 処理の 800°C 発酵炭であった (16.4 g kg^{-1})。鶏糞原料の可給態リン酸は 10.7 g kg^{-1} で、炭化後に高い可給態リン酸が抽出された ($18.9 \sim 21.6 \text{ g kg}^{-1}$; Fig. 9b)。400°C と 800°C の鶏糞炭では、酢酸カリウム処理によって未処理炭よりも高い可給態リン酸が抽出された。最大の可給態リン酸は、酢酸カリウム 5% 処理の 800°C 鶏糞炭であった (21.5 g kg^{-1})。

発酵残渣原料の全リンは 35.9 g kg^{-1} で、炭化温度と共に全リン濃度が上昇した ($57.6 \sim 83.7 \text{ g kg}^{-1}$; Fig. 10a)。鶏糞原料の全リンは 14.0 g kg^{-1} で、炭化温度と共に全リン濃度が上昇した ($20.5 \sim 33.0 \text{ g kg}^{-1}$; Fig. 10b)。

3.2.3. 逐次抽出リン酸形態

発酵残渣の水抽出リン酸と NaHCO_3 抽出リン酸の割合は処理を通して低く (2 ~ 5%)、炭化により NaHCO_3 抽出リン酸が減少したが、酢酸カリウム処理の影響は小さかった (Fig. 11a)。 NaOH 抽出リン酸の割合も処理間で大きな変動はなかった (57 ~ 59%)。HCl

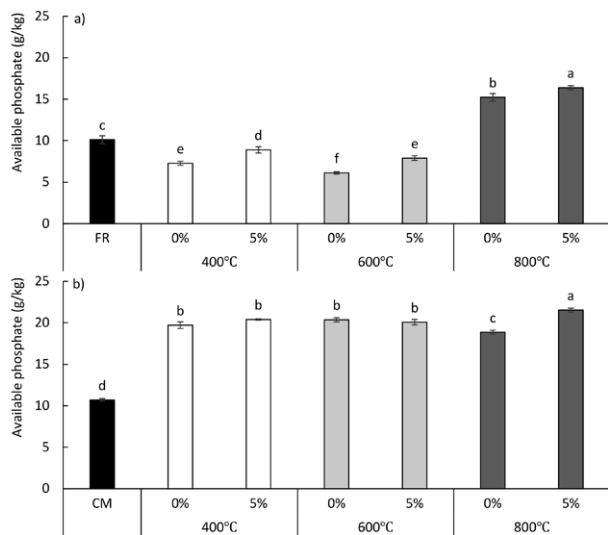


Fig 9. Available phosphate of fermentation residue (FR) and FR-biochars (a) and chicken manure (CM) and CM-biochars (b) processed with different potassium acetate rates and pyrolysis temperatures. Different letters denote significant differences among treatments by 5%.

抽出リン酸の割合は炭化により増加したが (19% から 31%)、酢酸カリウム処理でわずかに減少した (31% から 26%)。残渣リンの割合は炭化後に低下した。

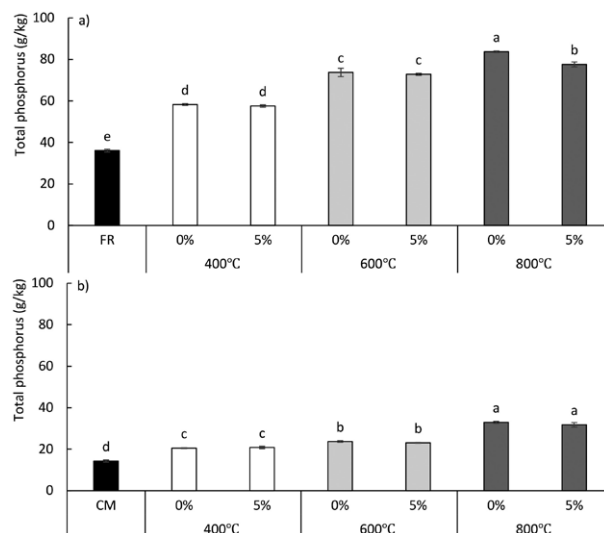


Fig 10. Total phosphorus of fermentation residue (FR) and FR-biochars (a) and chicken manure (CM) and CM-biochars (b) processed with different potassium acetate rates and pyrolysis temperatures. Different letters denote significant differences among treatments by 5%.

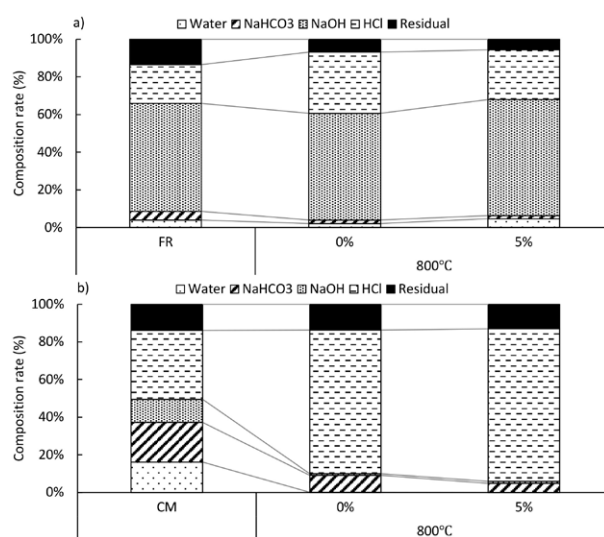


Fig 11. Phosphorus fraction composition rate of fermentation residue (FR) and FR-biochars (a) and chicken manure (CM) and CM-biochars (b) processed with different potassium acetate rates and 800°C pyrolysis temperature.

鶏糞炭の水抽出リン酸は炭化により消失した（16% から 0%; Fig. 11b）。NaHCO₃ 抽出リン酸と NaOH 抽出リン酸は、炭化および酢酸カリウム処理により減少した（21% から 9% から 5% および 12% から 1% から 1%）。対照的に、HCl 抽出リン酸は炭化および酢酸カリウム処理により著しく増加した（37% から 76% および 76% から 81%）。残渣リンの割合は処理を通して安定していた（13 ~ 14%）。

3.2.4. 表面結晶構造

400℃と 600℃の発酵炭において、酢酸カリウム処理によるピークの大きな変化は見られなかった（Fig. 12a）。しかし、800℃の K 発酵炭では未処理炭と比較し、トリディマイトを含めた結晶が見られず、結晶度が減少したことが示された。400℃と 600℃の鶏糞炭では、方解石とシルバイトの結晶構造が見られた（Fig. 12b）。方解石は炭化温度の上昇に伴って結晶度が増加した。800℃鶏糞炭では方解石やシルバイトの結晶が見られず、新たなピークが多く見られた。

3.3. ポット栽培実験

3.3.1. 供試土壌とバイオ炭の基礎特性

栽培実験に用いた土壌は中性で、窒素濃度が低く、可給態リン酸とカリウムが高かった（Table 1）。栽培実験に用いた発酵炭はアルカリ性を示し、酢酸カリウム処

理により水溶性リン酸、可給態リン酸、全カリウムが増加した（Table 2）。鶏糞炭は高い pH、高い導電率、低い水溶性リン酸、発酵炭と同程度の可給態リン酸、高い全カリウムを特徴とした（Table 2）。発酵残渣およびその炭化物中の金属濃度はアルミニウムが最も高く、次いでナトリウムであり、一部に微量のヒ素が検出された（Table 3）。

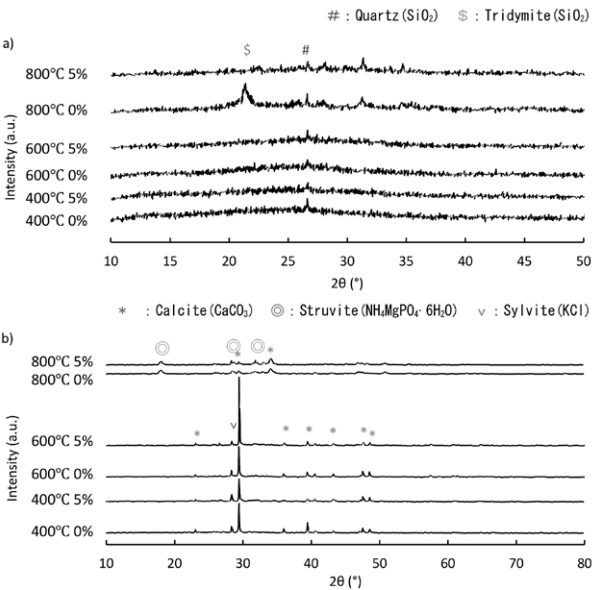


Fig 12. X-ray diffraction pattern of fermentation residue-biochars (a) and chicken manure-biochars (b) processed with different potassium acetate rates and pyrolysis temperatures

Table 1. Basic characteristics of soil sample used in bioassay experiment before experiment

pH	Electric conductivity μS cm ⁻¹	Ammonium-nitrogen mg kg ⁻¹	Nitrate-nitrogen mg kg ⁻¹	Available phosphate mg kg ⁻¹	Available potassium mg kg ⁻¹	Bulk density g m ⁻³	Cation exchange capacity cmol. kg ⁻¹
7.13	88.0	0.22	5.21	729	274	1.17	12.1

Table 2. Basic characteristics of fermentation residue, fermentation residue-biochar, and chicken manure-biochar used in bioassay experiment

	Pyrolysis temperature	Treatment	pH	Electric conductivity μS cm ⁻¹	Water-soluble phosphate g kg ⁻¹	Available phosphate g kg ⁻¹	Total phosphorus g kg ⁻¹	Total potassium g kg ⁻¹
Fermentation residue			9.7	3340	5.5	13.4	36.8	1.4
Fermentation residue-biochar	800°C	None	10.3	3023	10.2	18.4	73.7	2.8
		Ca	10.8	3690	9.1	18.0	73.9	3.0
		K	10.5	5807	17.0	23.2	76.3	31.6
Chicken manure-biochar	800°C	K	13.3	43233	0.3	22.6	31.1	65.2

3.3.2. 栽培後土壌の pH および導電率

栽培後の土壌では、化肥区では硝化による水素イオン放出で pH が低下したが、他の処理区では pH が上昇した (Table 4)。栽培実験後の各試験区の pH は、無肥区 7.15、化肥区 6.01、未発酵炭区 8.13、Ca 発酵炭区 8.28、K 発酵炭区 8.18、K 発酵炭 N 区 7.52、K 鶏糞炭 N 区 7.93 であった。栽培後の土壌の導電率

では、高い導電率を持っていた鶏糞炭区で顕著に上昇した (Table 4)。栽培実験後の各試験区の導電率は、無肥区 $82.7 \mu\text{S cm}^{-1}$ 、化肥区 $680 \mu\text{S cm}^{-1}$ 、未発酵炭区 $223 \mu\text{S cm}^{-1}$ 、Ca 発酵炭区 $262 \mu\text{S cm}^{-1}$ 、K 発酵炭区 $240 \mu\text{S cm}^{-1}$ 、K 発酵炭 N 区 $360 \mu\text{S cm}^{-1}$ 、K 鶏糞炭 N 区 $818 \mu\text{S cm}^{-1}$ であった。

Table 3. Metal concentrations of fermentation residue, fermentation residue-biochar, chicken manure, and chicken manure-biochar used in bioassay experiment

	Pyrolysis temperature	Treatment	Ca	Mg	Na	Fe	Mn	Zn	Cu	B	Al	Hg	As	Cr	Cd	Pb	Se
Fermentation residue	800°C	None	9.8	4.0	44.6	5.7	0.6	0.6	0.5	nd	80.6	nd	0.05	nd	nd	nd	nd
Fermentation residue-biochar		Ca	12.4	8.0	89.4	11.7	1.3	1.1	1.0	nd	152	nd	0.05	0.1	nd	nd	nd
		K	27.9	10.8	119	13.7	1.5	1.2	1.1	nd	155	nd	0.07	0.1	nd	nd	nd
Chicken manure	800°C		16.2	5.5	66.6	6.8	0.9	0.9	0.8	nd	107	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Chicken manure-biochar		K	31.4	8.8	4.1	1.3	0.7	0.5	0.1	nd	1.5	nd	nd	nd	nd	nd	nd
			46.5	16.2	8.4	2.7	1.3	0.9	0.1	nd	2.1	nd	nd	nd	nd	nd	nd

nd: not detectable under 0.001 g kg^{-1}

Table 4. pH and electric conductivity of soil samples used in bioassay experiment after experiment

Treatment	pH	Electric conductivity $\mu\text{S cm}^{-1}$
Control	7.15	82.7
Chemical fertilizer	6.01	680
No treatment	8.13	223
Fermentation residue-biochar	Ca-treatment	8.28
	K-treatment	8.18
	K-treatment + N	7.52
Chicken manure-biochar	K-treatment + N	7.93

Different letters denote significant differences among treatments by 5%.

3.3.3. 植物体の乾燥重量、全炭素、全窒素、全リン、全カリウム

栽培後の植物体の地上部のポット当たりの乾燥重量は、K 発酵炭 N 区 (0.94 g) で一番高く、次いで化肥区 (0.81 g) であった (Fig. 13)。無肥区 (0.39 g) と比べて、バイオ炭のみの試験区では有意な差は見られなかった。栽培後の植物体の全炭素量は、化肥区 (36.9%) 以外全ての試験区間で有意差はなかったが、Ca 発酵炭区 (40.6%) と K 発酵炭区 (40.6%) で最も高かった (Fig. 14)。

栽培後の植物体の全窒素量は、化肥区 (6.89%)、

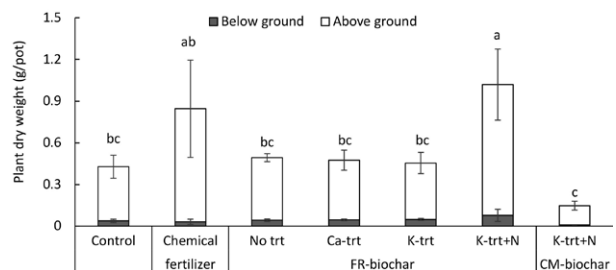


Fig 13. Plant dry weights (above ground and below ground) after bioassay experiment

Control: no amendments, FR: fermentation residue, CM: chicken manure

Different letters denote significant differences among treatments by 5%.

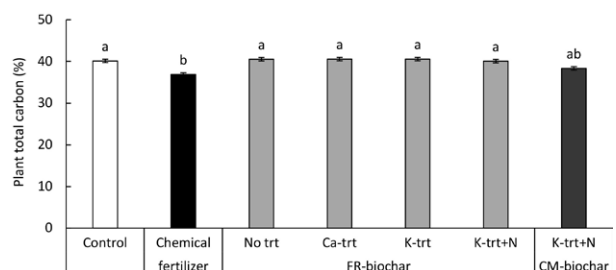


Fig 14. Plant total carbon after bioassay experiment

Control: no amendments, FR: fermentation residue, CM: chicken manure

Different letters denote significant differences among treatments by 5%.

K 鶏糞炭 N 区 (6.81%)、および K 発酵炭 N 区 (6.10%) で有意に高く、その他の試験区では有意差はなかった (Fig. 15)。N 肥料施肥区で高い全窒素量となった。

栽培後の植物体の全リン量は、全ての試験区で有意差はなかったが、K 発酵炭 N 区 (0.61%) で一番高く、次いで化肥区 (0.59%)、K 鶏糞炭 N 区 (0.58%)、K 発酵炭区 (0.53%) の順であった (Fig. 16)。

栽培後の植物体の全カリウム量は、K 鶏糞炭 N 区 (5.65%) で一番高く、次いで化肥区 (5.23%) で有意差はなかった (Fig. 17)。発酵残渣炭の中では K 発酵炭 N 区 (2.77%) が一番高く、次いで K 発酵炭区 (2.13%) で、未発酵炭区 (1.29%) および Ca 発酵炭区 (1.25%) より有意に高かった。

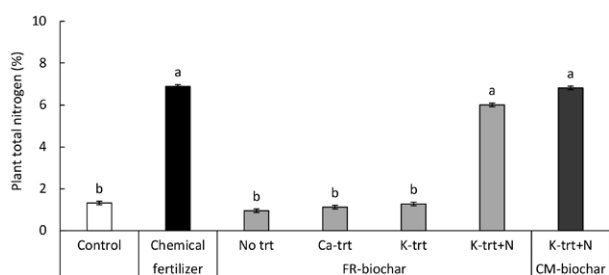


Fig 15. Plant total nitrogen after bioassay experiment

Control: no amendments, FR: fermentation residue, CM: chicken manure

Different letters denote significant differences among treatments by 5%.

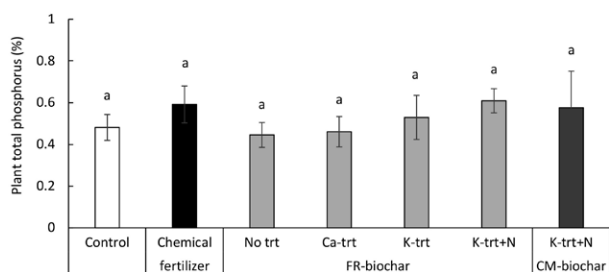


Fig 16. Plant total phosphorus after bioassay experiment

Control: no amendments, FR: fermentation residue, CM: chicken manure

Different letters denote significant differences among treatments by 5%.

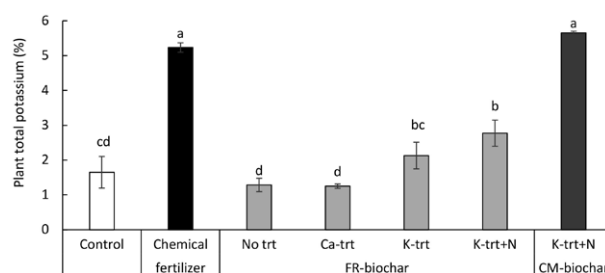


Figure 17. Plant total potassium after bioassay experiment

Control: no amendments, FR: fermentation residue, CM: chicken manure

Different letters denote significant differences among treatments by 5%.

4. 考察

4.1. 炭酸カルシウム処理バイオ炭

4.1.1. pH

発酵残渣炭の pH は、先行研究 (Adhikari et al. 2019, Liu et al. 2019) において報告されている一般的な範囲内であった。炭化処理に伴う pH の上昇は、熱分解過程における有機酸および炭酸塩の分解に起因するアルカリ性の増大として一般的に理解されている (Yuan et al. 2015)。炭酸カルシウム処理を施したバイオ炭では、pH の上昇が認められ、特に最大炭化温度 800℃においては、炭酸カルシウムの混合比率の増加に伴い、顕著な pH の増大が観察された (Fig. 1a)。この急激な pH 上昇は、後述の XRD 分析結果 (Fig. 6a) から示唆されるように、炭酸カルシウムの分解によって生成したアルカリ性の石灰 (CaO) の析出によるものと推察される。

下水汚泥の熱分解に関する先行研究 (Adhikari et al. 2019, Méndez et al. 2013) では、灰分の減少とそれに伴う塩類および金属の溶解度低下が報告されているが、本研究における 800℃の Ca 発酵炭を除き、同様の傾向が認められた。バイオ炭の pH が炭化温度の上昇とともに増大する現象は、有機酸の揮発に加え、カルボン酸、ラクトン、フェノール、カルボニル基といった酸素含有表面官能基の分解によって引き起こされると考え

られている。

文献値として報告されている鶏糞灰の 600℃における pH 値 (8.27) に対し、本研究で得られた 600℃の鶏糞炭の pH 値 11.5 が顕著に高かった (Fig. 1b)。要因としては、塩基性窒素化合物やピリジン塩酸塩の形成が示唆される。原料の元素組成が灰の鉱物組成に影響を与えるため、初期灰分が高い原料を炭化した場合、初期灰分の低い原料と比較して、より高い pH と石灰化能を有するバイオ炭が生成されることが知られている (Hass et al. 2012)。今回作製した鶏糞炭において炭化による pH 上昇が観察されたのは、このメカニズムによるものと考えられる。

後述の XRD 分析の結果 (Fig. 6b) から、800℃の未鶏糞炭においても比較的高い方解石 (CaCO_3) のピークが検出された。このことは、炭酸カルシウム混合処理による追加的な効果が顕在化しにくい条件であった可能性を示唆している。

4.1.2. 水溶性リン酸

先行研究 (Liu et al. 2019, Qian & Jiang 2014) では、炭化温度の上昇に伴いリンが安定化し、水溶性リン酸が減少すると報告されている。しかし、本研究では 600℃および 800℃の未発酵炭において、原料よりも高い水溶性リン酸が認められた (Fig. 2a)。Ca 発酵炭では水溶性リン酸が減少し、これは原料中の PO_4^{3-} が Fe^{3+} や Al^{3+} との結合を抑制され、 Ca^{2+} と優先的に結合し安定な Ca-P を形成したためと考えられる (Liu et al. 2019)。逐次抽出実験の結果 (Fig. 5a) から、800℃の高炭酸カルシウム処理の発酵炭では Ca-P 結合リンが増加しており、水溶性リン酸の顕著な減少と整合的である。

鶏糞炭に関する先行研究 (Wang et al. 2015) では、425℃炭化バイオ炭の水抽出で有機結合リン酸の存在が示唆され、原料と比較して水溶性リン酸が大幅に減少している。本研究でも同様に、炭化により水溶性リン酸が顕著に減少した (Fig. 1b)。逐次抽出実験の結果 (Fig. 5b) からは、利用されにくい HCl 抽出リン酸画

分の増加が示唆され、これは熱分解によるリン形態の変化 (Qian & Jiang 2014) と一致する。炭化温度の上昇や炭酸カルシウム処理によるリンの難抽出性画分への移行が、水溶性リン酸の減少に寄与したと考えられる。

4.1.3. 可給態リン酸

バイオ炭のリン酸利用能評価には 2% ギ酸抽出が推奨されており (Wang et al. 2012)、これは植物による可給態リン酸の指標となる。2% ギ酸抽出リン酸量は、リン肥料としてのバイオ炭の価値を評価する上で重要である。先行研究 (Robinson & Leinweber 2023) では、炭化によりギ酸抽出リン酸量が増加することが報告されており、これは原料中の有機リン結合の切断と 250℃以上の炭化による酸可溶性塩の増加 (Wang et al. 2012) に起因する。ギ酸は Ca 結合リン鉱物も溶解可能であり (Robinson & Leinweber 2023)、本研究の逐次抽出実験 (Fig. 5a) で示唆される炭化による Ca 結合リン酸増加が、可給態リン酸増加の要因と考えられる (Fig. 3a)。しかし、炭酸カルシウム混合比の増加と共に発酵炭の可給態リン酸が減少傾向にあり、特に 800℃バイオ炭で顕著であった。

先行研究 (Wang et al. 2015) では、ギ酸が全リンと同程度のリンを抽出した例もある。ギ酸抽出画分は、逐次抽出実験における HCl 抽出の Ca 結合リン形態からも溶出されると考えられる (Wang et al. 2012)。鶏糞は Ca 結合リンが多い原料であり (Robinson & Leinweber 2023)、本研究の後述する HCl 抽出画分の多さ (Fig. 6b) と整合的である。本研究の結果から、炭化による HCl 抽出画分の増加が可給態リン酸の増加に寄与したと考えられる。

4.1.4. 全リン

発酵残渣の炭化処理により、原料と比較してバイオ炭中の全リン濃度が上昇した (Fig. 4a)。これは、炭化に伴う収量の減少、特に高温条件下での有機物分解 (Zhang et al. 2022) によるリンの濃縮に起因する。発酵炭の収量は炭化温度上昇に伴い減少し、全リン濃

度は増加する傾向を示した。炭酸カルシウム処理炭では、未処理区と比較して全リン濃度が低下した。これは、先行研究（Zhu et al. 2023）でも報告されており、炭酸カルシウム添加による汚泥揮発の抑制と収量増加が、バイオ炭中の炭酸カルシウム割合を増やし、結果として発酵残渣由来の全リン濃度を希釈したためと考えられる。

鶏糞炭においても、炭化により全リン濃度が上昇した（Fig. 4b）。これは、熱分解炭化がリンの濃縮プロセスとなり、有機結合リンが無機リンに濃縮されるとともに一部揮発することで、相対的に全リン濃度が増加した（Zuo et al. 2020）ためと考えられる。鶏糞炭の収量も炭化温度上昇に伴い減少する傾向を示した。

4.1.5. 逐次抽出リン酸形態

炭化により下水汚泥中の有機リンは無機リンに変換され、金属陽イオンと結合して無機塩を形成する（Lu et al. 2023, Yu et al. 2021）。発酵炭では、炭化温度の上昇に伴い Fe/Al 結合リン酸（NaOH 抽出リン酸）の割合が減少し、Ca 結合リン酸（HCl 抽出リン酸）の割合が増加した（Fig. 5a）。これは、炭化過程で利用可能なリン酸が安定な Ca および Mg 関連形態に固定化されるという先行研究（Nan et al. 2023, Qian & Jiang 2014）と一致する。HCl 抽出リン酸は徐放性リン肥料としての期待が高いアパタイトリンを含むが、Fe/Al 結合リンは植物による直接利用が難しい（Zhu et al. 2023）。炭酸カルシウム処理は炭化温度により影響が異なり、800℃では炭酸カルシウム混合比の増加に伴い NaOH 抽出リン酸が減少し、HCl 抽出リン酸が大幅に増加した（Fig. 5a）。これは CaO/CaCO₃ 添加による Fe/Al 結合リン減少と Ca/Mg 結合リン増加の先行研究（Liu et al. 2019, Zhu et al. 2023）と類似する。400℃と 600℃で効果が薄かったのは、低温下では発酵残渣中のカルボキシル基やヒドロキシ基が Ca との結合を妨げたためと考えられる（Qian & Jiang 2014）。800℃ではこれらの官能基が分解され、炭酸カルシウムの効果が発現したと推察される。

鶏糞炭では炭化により HCl 抽出画分が増加した（Fig.

5b）。原料では水溶性リン酸の割合が最も高かったが（Robinson & Leinweber 2023）、炭化により大幅に減少した。これは有機結合リンの分解と、水に不溶な HCl 抽出画分の増加（Qian & Jiang 2014, Wang et al. 2015）による。鶏糞原料中のリンは易溶解性の無機およびリン酸やリン酸カルシウムとして存在するが（Wang et al. 2015）、炭化により結晶性の高い金属リン酸鉱物に変換され、HCl 抽出画分が優勢となった。これは、炭化温度に伴う Ca/Mg の沈殿やリン酸カルシウム、アパタイトの形成（Robinson & Leinweber 2023）と一致する。XRD で高い結晶度の方解石が確認されたことも（Fig. 6b）、原料リンや添加炭酸カルシウムの Ca との結合による Ca 結合リン形態の形成を裏付け、HCl 抽出画分の増加に寄与したと考えられる。

4.1.6. 表面結晶構造と植物利用性

植物利用可能なリン酸を評価する上で、2% ギ酸抽出による可給態リン酸の比較は重要である。800℃の未発酵炭が最大の可給態リン酸濃度を示し、逐次抽出実験でも長期利用可能な HCl 抽出リン酸の割合が増加した。炭酸カルシウム混合は HCl 抽出リン酸の割合を増加させたものの、ギ酸抽出リン酸は未処理炭より低かった。これは発酵残渣炭の結晶構造変化が影響したと考えられる。800℃の未発酵炭の XRD 分析では方解石ピークが確認されたが、炭酸カルシウム 20% 混合で石灰のピークが検出された（Fig. 6a）。これは方解石の熱分解（式 1）によるものであり、550℃付近から分解が始まり、1027℃で酸化カルシウムに結晶化する（石澤 2013）。



また、800℃ではトリディマイトのピークが観察され、これは 400℃と 600℃で見られた石英が転移したと考えられる。CaO はトリディマイト化を促進する鉱化剤として知られ（鈴木 & 荒堀 1981）、CaCO₃ 添加により転移温度以下で結晶化したと考えられる。炭酸カルシウム混合比の増加は発酵残渣炭の結晶度を高め、より安定な形態への移行がギ酸による抽出を抑制したと考えられる。

可給態リン酸濃度が高く、炭酸カルシウム混合の効果が
見られ、石灰のピークがなく比較的結晶度の低い 800℃
発酵残渣炭の炭酸カルシウム混合 0 ~ 5% が、長期
植物利用可能なリン酸肥料代替バイオ炭として有望であ
る。

4.2. 酢酸カリウム処理バイオ炭

4.2.1. 水溶性リン酸、可給態リン酸

先行研究では炭化温度と酢酸カリウム混合が水溶性
リン酸に影響を与え、特定の条件下でリン酸の可溶化
が促進された。本研究では、発酵残渣に対し 5% の酢
酸カリウムを混合した結果、先行研究と同様、高温炭
化で最大水抽出リン酸が得られた (Fig. 8a)。これは、
揮発性物質の放出とカリウムの保持により、K-P 相互作
用が促進され、溶解性の高いリン酸カリウム形態が形成
されたためと考えられる。特に 700℃炭を用いた先行研
究では K_2HPO_4 の生成が示唆されている。一方、炭酸
カルシウム混合実験では、炭化により難溶性の HCl 抽
出リン酸が増加し、水溶性リン酸は減少した。これは、
動物糞尿由来バイオ炭に存在する結晶性リン酸カルシ
ウムの特性による。可給態リン酸においては、800℃
酢酸カリウム混合炭で有意な増加が見られ、 KH_2PO_4 、
 K_2HPO_4 、 K_3PO_4 などの結晶の生成、あるいは高温で
の KPO_3 の形成が示唆される。また、ギ酸抽出で可給
態リン酸が増加したことから、難水溶性ながら弱酸に可
溶な $CaKPO_4$ の生成も可能性として考えられる。

4.2.2. リン形態と植物利用性

未発酵炭と比較して、800℃において酢酸カリウム混
合は HCl 抽出リン酸の割合を減少させ、NaOH 抽出リ
ン酸と水抽出リン酸の割合を増加させた (Fig. 11a)。こ
れは、XRD の結果 (Fig. 12a) から、リンがカリウムと
結合し低結晶性の易溶性形態に移行したためだと考え
られる。この結果は先行研究とも一致し、800℃酢酸カ
リウム混合炭が即効性リン肥料としての利用を期待させ
る。

一方、鶏糞炭では酢酸カリウム混合によるリン形態の

顕著な変化は見られず、むしろ HCl 抽出リン酸の割合
が増加した (Fig. 11b)。これは、鶏糞炭の Ca 優位な
元素組成により、酢酸カリウムと反応してアルカリ溶液に
不溶な $CaKPO_4$ が生成され、結果的に HCl 抽出リン酸
の溶出量が増加した可能性がある。このため、水溶性
リンの増加は見られず、汚泥や豚糞由来原料を用いた
先行研究とは異なる結果となった。発酵残渣炭では Fe/
Al 含有量が高く NaOH 抽出リン酸への移行が示唆され
るなど、原料の元素組成が酢酸カリウム混合の効果に
影響を与えることが示唆された。

4.3. 栽培実験

アルカリ処理された発酵残渣バイオ炭の添加は土壌
pH を上昇させ、これはバイオ炭の灰分が土壌イオンと
反応しアルカリ種を放出するためである。一方、化学肥
料の硝化作用は水素イオンを放出し土壌 pH を低下させ
る。窒素肥料の併用はバイオ炭による pH 上昇効果を
一部抑制する可能性がある。植物は酸性土壌で優位
な $H_2PO_4^-$ を吸収するが、最適 pH は 6.0 ~ 6.5 である。
バイオ炭添加による pH 上昇は、植物が利用しやすいリ
ン酸の形態を減少させる可能性がある。炭酸カルシウム
処理バイオ炭は未処理バイオ炭と同程度の pH を示す
が、難溶性のリン酸カルシウム生成により可給態リン酸と
植物体吸収リンを低下させる傾向がある。土壌がアルカ
リ性になることで、リン酸の利用可能性が低下する。酢
酸カリウム処理バイオ炭は水溶性の高いリン酸カリウムを
生成し、植物体吸収リンを増加させる可能性がある。
窒素肥料との併用は pH 低下を緩和し、可給態リン酸
を増加させ、植物体吸収リンを大幅に向上させる。鶏
糞由来バイオ炭は高 pH と高塩類濃度により発芽を阻害
することが考えられる。

酢酸カリウム処理の発酵残渣炭は水溶性リン酸を増
加させ、コマツナのリン吸収を化成肥料と同程度に向上
させたが、窒素吸収は大幅に減少した。しかし、N 肥
料を併用することで窒素吸収は化成肥料と同等となり、
コマツナの生育量も回復した。葉物野菜であるコマツナ
栽培においては N 肥料が重要であり、K 発酵炭は N

肥料との併用により化成肥料の代替となる可能性が示唆された。

5. 結論

廃棄物由来原料への炭酸カルシウム処理はリン形態を変化させ、発酵残渣の 800℃処理バイオ炭では Ca 結合リンが増加したが、高混合率で可給態リン酸は減少した。一方、酢酸カリウム処理は可給態リン酸を増加させ、特に発酵残渣の 800℃処理バイオ炭で水溶性リン酸が顕著に増加した。

栽培実験では、バイオ炭添加による pH 上昇が植物体吸収リンに大きな影響を与えず、炭酸カルシウム処理バイオ炭ではリンの難溶化が示唆されたが、酢酸カリウム処理バイオ炭ではリン酸肥料効果が示され、N 肥料との併用でその効果が高まる傾向が見られた。炭酸カルシウム処理は 800℃、0 ～ 5% 混合で緩効性リン肥料、酢酸カリウム処理は 800℃、5% 混合で即効性リン肥料としての利用が期待される。

謝辞

本研究は滋賀県下水汚泥有効利用調査研究の一環であり、滋賀県立大学および琵琶湖流域下水道東北部浄化センターの関係者には、研究試料採取・提供、誘導結合プラズマ質量分析による分析に協力いただきました。八王子市の数馬養鶏場より研究試料採取・提供にご協力いただきました。深く御礼申し上げます。本研究は、一部 JST / JICA 出資の SATREPS-EARTH プロジェクト (JPMJSA2005) の助成金によって援助されましたことに感謝申し上げます。

引用文献

Adhikari S, Gascó G, Méndez A, Surapaneni A, Jegathesan V, Shah K, Paz-Ferreiro J (2019) Influence of pyrolysis parameters on phosphorus fractions of biosolids derived biochar. *Sci Total Environ* 695: 133846.
Buss W, Wurzer C, Bach M, Heberling J, Appel T, Gerber H, Mašek O (2022) Highly efficient phosphorus

recovery from sludge and manure biochars using potassium acetate pre-treatment. *J Environ Manage* 314: 115035.

土壤環境分析法編集委員会 (1997) 土壤環境分析法, 博友社, pp. 195–196, 202–204.

Hass A, Gonzalez JM, Lima IM, Godwin HW, Halvorson JJ, Boyer DG (2012) Chicken manure biochar as liming and nutrient source for acid Appalachian soil. *J Environ Qual* 41: 1096–1106.

石澤 伸夫 (2013) 方解石の熱分解について. 先進セラミック研究センター年報 2: 19–24.

Kuo S (1996) “Phosphorus” *Methods of Soil Analysis Part 3 Chemical Methods* (eds Sparks DL, Page AL, Helmke PA, Loeppert RH, Soltanpour PN, Tabatabai A, Johnston CT, Sumner ME). Soil Science Society of America, Wiley, New Jersey, pp. 869–919.

Liu Q, Fang Z, Liu Y, Liu Y, Xu Y, Ruan X, Zhang X, Cao W (2019) Phosphorus speciation and bioavailability of sewage sludge derived biochar amended with CaO. *Waste Manage* 87: 71–77.

Lu S, Sheng Q, Wang J, Yuan S, Dong B, Xu Z (2023) A combination of conventional extraction and advanced analytical techniques afford a comprehensive understanding of phosphorus distribution and transformation in sewage sludge biochars. *Chem Eng J* 477: 146954.

Manogaran MD, Shamsuddin R, Mohd YMH, Lay M, Siyal AA (2022) A review on treatment processes of chicken manure. *Clean Circ Bioecon* 2: 100013.

Méndez A, Terradillos M, Gascó G (2013) Physicochemical and agronomic properties of biochar from sewage sludge pyrolysed at different temperatures. *J Anal Appl Pyrol* 102: 124–130.

Nan H, Yang F, Li D, Cao X, Xu X, Qiu H, Zhao L (2023) Calcium enhances phosphorus reclamation during biochar formation: Mechanisms and potential application as a phosphorus fertilizer in a paddy soil. *Waste Manage* 162: 83–91.

Qian T-T, Jiang H (2014) Migration of phosphorus in sewage sludge during different thermal treatment processes. *ACS Sustain Chem Eng* 2: 1411–1419.

Rajan SSS, Brown MW, Boyes MK, Upsdell MP (1992) Extractable phosphorus to predict agronomic effectiveness of ground and unground phosphate rocks.

- Fert Res 32: 291–302.
- Rittmann BE, Mayer B, Westerhoff P, Edwards M (2011) Capturing the lost phosphorus. *Chemosphere* 84: 846–853.
- Robinson JS, Leinweber P (2023) Effects of pyrolysis and incineration on the phosphorus fertiliser potential of bio-waste- and plant-based materials. *Waste Manage* 172: 358–367.
- 植物栄養実験法編集委員会 (1990) 植物栄養実験法, 博友社, p. 126.
- Singh B, Dolk MM, Shen Q, Camps-Arbestain M (2017) “Biochar pH, Electrical Conductivity and Liming Potential.” *Biochar: A Guide to Analytical Methods* (eds Singh B, Camps-Arbestain M, Lehmann J). CRC Press, Boca Raton, pp. 23–38.
- 鈴木 隆夫 & 荒堀 忠久 (1981) ケイ石耐火物におけるトリジマイトからクリストバライトへの転移に及ぼす Al_2O_3 の影響. *窯業協会誌* 89: 637–642.
- Wang T, Camps-Arbestain M, Hedley M, Bishop P (2012) Predicting phosphorus bioavailability from high-ash biochars. *Plant Soil* 357: 173–187.
- Wang Y, Lin Y, Chiu PC, Imhoff PT, Guo M (2015) Phosphorus release behaviors of poultry litter biochar as a soil amendment. *Sci Total Environ* 512–513: 454–463.
- Xu G, Zhang Y, Shao H, Sun J (2016) Pyrolysis temperature affects phosphorus transformation in biochar: Chemical fractionation and ^{31}P NMR analysis. *Sci Total Environ* 569–570: 65–72.
- Yu B, Luo J, Xie H, Yang H, Chen S, Liu J, Zhang R, Li Y-Y (2021) Species, fractions, and characterization of phosphorus in sewage sludge: A critical review from the perspective of recovery. *Sci Total Environ* 786: 147437.
- Yuan H, Lu T, Huang H, Zhao D, Kobayashi N, Chen Y (2015) Influence of pyrolysis temperature on physical and chemical properties of biochar made from sewage sludge. *J Anal Appl Pyrol* 112: 284–289.
- 財団法人日本土壌協会 (2010) 堆肥等有機物分析法, pp. 53–55.
- Zhang X, Zhao B, Liu H, Zhao Y, Li L (2022) Effects of pyrolysis temperature on biochar’s characteristics and speciation and environmental risks of heavy metals in sewage sludge biochars. *Environ Technol Innov* 26: 102288.
- Zhu Y, Zhao Q, Li D, Li J, Guo W (2023) Enhanced recovery of phosphorus in sewage sludge-derived biochar with CaCO_3 : Phosphorus speciation and slow-release phosphorus behavior. *Sep Purif Technol* 311: 123325.
- Zuo L, Lin R, Shi Q, Xu S (2020) Evaluation of the bio-availability of heavy metals and phosphorus in biochar derived from manure and manure digestate. *Water Air Soil Poll* 231: 553.

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

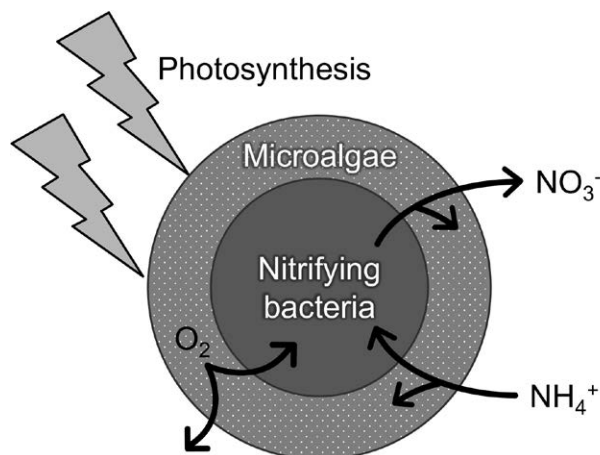


Fig 1. Expected nitrification process in the microalgae-nitrifying bacteria consortium capsule.

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

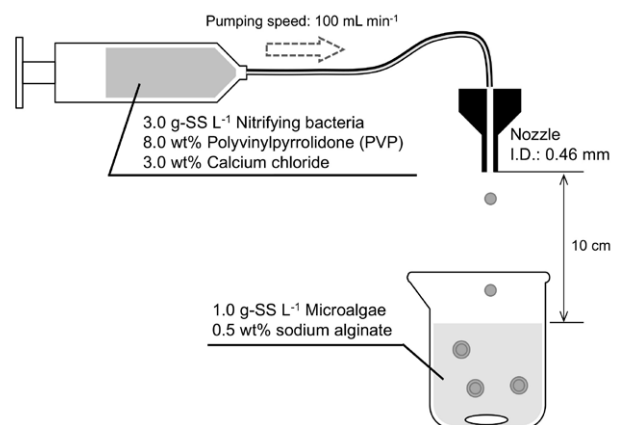


Fig 2. Preparation of microalgae-nitrifying bacteria consortium capsules.

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

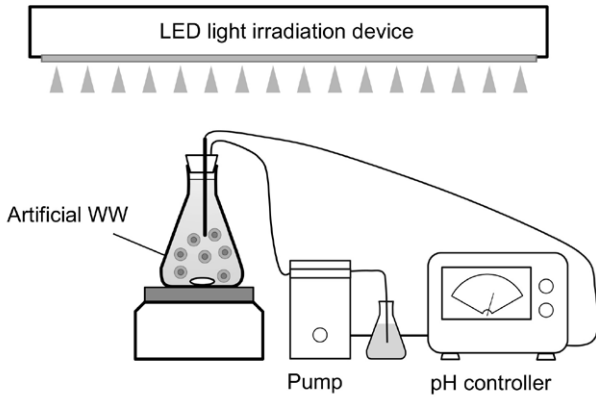


Fig 3. Batch experiments under light irradiation.

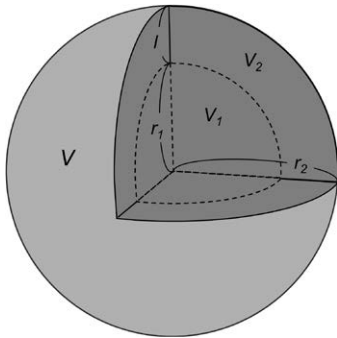


Fig 4. Schematic model for membrane thickness and volume ratio calculations: nitrifiers core with algal shell.

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。

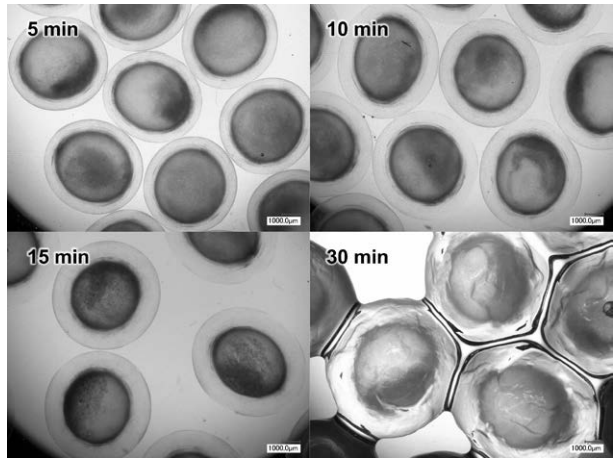


Fig 5. Capsule morphology under varying crosslinking times (5, 10, 15, and 30 min) by digital microscopy.

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

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ことがわかった。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。

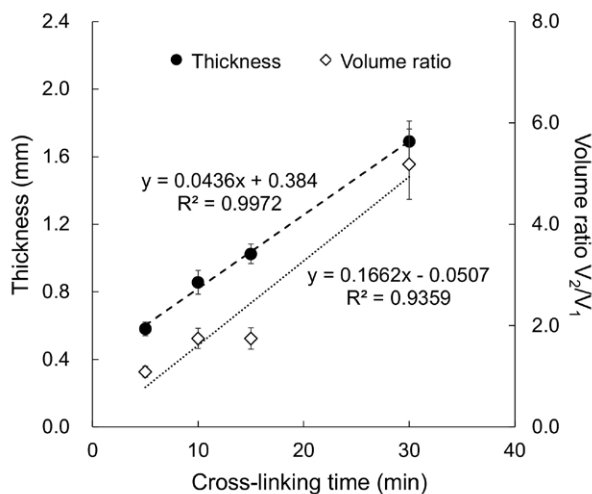


Fig 6. Effect of crosslinking time on capsule shell thickness and volume ratio.

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

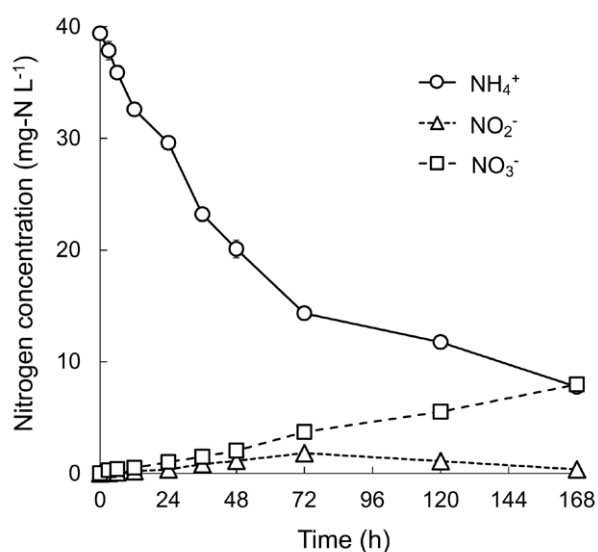


Fig 7. Changes in nitrogen compound concentrations during light irradiation experiment.

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

Effects of short hydraulic retention time on UASB reactor performance inoculated with pre-aggregated anaerobic digestion granular sludge

Mfor E. Agborambang^{1*}, Gemechu Kassaye², Eshetu Getahun^{2,3}, Pranshu Bhatia¹, Masaaki Fujiwara¹, Daiki Maruyama^{1*}, Kanako Kimura¹, Shin-ichi Akizuki⁴, Nigus Gabbiye Habtu^{2,3}, Shinjiro Sato¹, Tatsuki Toda¹

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

2) *Faculty of Chemical and Food Engineering, Bahir Dar Institute of Technology, Bahir Dar University, Bahir Dar, P.O. Box 26, Ethiopia*

3) *Bahir Dar Energy Center, Bahir Dar Technology Institute, Bahir Dar University, Bahir Dar, P.O. Box 26, Ethiopia*

4) *Institute of Plankton Eco-Engineering, Soka University, Hachioji, Tokyo 192-8577, Japan*

* Corresponding author: mfor@soka.ac.jp

Received May 22 2025, Accepted June 17 2025

Abstract Water hyacinth, a high-strength lignocellulosic macrophyte, poses a serious ecological threat by disrupting aquatic ecosystems and hindering water transport. The juice extracted from water hyacinth, commonly known as water hyacinth juice, is particularly rich in soluble organic compounds and has been demonstrated to enhance hydrolysis and acidogenesis rates when used as a substrate in high-rate anaerobic digestion using up-flow anaerobic sludge blanket reactors. The performance of up-flow anaerobic sludge blanket reactors relies heavily on the formation and maintenance of granules. However, a major challenge in the practical implementation of up-flow anaerobic sludge blanket reactors lies in optimizing the operational conditions like hydraulic retention time (HRT), that balance process kinetics, microbial retention, and system stability. Shortening the HRT can improve volumetric biogas production rates and reduce reactor footprint by utilizing more substrate volume, but it can also disrupt microbial stratification leading to biomass washout and process instability. The use of pre-aggregated anaerobic digestion granules, rich in mature methanogens, has been suggested as a viable strategy to mitigate washout under high loading conditions. This study investigated the effectiveness of up-flow anaerobic sludge blanket reactors for high-rate anaerobic digestion of water hyacinth juice at shortened HRTs, using pre-aggregated anaerobic digestion granular sludge as inoculum. The experiments were conducted in a 430 mL up-flow anaerobic sludge blanket reactors operating for 107 days, at four different HRTs, (2, 1.5, 1.0, and 0.5 days). Despite the high suspended solids concentration of water hyacinth juice ($3.3 \pm 0.7 \text{ g L}^{-1}$) and increasing organic loading rates at shorter HRTs, the reactor maintained consistent stability and performance. The total organic carbon removal efficiencies ranged from 35.3% at the shortest HRT of 0.5 days to 82.1% at HRT = 1.5 days, indicating effective substrate degradation across varying loading conditions. The suspended solids and volatile suspended solids removal efficiencies were $56.9 \pm 14.1\%$ and $74.9 \pm 7.0\%$, respectively,

recorded at HRT = 1.0 day. These results highlight the reactor's ability to retain and degrade particulate matter despite short retention times. The Biogas production rates increased significantly with decreasing HRTs, from $201.1 \pm 37.4 \text{ mL d}^{-1}$ at HRT = 2 days to a peak of $903.8 \pm 307.2 \text{ mL d}^{-1}$ at HRT = 0.5 days, with methane content consistently above 79%. The maximum SS removal of $56.9 \pm 14.1\%$ was achieved at HRT = 1 while the highest biogas production rate ($903.8 \pm 307.2 \text{ mL d}^{-1}$) was achieved at HRT = 0.5 days. This study demonstrates that the up-flow anaerobic sludge blanket reactors inoculated with pre-aggregated anaerobic digestion granular sludge can effectively treat high-strength lignocellulosic substrates such as water hyacinth juice under high loading conditions. Even at extremely short HRTs, the system maintained stable removal efficiency and robust biogas production, showcasing its potential for efficient valorization of invasive aquatic biomass. These findings support the deployment of the up-flow anaerobic sludge blanket reactor as a viable technology for the dual purpose of environmental management and renewable energy generation, particularly in regions plagued by water hyacinth overgrowth.

Keywords: UASB reactor, hydraulic retention time, anaerobic digestion, granular sludge, biogas production rate, organic loading rate

1. Introduction

In the pursuit of sustainable energy solutions, anaerobic digestion (AD) has emerged as a robust and environmentally friendly biotechnology for the stabilization of organic waste while also producing biogas, primarily methane (Appels et al. 2008, Weiland 2010). Among the variety of biomass resources investigated for anaerobic digestion (AD), aquatic macrophytes particularly water hyacinth (WH), (*Eichhornia crassipes*) have garnered significant attention due to their rapid growth, high photosynthetic efficiency, and ability to absorb excess nutrients and heavy metals from water bodies (Gunnarsson & Petersen 2007, Malik 2007, Kitaka et al. 2022). WH has infested over 100 countries, making it one of the world's most destructive and aggressively reproductive aquatic weeds. Notably, it is estimated that just 10 plants can produce over 600,000 offspring in a single growing season (Lahon et al. 2023), highlighting their extraordinary proliferation potential.

While water hyacinth (WH) poses a serious ecological threat by disrupting aquatic ecosystems and hindering water transport (Bhatia et al. 2025), its removal and subsequent valorization through AD presents a promising strategy for biomass management and renewable energy recovery (Nigam 2002, Kashyap et al. 2003). Although WH is a high-strength lignocellulosic macrophyte, it also contains a significant proportion of biodegradable components such as cellulose, hemicellulose, and soluble sugars, making it a suitable substrate for AD (Kushwaha et al. 2020). The juice extracted from WH, commonly known as WH juice (WHJ) is particularly rich in soluble organic compounds and has been demonstrated to enhance hydrolysis and acidogenesis rates when used as a substrate in high-rate anaerobic digestion (Singh et al. 2023, Bhatia et al. 2025). However, its effective bioconversion depends largely on reactor configuration and operational parameters, among which hydraulic retention time (HRT) plays a pivotal role (Bhatia et al. 2025).

The up-flow Anaerobic Sludge Blanket (UASB) reactor,

originally developed by Lettinga et al. (1970), represents a landmark innovation in anaerobic treatment technology. The UASB system is characterized by the development and accumulation of dense microbial granules that settle well and support high biomass retention, thereby allowing for elevated organic loading rates and shorter HRTs (van Lier et al. 2001, Hulshoff Pol et al. 2004). The performance of UASB reactors relies heavily on the formation and maintenance of these anaerobic granules, which are complex consortia of microbial communities embedded in a matrix of extracellular polymeric substances (EPS) (Barros et al. 2007, Fang et al. 2011). These granules facilitate efficient syntrophic interactions between acidogens, acetogens, and methanogens, promoting process stability and biogas yield (Fang et al. 2011).

A major challenge in the practical implementation of UASB reactors lies in optimizing the operational conditions that balance process kinetics, microbial retention, and system stability. HRT, defined as the average time the substrate remains in the reactor, directly influences the washout rate of slow-growing methanogenic archaea and the contact time between substrate and biomass (Seghezze et al. 1998). Shortening HRT can improve volumetric biogas production rates and reduce reactor footprint by utilizing more substrate volume, but it can also disrupt microbial stratification and granule integrity, leading to biomass washout and process instability (Lettinga 1995, Liu & Tay 2004).

Previous studies have shown that operating UASB reactors at shorter HRTs can yield promising results when conditions are carefully managed. For instance, Jiraprasertwong et al. (2020) demonstrated that a three-stage UASB reactor treating ethanol wastewater achieved high methanogenic activity and stable performance at low HRTs due to the presence of mature granular sludge. Similarly, Sarti et al. (2017) highlighted that granule

characteristics such as size, density, and EPS composition significantly determine the system's ability to withstand hydraulic and organic shocks. The use of pre-aggregated AD granules, rich in mature methanogens, has been suggested as a viable strategy to mitigate washout under high loading conditions (Hulshoff et al. 2004).

Despite these advances, the literature still lacks systematic investigations into the performance of UASB reactors inoculated with pre-aggregated granular sludge and operated at reduced HRTs using lignocellulosic-rich feedstocks such as WHJ. While several researchers have studied the effect of pretreatment techniques on WH to improve biodegradability (Hendriks & Zeeman 2009, Kushwaha et al. 2020), there are limited studies on how such substrates interact with granular sludge under short retention times.

This study builds on previous own findings by evaluating the effect of short HRTs (ranging from 0.5 to 2 days) on the performance of a lab-scale UASB reactor fed with WHJ and inoculated with pre-aggregated AD granular sludge. The objective is to elucidate the relationship between shortened HRT, organic matter removal, and biogas productivity under high OLRs. In doing so, this research aims to provide deeper insight into the operational thresholds of UASB systems for high-rate treatment of plant-based substrates.

2. Materials and Methods

2.1. Substrate and inoculum preparation

WH plants were harvested from a pond in Suijo Park, Saitama, Japan (same sampling site reported in our previous study (Bhatia et al. 2025)). The whole plant (including leaves, stem and roots) was then shredded and compressed using a milling machine (RSC-3500, R-ing Co. Ltd., Japan) and a screw dewatering machine (Dash-1, R-ing Co. Ltd., Japan),

respectively to obtain the WHJ. WHJ was then filtered through a $106\ \mu\text{m}$ mesh; thereafter, the juice was stored at $4\ ^\circ\text{C}$ and used as a substrate for AD. Bhatia et al. (2025) reported the chemical parameters and the ions concentration of WHJ as shown in Table 1. In this study, the pre-aggregated anaerobic

digestion granular sludge obtained from our previous study on UASB treating WHJ (Bhatia et al. 2025) was used as an inoculum. The sludge was then stored in a temperature-controlled room at $37\ ^\circ\text{C}$ for a few days to remove residual organic compounds from the sludge.

Table 1. The chemical composition of WHJ reported in our previous study (Bhatia et al. 2025). The harvested site was the same with the current study, but the harvesting season differed.

Parameters	Measurements
pH	5.0 ± 0.7
Suspended solids (SS)	6.1 ± 2.0
Volatile suspended solids (VSS)	4.3 ± 1.5
Chemical oxygen demand (COD)	10616.9 ± 2068.8
Total organic carbon (TOC)	4210.5 ± 1467.7
Total nitrogen (TN)	512.8 ± 156.1
Dissolved organic carbon (DOC)	1411.4 ± 220.3
Dissolved nitrogen (DN)	103.6 ± 44.4

All parameters were measured in mg L^{-1} except pH.

2.2. Reactor set up and operation

A 430-mL lab-scale UASB reactor was used in this study. Fig. 1 shows the schematic representation of a UASB reactor used for WHJ treatment. Primarily 430 mL of inoculum was introduced into the reactor. The substrate was then fed continuously into the reactor's bottom inlet throughout the HRT of 2.0 to 0.5 days (Table 2). The substrate was then diffused into the reactor using inert alumina beads (diameter =10 mm) for homogeneous supply. The resulting effluent passed through a U-shaped pipe attached to the reactor's upper part before proceeding to an effluent (digestate) storage tank (Fig. 1). On day 53, the sampling point was changed from 1 to 2 (Fig. 2a) to avoid significant

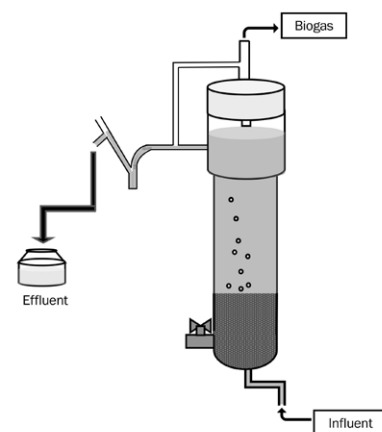


Fig 1. Schematic representation of a UASB reactor used for WHJ treatment. Influent flows upward through a sludge blanket, producing biogas and treated effluent through microbial degradation.

SS accumulation in sampling point 1, as at point 2, the SS concentration was comparable to the SS in the reactor (Fig. 2b). The volume of biogas produced was determined using a wet gas meter (W-NK-0.5B,

Shinagawa, Japan) and kept in a 5 L aluminum gas bag (GL Science, Japan). The reactor operated at $37 \pm 1^\circ \text{C}$ in a temperature-controlled laboratory for 107 days.

Table 2. Loading parameters during each phase of anaerobic digestion.

Phase	Period (day)	Assuming HRT (day)	Actual HRT (day)	Average OLR (g-TOC L ⁻¹ d ⁻¹)
Phase 1	0 - 16	2.0	2.1 ± 0.1	1.1 ± 0.1
Phase 2	17 - 70	1.5	1.6 ± 0.3	1.3 ± 0.2
Phase 3	71 - 86	1.0	1.0 ± 0.1	2.1 ± 0.1
Phase 4	87 - 107	0.5	0.5 ± 0.4	3.2 ± 0.1

HRT: Hydraulic retention time; TOC: Total organic carbon; OLR: Organic loading rate.

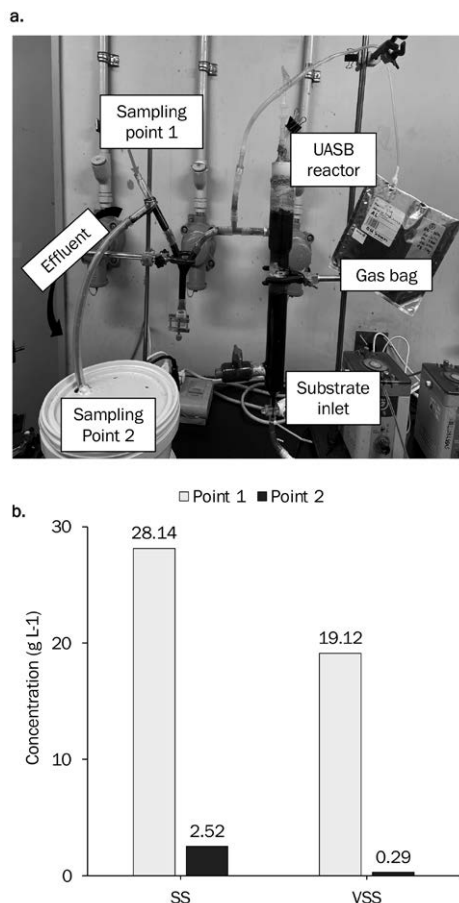


Fig 2. Actual representation of a UASB system used for WHJ treatment in this study (a), and SS and VSS concentration measured at different sampling points (b). The sampling point was shifted from point 1 to 2 on day 51.

2.3. Analytical methods

The pH, suspended solids (SS), volatile suspended solids (VSS), total organic carbon (TOC) and total nitrogen (TN) of the substrate and effluent were measured during the experimental period. The pH was measured with a pH meter (SevenCompact pH/Ion meter, S220, Mettler Toledo, Japan), and TSS, VSS, and TS, were determined by the standard methods of the American Public Health Association (Bhatia et al. 2025). TOC and TN were measured using a TOC analyzer equipped with nitrogen measurement (TOC-L CPH/CPN, TNM-L, Shimadzu, Japan). The biogas composition in the aluminum gas bag was measured using a gas chromatograph (GC-14B, Shimadzu, Japan) equipped with a packed column (Micropacked-ST, Shimadzu, Japan) and a thermal conductivity detector. The injector and detector temperatures were maintained at 100°C and 200°C, respectively. Argon was used as the carrier gas at a flow rate of 10 mL min⁻¹.

3. Results and Discussion

3.1. Reactor performance

The WHJ used in this study had the same sampling site as WHJ reported in our previous study (Bhatia et al. 2025) although the harvesting season differed (Table 1). The pH of WHJ used in previous studies varied depending on the plant's habitat or growing conditions, with ground-type WHJ having a pH of 4.02 and floating-type WHJ ranging from 7.0 to 7.5 (Liu et al. 2021, Maruyama et al. 2023). In this study, floating-type WHJ was used, and its juice exhibited an average pH of 5.9 ± 0.8 throughout the experimental period. Notably, despite fluctuations in influent pH within the range of 5.1 to 7.5, no significant impact was observed on the effluent pH, which remained within the neutral to mild alkaline range (7.3 to 8.8) as shown in Fig. 3. The average effluent pH was 7.7 ± 0.2 and the pH at HRTs 2, 1.5, 1 and 0.5 were 7.9 ± 0.3 , 8.0 ± 0.4 , 7.7 ± 0.3 , and 8.0 ± 0.4 , respectively. Recent studies have identified that the pH regime for methanogenic bacteria falls within the range of 7.2 to 8.8 (Antwi et al. 2017). Despite the fluctuations in HRT and OLR, the effluent pH remained within the optimal range.

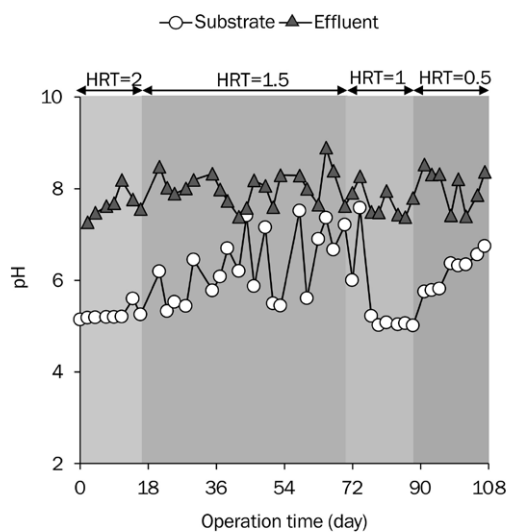


Fig 3. pH variation within the timeline of anaerobic digestion treatment process

The observed pH stability suggests that the AD process in this study demonstrated strong operational resilience, maintaining consistent performance even under high OLR (HRT 0.5). However, variations in substrate pH may still influence other operational parameters of the UASB system (Bhatia et al. 2025).

The effective removal of SS and VSS is essential for the optimal operation of a UASB reactor, as it minimizes the risk of clogging, floating and washout of active biomass (Mohan et al. 2022). As mentioned in the materials and methods section, the sampling point for effluent SS and VSS was shifted from point 1 to 2 (Fig. 2a) on day 51 due to high accumulation of SS observed in point 1 (Fig. 2b). The accumulation of SS and VSS in point 1 could be attributed to the small diameter of the U-tube. Therefore, the effluent SS and VSS measurements were considered for comparison after day 51. Fig. 4 depicts the timeline of SS and VSS throughout the operational period. The average SS concentration of the influent and effluent was $3.3 \pm 0.7 \text{ g L}^{-1}$ and $1.8 \pm 0.8 \text{ g L}^{-1}$, respectively (Fig. 4a). The average VSS concentration of influent and effluent was $2.1 \pm 0.5 \text{ g L}^{-1}$ and $0.8 \pm 0.6 \text{ g L}^{-1}$, respectively (Fig. 4b). Previous studies have shown that UASB reactors are typically designed for the treatment of liquid substrates, such as industrial and municipal wastewaters, which generally fall within an SS concentration range of 0.17 to 1.80 g L^{-1} (Turkdogan-Aydinol et al. 2011). In contrast, WHJ used in this study exhibited significantly higher SS concentrations, with influent values ranging from 1.4 to 5.2 g L^{-1} . Despite this high SS load, even under low HRT of 0.5, the reactor achieved an average SS and VSS removal efficiency of $51.6 \pm 18.6\%$ and $67.8 \pm 21.8\%$, respectively, over the operational period. This level of performance reflects the reactor's strong resilience and capacity to operate effectively under high solids loading conditions. The react SS and VSS removal rate at HRT

1.5, 1 and 0.5 was 55.3 ± 19.2 and 74.0 ± 18.2 , 56.9 ± 14.1 and 74.9 ± 7.0 , and 38.3 ± 17.7 and 51.4 ± 25.1 , respectively (Table 3). The lower SS and VSS removal rates observed at HRT 0.5 might be attributed not only to excessive organic and solids loading, but also to reduced biomass-substrate contact time, hydraulic overloading that hindered solid retention, increased turbulence leading to resuspension of settled solids (Liu et al. 2008, Rajagopal et al. 2013).

Notably, there was no sludge floating observed in this study even at high OLR load (HRT 0.5) as reported in previous studies (Liu et al. 2020, Jeganathan et al. 2006). This might be due to the compact and porous structure of granules (from granular sludge) which allows them to

trap suspended particles as the influent passes through the sludge bed (Lettinga et al. 1980).

TOC and TN are critical indicators of the organic and nitrogenous load of the substrate, and their removal efficiency reflects the reactor's capacity for simultaneous carbon and nitrogen stabilization (Tchobanoglous et al. 2003). The TOC and TN concentrations in the influent and effluent exhibited similar trends as shown in Fig. 5a and 5b, respectively. The average TOC and TN concentrations of influent were 2060.2 ± 160.2 mg L⁻¹ and 15.0 ± 0.7 mg L⁻¹, respectively. Conversely, the TOC and TN concentration in the effluent was higher than the influent from day 2 to day 51, with an average concentration of 2187.4 ± 2651.5 mg L⁻¹ and

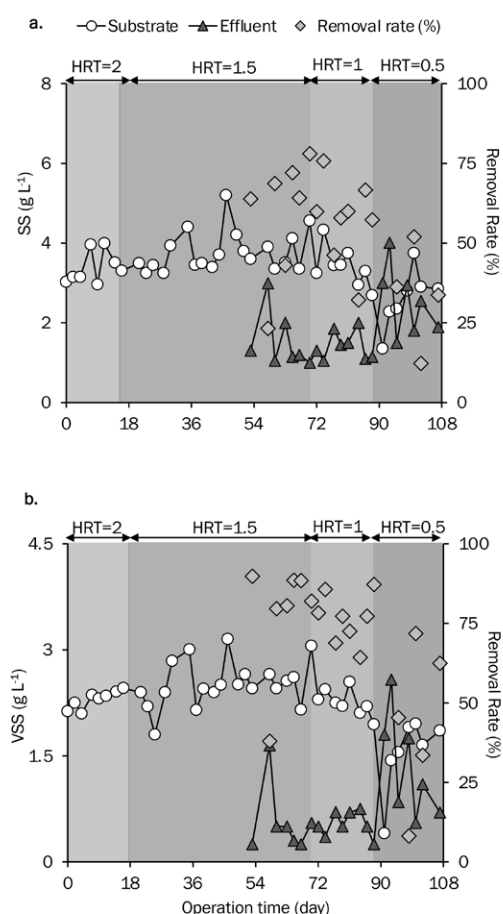


Fig 4. Timeline of anaerobic digestion process performance. (a) SS and its removal variation and, (b) VSS and its removal variations.

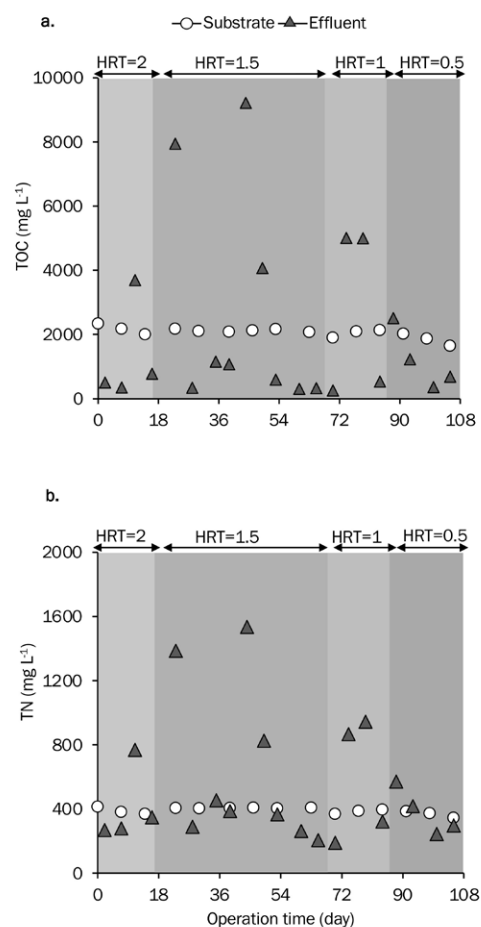


Fig 5. Timeline of anaerobic digestion process performance. (a) TOC concentration (b) TN concentration.

533.5 \pm 383.0 mg L⁻¹, respectively. The high effluent concentration of TOC is attributed to the excess accumulation of SS at sampling point 1 (Fig. 2a). After the sampling point shifted to point 2, there was a notable reduction in effluent TOC and TN concentrations observed (1528.9 \pm 1833.5 mg L⁻¹ and 424.9 \pm 260.2 mg L⁻¹, respectively). This shift highlights the importance of accurate sampling location in evaluating reactor performance, as emphasized by Latif et al. (2011), who noted that sedimentation dynamics in UASB reactors could substantially influence effluent quality measurements. In general, the TOC concentration in the effluent fluctuated (day 2 to day 51) and increased as the HRT decreased. However, the TOC removal efficiency remained relatively high after the sampling point was shifted to point 2, ranging from 35.3% at HRT = 0.5 days to 82.1% at HRT = 1.5 days, demonstrating the system's capacity to manage higher OLR (lower HRT). Findings from Liu et al. (2020) and Lettinga et al. (1980), highlighted that HRT lower than 2 days can hinder complete biodegradation due to limited retention and microbial uptake time, as well as the potential washout of slow-growing microbes such as methanogens. Interestingly, the UASB reactor reported in the present study-maintained system stability even at HRT=1. Show et al. (2012) reported that Granular sludge has a high microbial density and excellent settling properties, which enhance the retention of active biomass even under conditions of high OLR. The system's stability, even at high OLR, highlights the effectiveness of granular sludge in enhancing organic and nitrogenous matter degradation in high-strength substrates.

The evaluation of biogas yield and biogas production rate is widely regarded as a key indicator of methanogenic microbial activity and overall reactor performance during anaerobic digestion (Angelidaki et al. 2011). The biogas yield fluctuated throughout the AD process, with

a slight increase observed as HRT increases (Fig. 6). As shown in Fig. 6, the average biogas production rate increased significantly by decreasing HRT, from 201.1 \pm 37.4 mL d⁻¹ at HRT = 2 to 903.8 \pm 307.2 mL d⁻¹ at HRT = 0.5. This trend is consistent with the findings of Liu et al. (2020), who investigated the long-term energy efficiency and microbial community dynamics of various reactors under increased WHJ loadings. They reported that higher OLR, resulting from shorter HRTs, can stimulate microbial activity, particularly among hydrolytic and acidogenic communities, thereby enhancing the volumetric biogas production. Interestingly, while the biogas production rate varied significantly across different HRTs, the biogas yield remained relatively stable, ranging from 0.8 \pm 0.2 L L-substrate⁻¹ to 1.2 \pm 0.2 L L-substrate⁻¹. In addition, the average methane content was above 80%. These results suggest that substrate conversion efficiency was largely maintained across the different HRTs, highlighting the robustness of the methanogenic community and the stability of the granular sludge (Van Lier et al. 2001, Show et al. 2012). Granular sludge has high microbial density and excellent settling properties which enhance the retention of active biomass under dynamic loading conditions (Tay et al. 2001). This

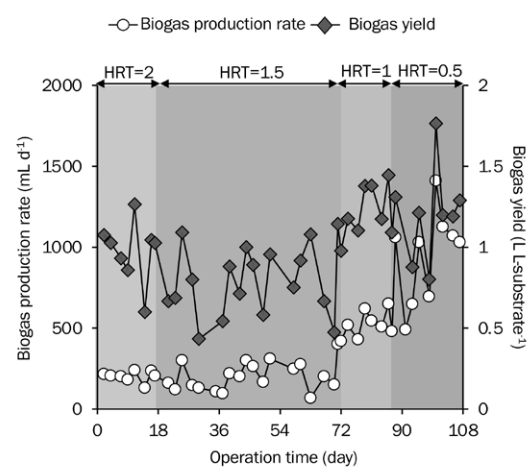


Fig 6. Timeline of anaerobic digestion process performance production rates and Biogas yield

could explain the system's ability to perform well even at reduced HRTs. The reactor performance at HRT = 0.5 days is particularly noteworthy. Although short HRTs are often associated with washout risks and reduced contact time between microbes and substrates (Lettinga et al. 1980), the system in this study maintained a relatively high biogas production rate ($903.8 \pm 307.2 \text{ mL d}^{-1}$) and biogas yield ($1.0 \pm 0.2 \text{ L L-substrate}^{-1}$). In this study, the retention of high biogas production despite an HRT of only 0.5 days suggests that the granular sludge used provided sufficient surface area and structural integrity to immobilize active biomass, enhancing microbial-substrate interactions even under rapid flow conditions (Show et al. 2010). However, a drop in biogas production followed by an increase in pH between days 102 and

107 likely indicates a transient disturbance in reactor performance such as microbial stress under high OLR (HRT=0.5 day). Overall, the reactor demonstrated notable robustness and flexibility, confirming that granular sludge is effective for treating high-rate AD of WHJ even at reduced HRT of 0.5. The ability of the UASB system to maintain process stability and treatment efficiency at HRT=0.5 days attracts further investigation, particularly examining microbial dynamics at different HRTs, granular integrity at long-term operation and a comprehensive carbon mass balance. Such integrated biological approaches would significantly advance our understanding of the fundamental processes governing high-rate anaerobic treatment systems and facilitate their optimization for aquatic biomass utilization.

Table 3. The UASB reactor performance at different HRTs.

Indicators	HRT= 2	HRT=1.5	HRT=1	HRT=0.5	Overall
SS (%)	-	55.3 ± 19.2	56.9 ± 14.1	38.3 ± 17.7	51.6 ± 18.6
VSS (%)	-	74.0 ± 18.2	74.9 ± 07.0	51.4 ± 25.1	67.8 ± 21.8
BPR (mL d^{-1})	201.1 ± 37.4	193.0 ± 74.4	511.4 ± 92.3	903.8 ± 307.2	413.7 ± 331.9
BY (L L^{-1})	1.0 ± 0.2	0.8 ± 0.2	1.2 ± 0.2	1.0 ± 0.2	1.0 ± 0.3

SS: Suspended solids; VSS: Volatile suspended solids; BPR: Biogas production rate; BY: Biogas yield; L L^{-1} : Liter per liter substrate ($\text{L L-substrate}^{-1}$).

4. Conclusion

This study confirms the feasibility and resilience of UASB reactors inoculated with pre-aggregated AD granular sludge for high-rate AD of WHJ at short HRTs. Despite the high OLR (1.1 ± 0.1 - $3.2 \pm 0.1 \text{ g-TOC L}^{-1}\text{d}^{-1}$), findings from this study revealed that even at an HRT as low as 0.5, the UASB system maintained process stability and treatment efficiency. The reactor achieved consistent TOC removal ranging from 35.3% (at HRT = 0.5 days) to 82.1% (at HRT = 1.5 days), while SS and VSS removal reached up to $56.9 \pm 14.1\%$ and $74.9 \pm$

7.0% , respectively. Across all HRTs, the methane content surpassed 79%. In this study, HRT=1 gives a maximum SS and VSS removal of $56.9 \pm 14.1\%$ and $74.9 \pm 7.0\%$, respectively while HRT=0.5 yields a maximum biogas production of $903.8 \pm 307.2 \text{ mL d}^{-1}$. The use of pre-aggregated AD granular sludge effectively mitigated common issues such as biomass washout and reactor instability under short HRTs. However, it is important to develop new methods to facilitate high removal efficiency of SS at high OLR (HRT=0.5). These findings support the advancement of compact, efficient, and scalable anaerobic digestion technologies for biomass valoriza-

tion and renewable energy generation.

Acknowledgements

We gratefully acknowledge Japan Science and Technology Agency (JST)/Japan International Cooperation Agency (JICA), Science and Technology Research Partnership for Sustainable Development (SATREPS) through the project for Eco-Engineering for Agricultural Revitalization toward Improvement of Human Nutrition (EARTH): Water Hyacinth to Energy and Agricultural Crops (grant number: JPMJSA 2005) for funding this research. We would like to thank Gyoda City office, Saitama, Japan for assisting us in harvesting water hyacinth to be used in this study. We would also like to acknowledge Hokubu Sludge Treatment Centre, Yokohama, Japan for providing digested sludge used in this experiment.

References

- Angelidaki I, Treu L, Tsapekos P, Luo G, Campanaro S, Wenzel H, Kougias PG (2018) Biogas upgrading and utilization: Current status and perspectives. *Biotechnology Advances* 36: 452–466.
- Antwi P, Li J, Boadi PO, Meng J, Koblah Quashie F, Wang X, Ren N, Buelna G (2017) Efficiency of an upflow anaerobic sludge blanket reactor treating potato starch processing wastewater and related process kinetics, functional microbial community and sludge morphology. *Bioresource Technology* 239: 105–116.
- Appels L, Baeyens J, Degève J, Dewil R (2008) Principles and potential of the anaerobic digestion of waste-activated sludge. *Progress in Energy and Combustion Science* 34: 755–781.
- Barros AR, Silva EL, Campos JR (2007) Evaluation of the performance of a UASB reactor treating wastewater with high sulfate content. *Journal of Environmental Management* 85: 887–894.
- Bhatia P, Fujiwara M, Akizuki S, Maruyama D, Habtu NG, Sato S, Toda T (2025) High-rate anaerobic digestion of water hyacinth juice in an upflow anaerobic sludge blanket reactor with observations on granule formation. *Journal of Water Process Engineering* 72: 107339.
- Fang HHP, Liu H (2002) Effect of pH on hydrogen production from glucose by a mixed culture. *Bioresource Technology* 82: 87–93.
- Hendriks ATWM, Zeeman G (2009) Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology* 100: 10–18.
- Hulshoff Pol LW, de Castro Lopes SI, Lettinga G, Lens PNL (2004) Anaerobic sludge granulation. *Water Research* 38: 1376–1389.
- Jeganathan J, Nakhla G, Bassi A (2006) Long-term performance of high-rate anaerobic reactors for the treatment of oily wastewater. *Environmental Science and Technology* 40: 6466–6472.
- Jiraprasertwong A, Seneesrisakul K, Pornmai K, Chavadej S (2020) High methanogenic activity of a three-stage UASB in relation to the granular sludge formation. *Science of The Total Environment* 724: 138145.
- Kaneda A (2020) Nutrient Characteristics and Methane Production of the Liquid Fraction from Compressed Water Hyacinth (ホテイアオイ圧搾処理における前処理、破碎法 および圧力が搾汁液の成分特性とメタン生成量に与える影響). Master Thesis (In Japanese).
- Kashyap DR, Dadhich KS, Goyal S (2003) Biomethanation under psychrophilic conditions: A review. *Bioresource Technology* 87: 147–153.
- Kitaka N, M'Erimba C, Njiru M (2022) Utilization of water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) for biogas production: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 154: 111789.

- Kushwaha SK, Saini R, Singh RP (2020) Pretreatment of water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) biomass for enhanced biogas production. *Renewable Energy* 145: 1235–1245.
- Lahon K, Deka D, Deka S (2023) Growth dynamics and reproductive potential of water hyacinth (*Eichhornia crassipes*): Implications for management. *Aquatic Botany* 181: 103567.
- Latif MA, Ghufuran R, Wahid ZA, Ahmad A (2011) Integrated application of upflow anaerobic sludge blanket reactor for the treatment of wastewaters. *African Journal of Biotechnology* 10: 14562–14578.
- Lettinga G (1995) Anaerobic digestion and wastewater treatment systems. *Antonie van Leeuwenhoek* 67: 3–28.
- Lettinga G, Hobma SW, Klapwijk A (1980) Use of the upflow sludge blanket (USB) reactor concept for biological wastewater treatment. *Biotechnology and Bioengineering* 22: 699–734.
- Liu Y, Xu HL, Yang SF, Tay JH (2008) Mechanisms and models for anaerobic granulation in upflow anaerobic sludge blanket reactors. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology* 2: 123–137.
- Liu Y, Tay JH (2004) State of the art of biogranulation technology for wastewater treatment. *Biotechnology Advances* 22: 533–563.
- Liu J, Wang C, Wu K, Tang Z, Peng S, Huang J, Li F, Zhao X, Yin F, Yang B, Liu J, Yang H, Zhang W (2020) Comparison of long-term energy efficiency and microbial community dynamics of different reactors in response to increased loadings of water hyacinth juice. *Science of The Total Environment* 744: 140812.
- Malik A (2007) Environmental challenge vis a vis opportunity: The case of water hyacinth. *Environment International* 33: 122–138.
- Maruyama D, Akizuki S, Sekine M, Fujita A, Habtu NG, Sato S, Toda T (2023) Enhancement of water hyacinth juice treatment in an anaerobic sequential batch reactor with coffee husk-derived biochar. *Bioenergy Research* 16: 2168–2177.
- Mohan SM, Swathi T (2021) A review on upflow anaerobic sludge blanket reactor: Factors affecting performance, modification of configuration and its derivatives. *Water Environment Research* 94: e1665.
- Nigam JN (2002) Bioconversion of water-hyacinth (*Eichhornia crassipes*) hemicellulose acid hydrolysate to motor fuel ethanol by xylose-fermenting yeast. *Journal of Biotechnology* 97: 107–116.
- Park JW, Kim SY, Noh JH, Bae YH, Lee JW, Maeng SK (2022) A shift from chemical oxygen demand to total organic carbon for stringent industrial wastewater regulations: utilization of organic matter characteristics. *Journal of Environmental Management* 305:114412.
- Rajagopal R, Masse DI, Singh G (2013) A critical review on inhibition of anaerobic digestion process by excess ammonia. *Bioresource Technology* 143: 632–641.
- Sarti A, Zaiat M, Foresti E (2017) Granular sludge formation and characteristics in UASB reactors treating domestic sewage. *Environmental Technology* 38: 293–301.
- Seghezzo L, Zeeman G, Van Lier JB, Hamelers HVM, Lettinga G (1998) A review: the anaerobic treatment of sewage in UASB and EGSB reactors. *Bioresource Technology* 65: 175–190.
- Show KY, Lee DJ, Tay JH (2012) Anaerobic granulation: A review. *Advances in Biochemical Engineering/ Biotechnology* 105: 111–145.
- Singh A, Verma P, Kumar S (2023) Enhancement of biogas production from water hyacinth juice using anaerobic digestion. *Bioresource Technology Reports* 21: 100775.
- Tay J, Liu Q, Liu Y (2001) The role of cellular

- polysaccharides in the formation and stability of aerobic granules. *Letters in Applied Microbiology* 33: 222–226.
- Turkdogan-Aydinol FI, Yetilmezsoy K, Comez S, Bayhan, H (2011) Performance evaluation and kinetic modeling of the start-up of a UASB reactor treating municipal wastewater at low temperature. *Bioprocess Biosystems Engineering* 34: 153–162.
- Van Lier JB, Tilche A, Ahring BK, Macarie H, Moletta R, Dohanyos M, Lens P (2001). New perspectives in anaerobic digestion. *Water Science and Technology* 43: 1–18.
- Weiland P (2010) Biogas production: current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology* 85: 849–860.
- .

Impact of impeller rotational speed on sludge velocity distribution in a double helical ribbon reactor: A CFD-based study

Mfor E. Agborambang^{1*}, Gen Satoyoshi¹, Masaaki Fujiwara¹, Pranshu Bhatia¹, Tatsuki Toda^{1,2}, Kouji Yoshida³, Ryosuke Okimune⁴

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

2) Institute of Plankton Eco-Engineering, Soka University, Hachioji, Tokyo 192-8577, Japan

3) Business Development Section, Arsec Bioenergy Inc., Japan,

4) GX Group, Technology Development Promotion Department, Research & Development Institute, Sumitomo Mitsui Construction, Co., Ltd, Tokyo, 104-0033, Japan

* Corresponding author: mfor@soka.ac.jp

Received June 9 2025, Accepted July 17 2025

Abstract This study employs three-dimensional Computational Fluid Dynamics (CFD) simulations to evaluate the influence of impeller rotational speed on sludge velocity distribution, dead zone formation, and overall mixing behavior in a Double Helical Ribbon Impeller (DHRI) reactor. The investigation also explores the scale-up implications of DHRI configuration from laboratory to pilot scale (scale up). CFD simulations were performed using ANSYS Fluent 22R2, where the continuity and Navier-Stokes equations were solved using the finite volume method. A single-phase, non-Newtonian rheological model was applied to simulate high-solid anaerobic digestion sludge with a total solid concentration of 12%. Simulations were conducted for both a 10 L lab-scale reactor and a scaled-up (270 L) reactor at impeller speeds of 50, 100, and 150 rpm. The results indicate that increasing impeller rotational speed significantly enhances sludge distribution, leading to improved mixing efficiency and reduced formation of dead zones. At 50 rpm, 15% of the reactor volume remained poorly mixed, especially in the conical bottom zone. This was significantly reduced to less than 2% at 150 rpm. However, the most effective balance between mixing performance, shear stress, and energy consumption could be considered at 100 rpm. Beyond this threshold, further increasing the rotating speed of the impeller will have almost no effect on mixing performance but rather necessitates shear stress and more energy consumption. The scale-up simulations demonstrated that the hydrodynamic mixing characteristics observed in the laboratory-scale DHRI reactor were largely preserved in the scale up (270 L) reactor. This consistency in flow dynamics across scales can be attributed to the application of geometric similarity and consistent sludge rheology, which might ensure comparable Reynolds numbers between the two configurations. These findings suggest that, unlike many conventional impeller systems which suffer from performance degradation upon scale-up, the DHRI reactor retains its superior mixing capability even at larger volumes. Moreover, the DHRI configuration showed clear advantages over conventional impeller designs reported in previous literature, par-

ticularly in handling high-solids substrates such as chicken manure slurry. Its unique geometry might have promoted strong axial and radial flow components, ensuring uniform sludge distribution throughout the reactor volume, indicating the tendency to minimize sedimentation or scum layer formation. This performance is crucial for enhancing mass transfer, maintaining microbial activity, and supporting stable and efficient biogas production in high-solids anaerobic digestion systems. Overall, this study contributes to the understanding of fluid flow and mixing dynamics in DHRI reactor, offering fundamental insights and practical design guidelines for effective scale-up. It underscores the importance of optimizing impeller speed not only for improved mixing but also for minimizing energy use and mechanical stress. The results affirm that DHRI reactor is a promising design for high-solids anaerobic digestion applications and presents a scalable mixing solution for industrial bioreactor configurations. Future research should incorporate experimental validation and extend investigations to assess the impact of mixing on microbial kinetics and methane yield under varying operational conditions like rpm.

Keywords: computational fluid dynamics, double helical ribbon impeller, high-solids anaerobic digestion, mixing optimization, non-newtonian rheology, scale-up effects

1. Introduction

Mixing is a critical process parameter in the design and operation of anaerobic digesters, particularly in high-solids systems, where inadequate mixing can lead to stratification, scum formation, and localized inhibition due to pH or temperature gradients (Zhou et al. 2019, Li et al. 2022, Agborambang et al. 2022). Efficient mixing enhances mass and heat transfer, ensures uniform distribution of substrates and microbial populations, prevents sedimentation and scum, thereby improving process stability and biogas yield (Singh et al. 2021, Wang et al. 2018). Among various mechanical mixed reactors, the double helical ribbon impeller (DHRI) reactor has emerged as a promising design for processing high solid (like chicken manure slurry), non-Newtonian sludge (Ahmadi et al. 2021, Wang et al. 2018) due to its superior axial mixing capabilities and low shear characteristics (Zhou et al. 2019, Singh et al. 2021). However, a detailed understanding of how impeller rotational speed influences

the mixing behavior and sludge distribution in such systems remains underdeveloped.

Computational Fluid Dynamics (CFD) has become an indispensable tool for evaluating flow patterns and mixing dynamics in anaerobic digesters, offering insight into the hydrodynamic environment without the high costs and limitations of experimental setups (Ahmadi et al. 2021, Li et al. 2022). CFD has been extensively applied to study impeller configurations, mixing times, energy input, scale-up effect and their influence on anaerobic digestion efficiency (Singh et al. 2021, Agborambang et al. 2024). The CFD process typically follows three main stages: pre-processing, where geometry creation and mesh generation occur; processing, which involves defining physics models, numerical parameters, and running calculations until convergence; and post-processing, where results are visualized and analyzed to extract meaningful insights about digesters' hydrodynamic behavior (Fig. 1). Most previous studies have either focused on geometric optimization (Ahmadi et al. 2021) or limited speed

analysis of DHRI reactor (Wang et al. 2018, Singh et al. 2021). There remains a lack of systematic studies that explore how varying the impeller rotational speed in a DHRI reactor influences the mixing pattern, sludge distribution, potential formation of dead zones and scale-up effect on mixing performance. Singh et al. (2021) explored the optimization of mixing regimes in anaerobic digesters using conventional helical ribbon impellers. Their study linked improved mixing to enhanced methane production and emphasized the role of impeller speed in preventing scum formation and sedimentation. However, their CFD analysis was limited to a single impeller speed, leaving open questions about how different rotational speeds may affect sludge homogenization and mixing energy requirements. Similarly, Zhou et al. (2019) addressed the importance of impeller speed and

mixing energy in high-solids anaerobic digestion (HSAD) through a validated CFD study. Their study revealed that insufficient mixing at low speeds led to dead zones and reduced bioreactor efficiency, while excessively high speeds resulted in energy waste without proportional gains in biogas production. These findings underscore the need for a systematic analysis of the relationship between impeller rotational speed and sludge distribution, a gap this study aims to fill.

The current study addresses this research gap by conducting 3D CFD simulations, using a single-phase framework and implementing non-Newtonian rheology. This study aims to evaluate sludge distribution and characterize flow patterns at varying impeller rotational speeds, while also investigating the scale-up effects of DHRI reactor on sludge distribution.

2. Materials and Method

2.1. Reactor Geometry and Discretization

The DHRI reactor was designed and simulated by using ANSYS Workbench, version 22R2 (Agbo-rambang et al. 2024). The schematic diagram of the reactor and impeller, along with their dimensions are shown in Fig. 2a and 2b respectively. The 3D geometry was designed using ANSYS SpaceClaim and the reactor had a working volume of 10 L. Fig. 3a and 3b shows the CFD model of DHRI reactor and impeller structure. The DHRI reactor consisted of two helical blades symmetrically wrapped around a central shaft (Fig. 3b). The bottom of the reactor had a conical shape to ease the removal of sediments like sand and was fully filled with sludge with total solid (TS) concentration of 12% (Wu 2012). The mesh statistics (cells, faces, nodes, quality, etc.) and meshed geometry are presented in Table 1 and Fig. 3c, respectively.

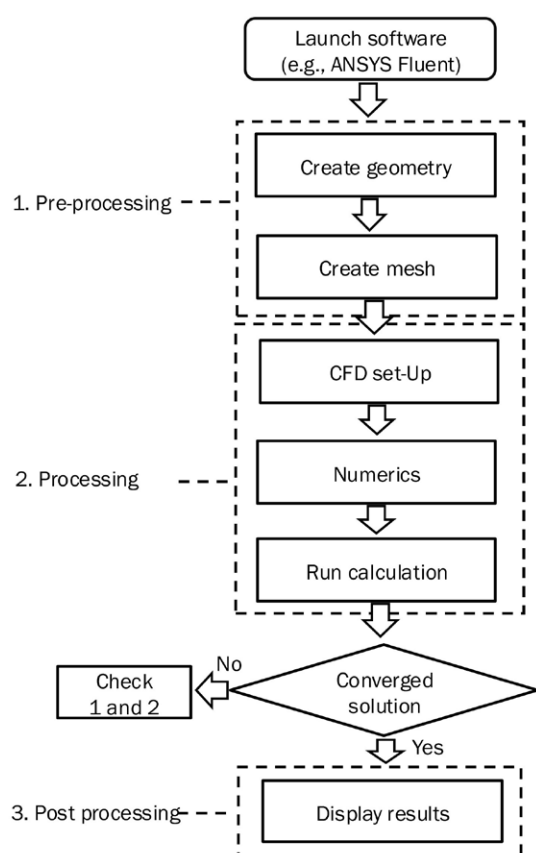


Fig 1. An overview of the procedural steps involved in the computational fluid dynamics (CFD) process.

Table 1. Rheological properties of sludge*

Slurry type	Total solid (%)	Consistency index, K (Pa S ⁿ)	Flow index, n	Share rate, $\dot{\gamma}$ (S ⁻¹)	Density, ρ (Kg/m ³)
Sludge	12	2.4	0.38	0.8-23.9	1063.6

* Rheological properties of sludge was tested at T= 35°C as reported by Wu (2012)

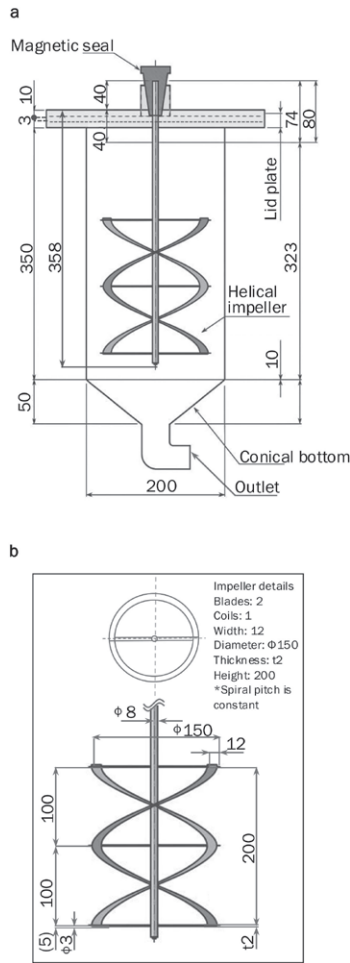


Fig 2. Dimensions of reactor (a) and impeller components (b) in millimeters (mm).

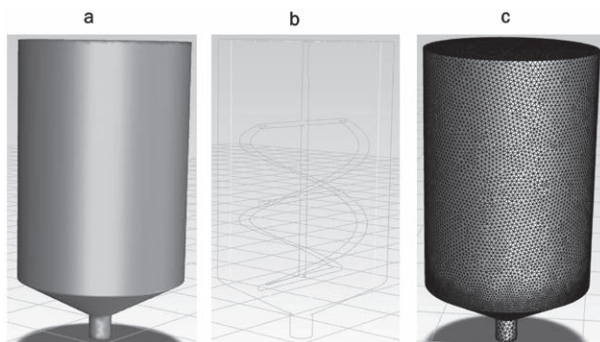


Figure 3. Geometry (a), impeller structure inside geometry (b) and meshed geometry (c).

2.2. Rheological model and definition of dimensionless numbers

This rheology was implemented using a User-Defined Function (UDF) in ANSYS Fluent, version 22R2 to ensure accurate simulation of the fluid behavior across the reactor domain. A mathematical model characterizing mechanical mixing for high solid anaerobic digestion (HSAD) requires differentiation between rheological properties of high-solids materials that exhibit dual liquid and solid behavior. For instance, sand-laden dairy manure has been demonstrated to act like a non-Newtonian liquid below 50% total solids (TS), whereas heavily bedded dairy manure exhibits solid properties at 25% TS (Salehion et al. 2015). The model formulated herein exclusively addresses high-solid materials that maintain liquid characteristics and is predicated upon the following assumptions. (1) The model is a single phase (to reduce the simulation complexity), and mixing in digesters is performed under turbulent flow conditions (2) The sludge is assumed to fill the entire DHRI reactor volume. (3) The digestion temperature is constant at 35oC and (4) Municipal solid waste and sludge exhibit non-Newtonian pseudo-plastic fluid behavior when TS is greater than 2.5% (Wu 2012). The rheology of the sludge used in this study is presented in Table 2. The apparent viscosity (η) and density (ρ) of manure slurry are expressed as (Landry et al. 2004, Wu & Chen

$$n = K\dot{\gamma}^{n-1}e^{T_0/T} \quad (1)$$

$$\rho = 0.0367TS^3 - 2.38TS^2 + 14.6TS + 1000 \quad (2)$$

Table 2. Mesh Statistics of the geometry

Cell type	Total sells	Faces	Nodes	Cell size	skewness
Tetrahedral	543764	1136466	93795	0.006 m	0.23

2008):

where k is the consistency coefficient, $\dot{\gamma}$ the shear rate, n the power-law index, T_0 the reference temperature, T the digestion temperature, and TS is the weight percentage of TS in the sludge.

For mechanical agitation of non-Newtonian fluids,

$$\dot{\gamma} = K_s N \quad (3)$$

Metzner & Otto (1957) proposed a correlation as:

where N is the represents the impeller rotational speed, and K_s is a constant value that is dependent on impeller type. $K_s = 23$ for the helical ribbon impeller as recommended by Ihejirika & Ein-Mozaffari (2007).

Then the Reynolds number (Re) for mechanical agitation of non-Newtonian fluids can be calculated by (Chen

$$Re = \frac{\rho N d^2}{\eta} \quad (4)$$

1981):

where d^2 is the impeller diameter.

2.3. Numerical method and Boundary Condition

The CFD code was based on solving the continuity and the Navier-Stokes equations using a finite volume method. The transport equations are integrated over their own control volume using the hybrid scheme discretization method. Second-order upwind for momentum equations, PRESTO scheme for pressure and SIMPLE scheme for pressure-velocity coupling were selected. Residuals for continuity and momentum $< 1e-4$, and steady-state volume-averaged velocity profile stability were set for convergence criteria (Patankar et al. 1980). The algebraic equation solutions are obtained

in reference to the fundamental study by Douglas et al. (1964). The discretization method and numerical solution procedure used have been described in detail elsewhere (Bouzzgarrou et al. 2009). Non-slip boundary condition was applied at the vessel walls and bottom. Rotational motion was modeled using a rotating reference frame (MRF) approach with rotational speeds of 50, 100, and 150 rpm to examine their effect on sludge distribution. The top surface was treated as a symmetry plane. Pressure-based, transient, turbulent (K-epsilon (2 eqn)). Time step of 0.01 second was selected with a total simulation time of 20 seconds. A scale factor of 3 was applied to the lab-scale DHRI reactor (10 L) to scale-up

$$V' = V k^3 \quad (5)$$

to 270 L by applying geometric scaling law.

Where V is the original volume, V' is the scale-up volume and K is the scaling factor.

Dead zones were defined as regions with velocity magnitudes below 5% of the maximum velocity in the reactor (Sindall et al. 2013).

3. Results and Discussion

3.1. Effect of Impeller Rotational Speed on Velocity Distribution (Lab-scale)

Mixing efficiency was evaluated by tracking the distribution of the sludge zones of DHRI reactor. The velocity contour distributions at different impeller rotational speeds (50, 100, and 150 rpm) are presented in Fig. 4. The color scale represents the fluid velocity magnitude ranging from 0 to 9.63 m s^{-1} . A significant variation in flow patterns and velocity distributions was observed

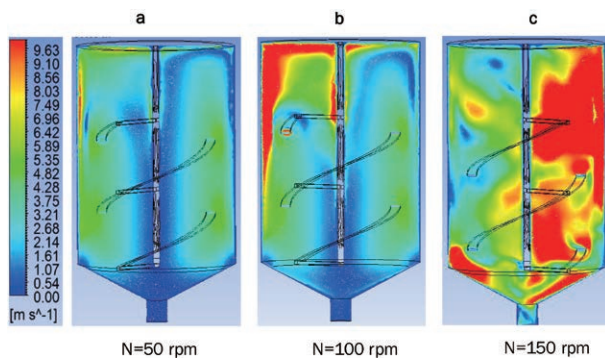


Figure 4. Velocity contours distribution at different impeller rotational speed: N=50 rpm (a), N=100 rpm (b) and N=150 rpm (c) in a lab-scale DHRI reactor. The color scale represents the fluid velocity magnitude (m s^{-1}).

with increasing rotational speeds. At 50 rpm (Fig. 4a), the velocity distribution exhibited a relatively uniform pattern with predominantly low-velocity regions (blue-green) throughout the reactor. The maximum velocity was observed near the impeller blades, but these higher velocity zones did not effectively distribute throughout the reactor volume. This observation aligns with findings by Zhou et al. (2019), who reported that low rotational speeds often fail to generate sufficient momentum for complete mixing in high-solids digesters. The conical bottom region displayed particularly low velocities, suggesting potential for solids accumulation and formation of dead zones, which can negatively impact digester performance (Li et al. 2022). At 100 rpm (Fig. 4b), a substantial increase in velocity magnitude was observed throughout the reactor, with more pronounced high-velocity regions (yellow-red) developing around the impeller and extending further into the bulk fluid. This enhanced momentum transfer led to improved circulation patterns, consistent with observations by Singh et al. (2021), who found that moderate rotational speeds significantly improve sludge homogenization. The helical ribbon design demonstrated its effectiveness by creating both axial and radial flow components, contributing to the reduction of dead zones particularly in the

central reactor region. At 150 rpm (Fig. 4c), the velocity distribution revealed intense mixing with high-velocity regions (red) dominating the upper portion of the reactor and extending deeper into the reactor. The fluid dynamics at this speed showed complex flow patterns with strong recirculation zones. This observation is consistent with that of Ahmadi et al. (2021), who reported that at higher rotational speeds, helical ribbon impellers generate robust axial pumping action that enhances the overall mixing efficiency. However, velocity gradients became more pronounced, with localized high-velocity regions potentially creating excessive shear forces that could be detrimental to sensitive microbial communities (Singh et al. 2021, Agborambang et al. 2024).

3.2. Dead Zone Formation

Dead zones, defined as regions with velocity magnitudes below 5% of the maximum velocity (Sindall et al. 2013), were quantified for each rotational speed. At 50 rpm, dead zones occupied approximately 15% of the reactor volume, primarily concentrated in the conical bottom region and along the impeller shaft. This observation aligns with findings from Li et al. (2022), who reported that low mixing intensities fail to mobilize and uniformly distribute high-concentration slurries. At 100 rpm, dead zones decreased significantly to approximately 9% of reactor volume, while at 150 rpm, they were further reduced to less than 2%. The DHRI reactor configuration demonstrated superior performance compared to conventional impeller designs, as reported in literature. Singh et al. (2021) investigated the effect of mixing intensity on biogas production in a lab-scale single helical ribbon impeller reactor (conventional type) using a CFD approach, with sewage sludge having a low TS concentration of 4.3% (low-solid). They reported the maximum velocity at 67 rpm was recorded as 0.5 ms^{-1} which implies that slightly increas-

ing the sludge TS concentration above 4.3% could result in significant dead zones. While our results on DHRI reactor, with high sludge TS concentration (12%), showed a considerably higher maximum of 9.6 ms^{-1} velocity at 100 rpm. This performance advantage can be attributed to the unique geometry of the DHRI reactor, which creates efficient top-to-bottom circulation patterns essential for processing high-solids substrates (Singh et al. 2021). This study mainly focuses on CFD simulation approach, future studies on validation of CFD results with experimental data could be helpful to verify the efficiency of CFD simulation.

3.3. Effect of Scale-up on Flow Dynamics and Practical implication

The effect of TWF-CDD scale-up on sludge velocity distribution was investigated in this study by applying CFD simulation. The lab-scale DHRI reactor (10 L) was scale-up to 270 L, with a scale factor of 3 applied following geometric scaling law (equation 5). The same geometric configuration, rotational speed (50, 100, and 150 rpm), sludge rheology, boundary and operating conditions were similar to the lab-scale model. Based on the simulation results, the velocity contour distributions, flow pattern and dead zones in the scaled-up DHRI reactor with geometric and impeller rotational speeds (50, 100, and 150 rpm) similarities are illustrated in Fig. 5. Comparison between Fig. 4 and 5 reveals no significant differences in flow patterns and velocity distributions between the lab-scale and scaled-up DHRI reactor. The similarity in velocity sludge velocity distribution between the lab-scale and scale-up DHRI reactor may be attributed to comparable geometric configurations, rotational speed and sludge rheology, which help maintain a consistent Re across both scales (Agborambang et al. 2024).

These findings are consistent with the study by Hu et

al. (2022), who conducted a comprehensive study on the scale-up effects of stirred tank reactors (excluding DHRI reactor) in (HSAD), examining both pilot-scale (14.4 m^3) and full-scale (3888 m^3) configurations. Their investigation employed CFD simulations alongside experimental measurements to assess the hydrodynamic characteristics of the digesters, with a particular focus on the influence of generalized Re and rotational speed. The study concluded that, among geometrically similar reactors, maintaining Re similarity offers greater relevance for scale-up considerations than matching rotational speeds.

The scale-up analysis has significant implications for industrial applications of DHRI reactors in high-solids anaerobic digestion. The results demonstrated that simple geometric scaling with similarities in sludge rheology, rotational speed and operational parameters can maintain the mixing performance in a larger scale reactor. This finding is particularly critical for processing high-solids substrates like chicken manure slurry, where adequate mixing can severely impact process stability and biogas yield (Wang et al. 2018). For industrial implementation, the study recommends employing geometric and sludge rheology (Reynolds number)

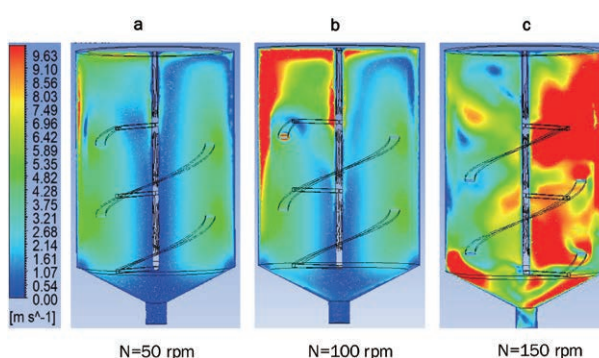


Figure 5. Velocity contours distribution at different impeller rotational speed after scale-up: N=50 rpm (a), N=100 rpm (b) and N=150 rpm (c) in a scale-up DHRI reactor. The color scale represents the fluid velocity magnitude (m s^{-1}).

scaling criterion with computational validation to determine appropriate mixing performance of DHRI reactor. Additionally, the power consumption analysis should be considered to determine the economically viable balance between mixing efficiency and energy expenditure. Overall, the study also revealed that DHRI reactor configurations (lab-scale and scale-up) retain their superior mixing capabilities during scale-up compared to conventional impeller designs. Li et al. (2022) reported that standard impellers suffer from dramatic reduction in mixing efficiency during scale-up, while our results demonstrated that DHRI reactor designs maintain relatively consistent performance across scales, at all rotational speeds tested in this study (50, 100, and 150 rpm).

4. Conclusions

This CFD-based study on sludge mixing in DHRI reactors has provided valuable insights into the effects of impeller rotational speed on mixing behavior and the implications of scale-up on flow dynamics. The key findings can be summarized as follows: (1) Impeller rotational speed significantly influenced velocity distribution and dead zone formation in the DHRI reactor. Optimal mixing performance was achieved at 100 rpm, which provided the best balance between mixing performance, shear stress and power preservation, (2) The DHRI reactor configuration demonstrated superior performance compared to conventional impeller designs reported in literature, with significantly reduced dead zones and improved axial circulation essential for processing high-solids substrates, and (3) Simple geometric scaling with similarities in sludge rheology, rotational speed and operational parameters can maintain consistent mixing performance between laboratory and larger scales. These findings contribute to the fundamental understanding of mixing dynamics in HSAD and pro-

vide practical guidelines for the design and operation of DHRI reactor across different scales (lab-scale = 10 L and scale-up = 270 L). Future research should focus on experimental validation of these computational findings and investigation of the effects of mixing patterns on biogas production and process stability.

Acknowledgement

This study was funded by the by the Ministry of the Environment (MOE) in the “Carbon Neutral Technology Research and Development Program”.

References

- Ahmadi A, Moradi R, Khodadadi M (2021) Experimental and computational fluid dynamic (CFD) studies on mixing characteristics of a modified helical ribbon impeller. *Chemical Engineering Research and Design* 169: 125–134.
- Agborambang ME, Fujiwara M, Bhatia P, Kishi M, Sekine M, Salangsang MCD, Matsuyama T, Toda (2022) Characterization of Mixing by CFD Simulation and Optimization of Mixing Frequency to Break Scum and Enhance Methane Yield in Chinese Dome Digester. *Bioenergy Research* 16: 1902–1912.
- Agborambang ME, Fujiwara M, Sekine M, Bhatia P, Toda T (2024) CFD simulation of the mixing process and performance evaluation of a two-way flow Chinese dome digester. *Biosystems Engineering* 240: 77–89.
- Bouzgarrou S, Khalfet W, Jelali R, (2009) Experimental and numerical studies of power characteristics and mixing time in mechanically agitated vessels. *Journal of Applied Fluid Mechanics* 2: 43–54.
- Chen Z (1981) Studies on the flow of non-Newtonian fluids through agitated vessels. *Chemical Engineering Science* 36: 1247–1256.
- Douglas JF, Gasiorek JM, Swaffield JA (1964) Numer-

- ical analysis of non-Newtonian fluid flow in agitated vessels. *Journal of Fluid Mechanics* 168: 249-271.
- Driss Z, Bouzgarrou G, Chtourou W, Kchaou H, Abid MS (2010) Computational studies of the pitched blade turbines design effect on the stirred tank flow characteristics. *European Journal of Mechanics B/Fluids* 29: 236-245.
- Ihejirika I, Ein-Mozaffari F (2007) Using CFD and ultrasonic velocimetry to study the mixing of pseudoplastic fluids with a helical ribbon impeller. *Chemical Engineering & Technology* 30: 606-614.
- Hu F, Zhang S, Wang X, Wang C, Wu J, Poncin S, Xu L, Xu G, Hu Y, Li HZ (2022) Quantitative hydrodynamic characterization of high solid anaerobic digestion: Correlation of “mixing-fluidity-energy” and scale-up effect. *Bioresource Technology* 344: 126237.
- Landry H, Laguë C, Roberge M (2004) Physical and rheological properties of manure products. *Applied Engineering in Agriculture* 20: 277-288.
- Li Y, Zhang H, Xiao K (2022) Computational and experimental evaluation of mixing regimes in high-solids anaerobic digesters. *Biotechnology & Bioengineering* 119: 2158-2173.
- Metzner AB, Otto RE (1957) Agitation of non-Newtonian fluids. *AIChE Journal* 3: 3-10.
- Patankar SV, Spalding DB (1980) A calculation procedure for heat, mass and momentum transfer in three-dimensional parabolic flows. *International Journal of Heat & Mass Transfer*. 15: 1787-1806.
- Salehiyon AR, Minaei S, Razavi SJ (2015) Rheological properties of sand-laden dairy manure: Modeling by concentration and temperature. *Agricultural Engineering International* 171: 284-292.
- Sindall R, Bridgeman J, Carliell-Marquet C (2013) Velocity gradient as a tool to characterise the link between mixing and biogas production in anaerobic waste digesters. *Water Science & Technology* 67: 2800-2806.
- Singh B, Kovács KL, Bagi Z, Nyári J, Szepesi GL, Petrik M, Siménfalvi Z, Szamosi Z (2021) Enhancing Efficiency of Anaerobic Digestion by Optimization of Mixing Regimes Using Helical Ribbon Impeller. *Fermentation* 7: 251.
- Wang H, Fang M, Fang Z (2018) Effects of impeller rotation speed and rheology on mixing efficiency in high-solids anaerobic digesters. *Waste Management* 78: 100-109.
- Wu B (2010) CFD simulation of mixing in egg-shaped anaerobic digesters. *Water Research* 44: 1507-1519.
- Wu B (2012) Integration of mixing, heat transfer, and biochemical reaction kinetics in anaerobic methane fermentation. *Biotechnology & Bioengineering* 109: 2864-2874.
- Wu B, Chen S (2008) CFD simulation of non-Newtonian fluid flow in anaerobic digesters. *Biotechnology & Bioengineering* 99: 700-711.
- Zhou X, Wu Y, Shi H (2019) Optimizing mixing efficiency of anaerobic digesters with high total solids concentrations using validated CFD simulations. *Bioresource Technology* 286: 121389.

宇宙で動物プランクトンを培養できるのか？ ～微小重力環境下でのカイアシ類の摂餌速度～

高山佳樹^{1*}、秋月真一²

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

Can zooplankton be cultivated in space? ~Ingestion rate of copepods under microgravity environment~

Yoshiki Takayama^{1*}, Shinichi Akizuki²

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

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

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

2025年6月7日受付, 2025年7月13日受理

Abstract For the long-term human habitation planned on the Moon and Mars, efficient recycling and supply of essential life-supporting materials will be crucial. Fish aquaculture has been proposed as a potential source of animal protein in such closed environments. One proposed approach involves utilizing the nutrients in aquaculture wastewater to cultivate microalgae, which serve as feed for zooplankton, which in turn become food for fish. To implement this food chain in a closed space environment, it is critical to determine whether the feed organisms can grow and reproduce normally under microgravity conditions. Previous studies have investigated the swimming behavior of the zooplankton *Daphnia magna* under various gravity conditions using parabolic flight experiments. The present study aims to clarify how microgravity affects the feeding rate—an important factor influencing reproduction and growth—of marine zooplankton. Feeding experiments were conducted using the two marine copepods, *Acartia steueri* and *Tigriopus japonicus*.

Zooplankton samples were collected using a plankton net from Manazuru Port, located in the western part of Sagami Bay. Adult females of *Acartia steueri* were identified and selected for use in the experiments. The microalga *Thalassiosira weissflogii*, cultured in f/2 medium, was used as the food source at concentrations sufficient to saturate the feeding rate. Two treatments were prepared: an experimental group containing both algae and copepods, and a control group containing only algae. These were incubated for 24 hours under two gravity conditions: normal Earth gravity (1 g) and simulated microgravity (1/1000 g, equivalent to that on the International Space Station). Microgravity conditions were simulated using a 3D clinostat, which rotates the sample

in three dimensions to cancel the gravity vector. For the 1 g condition, the containers were kept stationary in an incubator and manually agitated every 4 hours. After incubation, changes in algal cell density were measured and feeding rates were calculated. Additionally, chlorophyll *a* content in the guts of the copepods was extracted using N,N-dimethylformamide and measured.

Adult female *Acartia steueri* and *Tigriopus japonicus* fed on *T. weissflogii* and produced fecal pellets under both gravity conditions. Comparison of ingestion rates of *A. steueri* and *T. japonicus* revealed no significant differences between the 1 g and simulated microgravity conditions ($p > 0.05$). Similarly, no significant difference was found in the gut chlorophyll *a* content of *A. steueri* at the end of the experiment (t -test, $p > 0.05$). These results suggest that, under the conditions tested, *A. steueri* and *T. japonicus* can maintain feeding activity comparable to that under Earth gravity even in a 1/1000 g microgravity environment. Future studies should assess how microgravity affects other biological processes such as reproduction and growth rates.

Keywords: clearance rate, gut pigment, marine copepods, microgravity, space aquaculture

将来計画されている月や火星における人間の長期滞在のためには、生命活動に必要な物質の効率的な循環供給が必要となる。動物性タンパク質の供給源として魚類養殖が期待されており、養殖排水に含まれる栄養塩類にて微細藻類を培養し、それを餌に動物プランクトンを育て、そして魚類の餌料にするプロセスが提案されている（竹内ら 1997, 遠藤・竹内 2013）。宇宙閉鎖環境下において、食物連鎖を制御しながら魚類養殖を行う場合、微小重力環境で餌生物が正常に増殖できるかどうか成功の鍵となる。動物プランクトンにおいてはこれまで、航空機による曲線飛行によって数十秒間の微小重力環境をつくり出し、その際の *Daphnia magna* の遊泳行動が観察されている (Endo et al. 2011, 遠藤・竹内 2013)。動物プランクトンの個体群の増殖は、摂餌や交尾、卵生産や発生、成長・発達（脱皮や変態）のプロセスを経るため、微小重力環境がこれら増殖因子に与える影響を理解する必要があるが、これらの評価には数時間～数日程度の一定期間の培養実験を行う必要がある。そこで本研究では、三次元の回転で重力を均等分散することで簡便に微小重力環境を再現可能なクリノスタット重力制御装置を用いることとした。本研究では予備的な検討として、動物プランクトン個体群の増

殖における基本的な因子である摂餌速度が微小重力環境においてどのように変化するのかを明らかにすることを目的とし、海産カイアシ類を対象に摂餌実験を行った結果を報告する。

本研究では海産カイアシ類の中でも浮遊性種の *Acartia steueri* と底生性種の *Tigriopus japonicus* を対象とした。*Acartia* 属カイアシ類は多くの魚種の仔稚魚にとって適した体サイズ、遊泳行動、生化学組成を示すことから理想的な水産生物餌料とされている (Hansen et al. 2016)。*A. steueri* は自然環境下においては水産重要魚種の仔稚魚の重要な餌資源となっており (Tanaka et al. 1987)、集約的な大量培養を目指した一連の研究対象種とされている (Takayama et al. 2021, Takayama et al. 2023)。*T. japonicus* は高密度培養が可能であり (Koga et al. 2022)、栄養強化を施さなくても魚類仔稚魚の生育にとって十分な必須脂肪酸および栄養価を有していることが報告されている (福所ら 1980, Hagiwara et al. 2016)。実験に用いた *A. steueri* 雌成体は相模湾西部に位置する真鶴港内にて 2023 年 4 月に目合い 180 μ m の動物プランクトンネットで採集された。実験に用いた *T. japonicus* 雌成体は相模湾三ツ石海岸において 2019 年 4 月に単離後、2024 年 6 月まで継代維持した個体

群から得られた。微細藻類餌料には f/2 培地で培養した珪藻 *Thalassiosira weissflogii* を用い、実験時に給餌する餌濃度は摂餌速度が飽和する十分濃度とした。海水で満たした容量 50 mL のガラス製溶存酸素瓶内に餌料藻類と雌成体をいれた実験区と、雌成体をいれない対照区を設け、各重力環境下で 25°C、暗所下のインキュベーター内にて 24 時間にて培養し、培養前後の海水のクロロフィル *a* 濃度を蛍光測定装置 (Trilogy, Turner Designs) にて測定した。得られたクロロフィル *a* 濃度を用い、Frost (1972) に従い摂餌速度と濾水速度を計算した。微小重力条件 (1/1000 g: 国際宇宙ステーション相当) ではクリノスタット重力制御装置 (Gravite, Space Bio-Laboratories) を用い、試料を三次元的に回転させることで微小重力環境を模擬的に再現した。地球重力条件 (1 g) は培養容器をインキュベーター内に静置し 4 時間毎に転倒攪拌を行った。*T. japonicus* に

関しては上述の静置での地球重力条件に加えて、攪拌の有無の影響をみるため 5 rpm で 1 方向に回転するローラーシェーカー (ROLLER 10 digital, IKA) による地球重力条件 (1 g) での実験も行った (Table 1)。各重力条件でカイアシ類が摂餌した植物プランクトンの量を直接評価するため、*A. steueri* のみを対象に消化管内のクロロフィル *a* 量の測定を、Takatsuji et al. (1997) に従い下記の手順で行った。培養終了後、*A. steueri* 雌成体を濾過海水で洗い、2 mL の N,N-ジメチルホルムアミドにて 1 個体ずつ消化管内のクロロフィル *a* 色素を抽出し、蛍光測定装置 (Trilogy, Turner Designs) にて測定した。各実験条件間の摂餌速度、濾水速度、消化管クロロフィル *a* 含量の有意差検定には、*A. steueri* には t-test を、*T. japonicus* には ANOVA を使用し、*p* 値が 0.05 以下を有意とした。

実験に用いたカイアシ類 *A. steueri* と *T. japonicus* の雌成体は、地球重力 (1 g) と微小重力 (1/1000 g: 国際宇宙ステーション相当) の両条件において珪藻 *Thalassiosira weissflogii* を摂餌し、糞粒の生産が確認された。両条件の摂餌速度を比較したところ、*A. steueri* と *T. japonicus* 両種において全ての条件間で有意差は認められなかった (Fig 1a, Fig 2a)。濾水速度についても、*A. steueri* と *T. japonicus* 両種において全ての条件間で有意差は認められなかった (Fig 1b, Fig 2b)。培養実験終了時点での *A. steueri* の消化管内ク

Table 1. Experimental target species of marine copepod and gravity conditions in the present study.

Species	Gravity condition		
	1 g (static)	1 g (shaker)	1/1000 g (clinostat)
<i>Acartia steueri</i> (planktonic copepod)	✓	—	✓
<i>Tigriopus japonicus</i> (epibenthic copepod)	✓	✓	✓

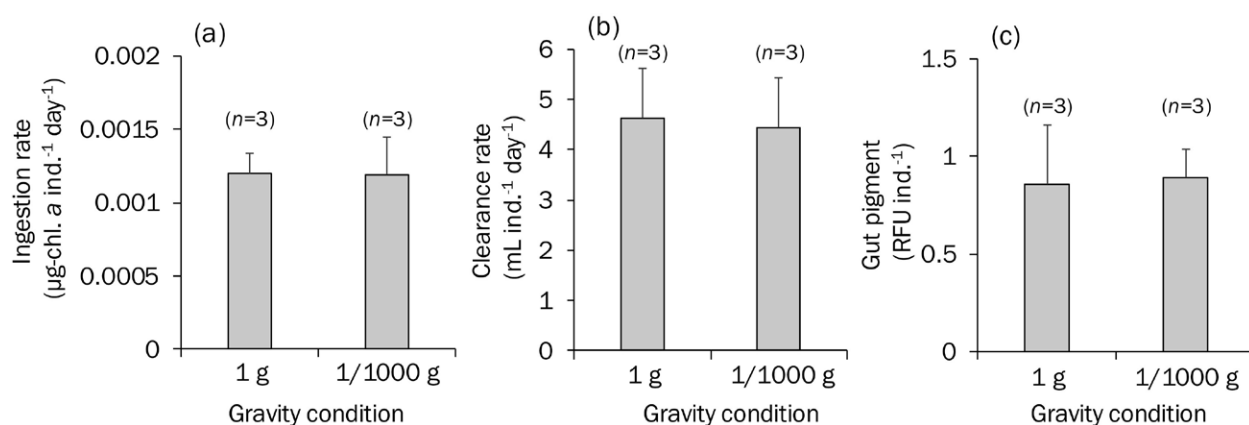


Fig 1. (a) Ingestion rate, (b) clearance rate and (c) gut pigment of adult females in marine copepod *Acartia steueri* raised under 1 g (Earth gravity) and 1/1000 g (International Space Station gravity) gravity conditions. No significant difference was detected between conditions (t-test, $p > 0.05$).

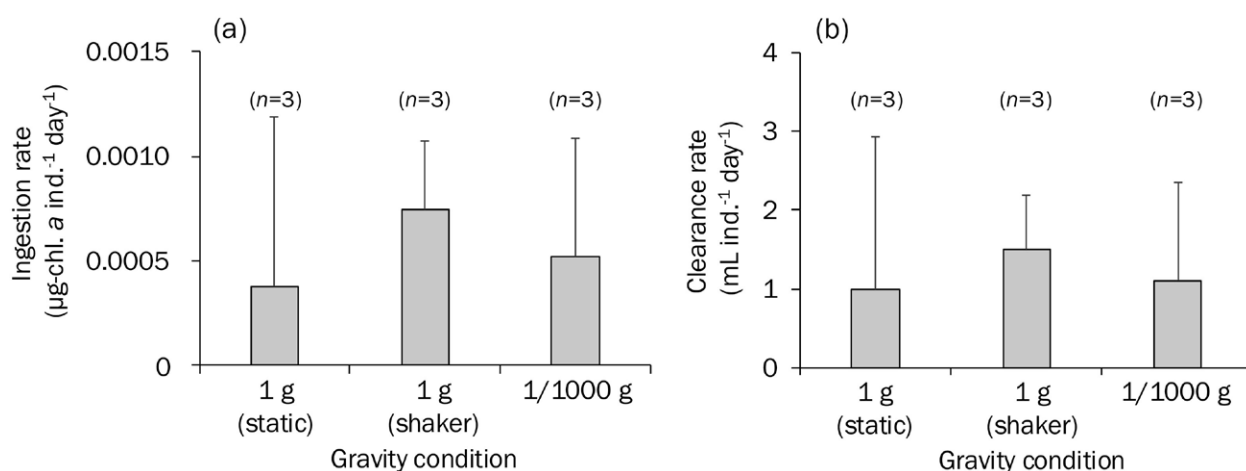


Fig 2. (a) Ingestion rate and (b) clearance rate of adult females in marine copepod *Tigriopus japonicus* raised under static and agitated conditions at 1 g (Earth gravity), and 1/1000 g (International Space Station gravity) gravity conditions. No significant difference was detected among conditions (ANOVA, $p > 0.05$).

ロコフィル *a* 含量についても、全ての条件間で有意差は認められなかった (Fig 1c)。以上の結果より、本研究の実験条件においては、1/1000 g の微小重力環境であっても *A. steueri* と *T. japonicus* は摂餌速度を地球重力環境と同程度に維持できるものと示唆された。今後は数日程度の培養実験を行うことで微小重力が再生産速度や孵化率、成長速度等へ与える影響を評価する必要がある。

謝辞

本研究の一部は日本学術振興会科研費 (21H03665、21K14902) による助成を受け実施された。

引用文献

- Endo M, Kakimoto N, Kanemaru S, Saitoh M, Omori K, Takeuchi T (2011) Proc. SEE Conf., Tokyo, JPN, p. 49.
- 遠藤雅人, 竹内俊郎 (2013) 閉鎖系における魚類の生産と微小重力の影響. *Int J Microgravity Sci Appl* 30: 111–119.
- 福所邦彦, 荒川敏久, 渡辺武 (1980) 油脂酵母で培養したティグリオプスのマコガレイ仔稚魚に対する餌料価値. *日本水産学会誌* 46: 499–503.
- Frost BW (1972) Effects of size and concentration of

food particles on the feeding behavior of the marine planktonic copepod *Calanus pacificus*. *Limnol Oceanogr* 17:805–815.

- Hagiwara A, Kotani T, Yoshida T, Soyano K (2016) Production and use of two marine zooplanktons, *Tigriopus japonicus* and *Diaphanosoma celebensis*, as live food for red sea bream *Pagrus major* larvae. *Aquaculture* 452: 120–127.
- Hansen BW, Buttino I, Cunha ME, Drillet G (2016) Embryonic cold storage capability from seven strains of *Acartia* spp. isolated in different geographical areas. *Aquaculture* 457: 131–139.
- Koga S, Takayama Y, Toda T (2022) Suppression of cannibalism in the intertidal copepod *Tigriopus japonicus* (Mori, 1932) and improvements in population density using artificial substrates. *Aquac Fish Fish* 2: 146–150.
- Takayama Y, Hirahara M, Toda T (2021) Bioreactor cultivation of the planktonic copepod *Acartia steueri* Smirnov for egg collection. *Aquac Res* 52: 5912–5917.
- Takayama Y, Yusoff FMD, Toda T (2023) Evaluation of dietary microalgae in the culture of *Acartia steueri* (Copepoda, Calanoida). *J Sustain Sci Manag* 18: 186–198.
- 竹内俊郎, 能登瞬, 吉崎悟朗, 豊部睦, 神吉良二, 小口美津夫, 本部勢至朗, 田仲広明 (1997) 閉鎖生態系循環式養殖システム (CERAS) の開発に関する研究 I. 密閉式魚類飼育装置の開発. *CELSS journal*

- 10: 1–4.
- Takatsuji H, Hamasaki K, Toda T, Taguchi, S (1997) Improved technique for the gut fluorescence method in a feeding study of small zooplankton. *J Plank Res* 19: 159–165.
- 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.

Cellular characteristics of *Chromochloris zofingiensis* in different nutritional modes

Anupreet Kaur Chowdhary^{1*}, Masatoshi Kishi^{2,3}, Tatsuki Toda⁴

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

2) Institute of Sustainable Processes, University of Valladolid, School of Industrial Engineering, Pso. Prado de la Magdalena 3-5, 47011, Valladolid, Spain

3) Research Center for Earth Surface System, Research Institute of Global Change, Japan Agency for Marine-Earth Science and Technology, 2-15 Natsushima-cho, Yokosuka-City, Kanagawa, 237-0061, Japan

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

* Corresponding author: Tel.: +81 42 691 9455

E-mail address: chowdhary@soka.ac.jp (A.K. Chowdhary).

Received May 15 2025, Accepted June 5 2025

Abstract *Chromochloris zofingiensis* has ability to produce high value pharmaceutical and nutraceutical pigments in autotrophic, mixotrophic or heterotrophic nutritional mode which makes it a promising microalgal species. In this study, we observed the effect of dilution on growth and biomass concentration in three different nutritional modes. When the cells in auto-, mixo- and hetero-trophic nutritional modes, in this study, reached the highest optical density (OD), they were diluted to ensure they remained in linear range of optical density detection and to understand the morphological differences between each nutritional mode. As a result, the cell behavior changed in each nutritional mode due to difference in conditions. The heterotrophic cells reached the highest biomass concentration (1.11 g L^{-1}) due to largest cell size and possible accumulation of intracellular compounds in the dark phase. On the other hand, cells in mixotrophic and autotrophic nutritional mode reached biomass concentration, 0.88 and 0.40 g L^{-1} , respectively. Our study showed a correlation between growth and dry weight, where cells in each nutritional mode showed almost similar growth with different biomass concentration. We observed an accurate comparison between biomass between conditions where cell shapes might have influenced OD independently of biomass. Thus, it can be said that the differences in nutritional modes affected the cell physiological characteristics of *C. zofingiensis*.

Keywords: biomass, *Chromochloris zofingiensis*, dilution, growth, nutritional modes

Chromochloris zofingiensis, a eukaryotic green microalga, has attracted attention due to its high growth rate, biomass and natural production of high-value compounds such as astaxanthin and canthaxanthin (Liu

et al. 2014, Zhang et al. 2017, Chowdhary et al. 2022, 2025). *C. zofingiensis* can be easily cultured under several nutritional modes such as autotrophic, mixotrophic and heterotrophic based on various carbon sources (Sun

et al. 2008, Li et al. 2009, Chen et al. 2015, Sun et al. 2019). However, cells tend to change their cell growth, carotenoids, physiological characteristics such as cell size, and intracellular compounds such as starch, lipids when cultured into different nutritional modes. In our previous study, we showed that cultivation of *C. zofingiensis* through transition of nutritional modes affects not only the growth but also the physiological characteristics (Chowdhary et al. 2023). We also reported the mechanism of multinucleation followed by multiple fission and changes in intracellular compounds by transition of nutritional modes in *C. zofingiensis*. The high optical density can be affected by both cell numbers and cell density based on the nutritional modes in *C. zofingiensis*. However, the dilution of high biomass concentration to understand the relationship between growth and cell dry weight has not been explored. It is possible that diluting high optical density (OD) cells might help reduce the influence of cell shape and size on light scattering, by improving the reliability of OD as a proxy for biomass across varying nutritional modes. The difference in nutritional modes leads to change in cell behavior and

physiological characteristics which might be explained by possible dilutions. Thus, in this study we elucidated a more reliable relationship of whether cell physiology affects the biomass and growth of *C. zofingiensis* in different nutritional modes with dilution strategy.

Chromochloris zofingiensis (ATCC 30412) was obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA). The modified Bristol's medium (MBM) (Ip & Chen 2005) was used for maintaining the microalgal stock in 250 mL Erlenmeyer® flasks at 25 °C under a light intensity of 60 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ at a 12 h-L/12 h-D photoperiod. This study analyzed the relationship between optical density ($\lambda = 750 \text{ nm}$) with cell dry weight (g L^{-1}). Cells from the stock phase were cultured into three nutritional modes each, namely, autotrophic (with 260 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ continuous light intensity), mixotrophic (10 g L^{-1} glucose with 260 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ continuous light intensity), and heterotrophic (dark with 10 g L^{-1} glucose) mode with continuous aeration (0.2 vvm) in MBM at 25 °C until the stationary phase. When the cells reached optical density >1.2 (original sample, Ori.) in each nutritional modes, cells were diluted (1x,

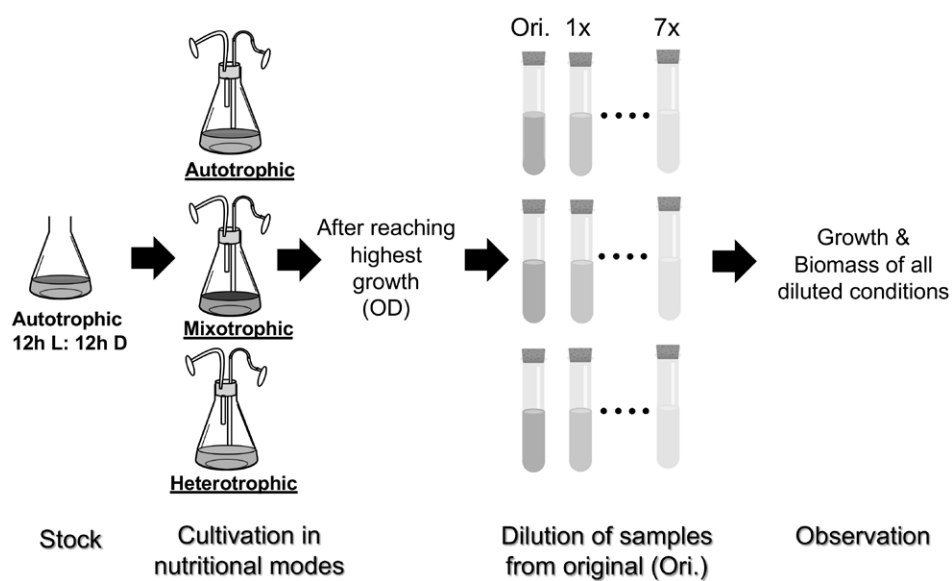


Fig. 1. Cultivation of *Chromochloris zofingiensis* in three nutritional modes and observation of growth using a dilution strategy from the original (Ori.) sample, with high optical density in each nutritional mode.

2x, 3x, 4x, 5x, 6x, and 7x) with distilled water. After preparation of different dilutions, the optical density and the cell dry weight of the diluted culture in each nutritional mode was observed (Fig. 1). The cultures were conducted in monoplicate.

The cell dry weight analysis was performed by using pre-weighed glass fiber filters with a pore size of 0.7 μm (GF/F, Whatman, USA). The filtered cells were washed three times with distilled water and dried at 80 $^{\circ}\text{C}$ for 8 h for the dry weight measurements. The growth was measured by using a UV-visible spectrophotometer (UV-2450, Shimadzu, Japan) at optical density (OD), $\lambda = 750 \text{ nm}$. Two different types of hemacytometer, a bacteria counter (SLGC, Koshigaya, Japan) and Thoma (Hirschmann, Germany), were used depending on cell length and density.

The growth of *Chromochloris zofingiensis* in all three nutritional modes, autotrophic, mixotrophic and heterotrophic, reached about 1.29, 1.40, and 1.21 (OD) respectively. The specific growth rate was the highest in mixotrophic (0.89 d^{-1}) as compared to autotrophic and heterotrophic nutritional modes (0.72 and 0.50 d^{-1} , respectively). The highest growth rate in mixotrophic cultivation mode was possibly because *C. zofingiensis* can utilize both light and carbon sources for growth (Chen et al. 2017, Sun et al. 2019, Chowdhary et al. 2022). However, the physiological characteristics of *C. zofingiensis* changed with respect to different nutritional modes. The cells were larger in size in heterotrophic ($14.6 \mu\text{m}$), as compared to mixotrophic and autotrophic nutritional modes (9.17 and $5.44 \mu\text{m}$, respectively) (Fig. 2). The largest cell size of *C. zofingiensis* in heterotrophic cultivation led to highest cell dry weight, 1.11 g L^{-1} , possibly due to accumulation of intracellular compounds and multiple nuclei (Chowdhary et al. 2023). The cell dry weight in mixotrophic and autotrophic nutritional mode reached 0.88 and 0.40 g L^{-1} , respectively. The lowest dry

weight in autotrophic nutritional mode can perhaps be due to smaller cell size and low accumulation of intracellular compounds (Chowdhary et al. 2022, 2023). Even though cells were smaller in size in autotrophic nutritional mode, the growth (OD) reached almost similar to cells cultured in two other nutritional modes; mixotrophic and heterotrophic. Different nutritional modes are known to stimulate production of nuclei, intracellular compounds such as starch, lipids, and biosynthesis of carotenoids (Chowdhary et al. 2023, 2025).

In this study, the relationship between *C. zofingiensis* cell growth (OD) and biomass concentration was also

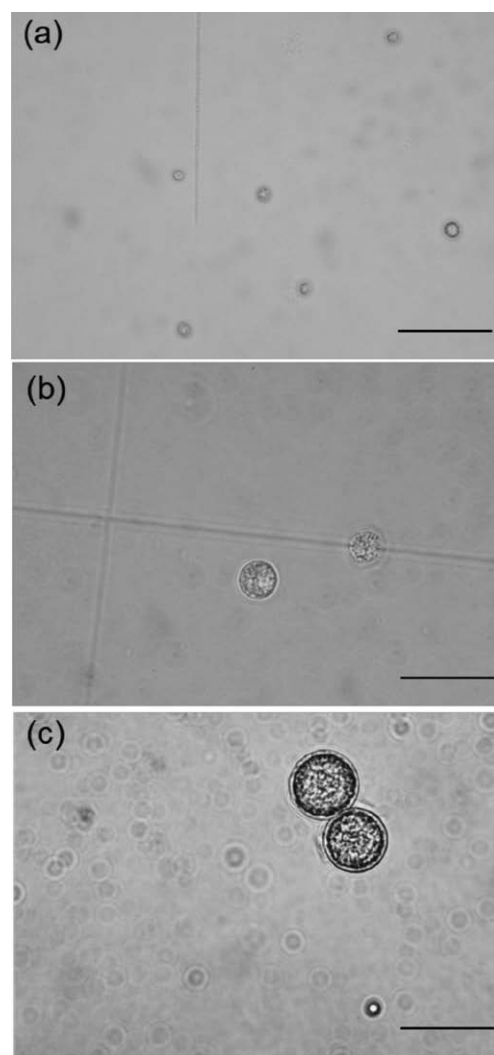


Fig. 2. Pictures of *Chromochloris zofingiensis* cells cultured in (a) auto-, (b) mixo-, and (c) hetero-trophic nutritional modes.

Scale bar 20 μm

observed. After reaching highest cell growth, cells were diluted (1x to 7x) and later the growth of cells in each nutritional mode was observed (Fig. 3). At high cell densities, OD sometimes can become non-linear due to light scattering or change in shapes. The dilution strategy in this study generated a more reliable relationship between OD and actual biomass, which enabled correction across the nutritional modes (Fig. 4). It also helped limit the influence of cell shape and size on OD measurements. It is known that *C. zofingiensis* has unique cellular characteristics which change with nutritional modes (Azaman et al. 2017, Chowdhary et al. 2022). In this study, it was noticed that *C. zofingiensis* cells cultured in autotrophic nutritional mode showed similar growth (OD, $\lambda = 750$ nm) to cells cultured in mixotrophic and heterotrophic modes, but due to smallest cell size the dry weight did not reach as high as other two nutritional modes (Fig. 4). It is possible that the cellular content or cell density of *C. zofingiensis* possibly led to higher growth in autotrophic nutritional mode (Chowdhary et al. 2022). However, the large size of heterotrophic *C. zofingiensis* cells probably led to accumulation of

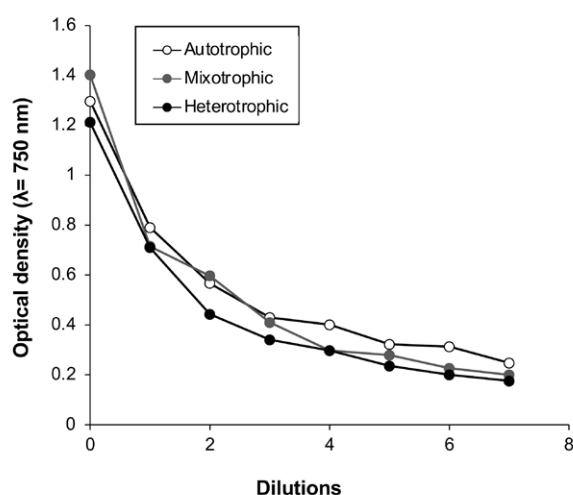


Fig. 3. Growth ($\lambda=750$ nm) of *Chromochloris zofingiensis* after dilutions, starting from 0 to 7, where 0 is the original sample and 1, 2, 3, to 7 are the dilution factors 1:1, 1:2, 1:3 until 1:7, respectively.

higher cellular content (lipids, starch, nuclei) producing highest biomass as compared to the cells in autotrophic nutritional mode (Chowdhary et al. 2023). The cells in mixotrophic nutritional mode, on the other hand, showed high growth and biomass possibly due to larger cell size (9 μ m) and high intracellular content. In our previous study, the highest growth rate and biomass productivity was observed in mixotrophic nutritional mode (Chowdhary et al. 2022). The highest dilution (7x) also showed that with the same growth (about 0.2, OD), biomass concentration in each nutritional mode was different. The differences can be owed to the change in cell size, or cell density in *C. zofingiensis* in autotrophic, mixotrophic and heterotrophic nutritional mode.

The differences in physiological characteristics were noticeable due to the dilution of the cells in different nutritional modes when they reached high biomass. In a previous study, it was found that the light efficiency increased when the cells were diluted and transferred for efficient production of astaxanthin (Wan et al. 2015, Zhang et al. 2017). It is possible that improved light efficiency in

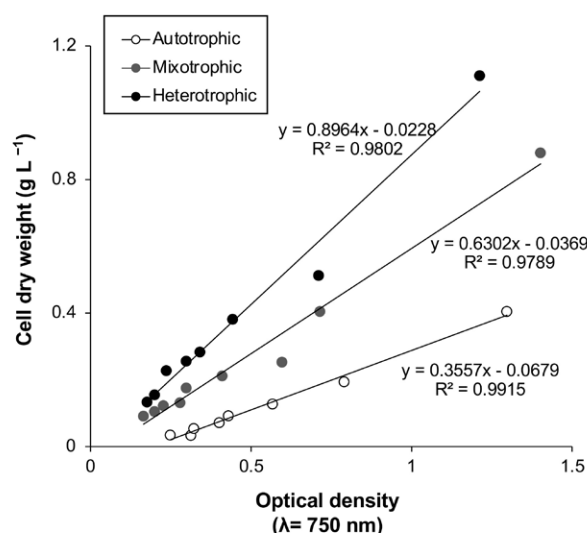


Fig. 4. Relationship between growth ($\lambda=750$ nm) and cell dry weight (g L^{-1}) in *Chromochloris zofingiensis* in auto-, mixo-, and hetero-trophic nutritional modes with dilution strategy.

C. zofingiensis during the biomass production phase with dilution might also improve the biomass and affect the cellular characteristics. Thus, future studies are required to examine the effect of dilution on cell biomass and cellular characteristics in different nutritional modes in *C. zofingiensis* for improved biomass production.

References

- Azaman SNA, Nagao N, Yusoff FM, Tan SW, Yeap SK (2017) A comparison of the morphological and biochemical characteristics of *Chlorella sorokiniana* and *Chlorella zofingiensis* cultured under photoautotrophic and mixotrophic conditions. *PeerJ* 5: e3473.
- Chen JH, Liu L, Wei D (2017) Enhanced production of astaxanthin by *Chromochloris zofingiensis* in a microplate-based culture system under high light irradiation. *Bioresour Technol* 245: 518–529.
- Chen T, Liu, J, Guo B, Ma X, Sun P, Liu B, Chen F (2015) Light attenuates lipid accumulation while enhancing cell proliferation and starch synthesis in the glucose-fed oleaginous microalga *Chlorella zofingiensis*. *Sci Rep* 5: 1–10.
- Chowdhary AK, Kishi M, Toda T (2022) Enhanced growth of *Chromochloris zofingiensis* through the transition of nutritional modes. *Algal Res* 65: 102723.
- Chowdhary AK, Kishi M, Toda T (2023) A novel process for the production of *Chromochloris zofingiensis* through dark-induced multi-nuclei formation. *Algal Res* 71: 103053.
- Chowdhary AK, Kishi M, Toda T (2025) Astaxanthin induction in *Chromochloris zofingiensis* by transition of nutritional modes. *J Appl Phycol*:1–8
- Ip PF, & Chen F (2005) Production of astaxanthin by the green microalga *Chlorella zofingiensis* in the dark. *Process Biochem* 40: 733–738.
- Li Y, Huang J, Sandmann G, Chen F (2009). High-light and sodium chloride stress differentially regulate the biosynthesis of astaxanthin in *Chlorella zofingiensis* (Chlorophyceae). *J Phycol* 45:635–641.
- Liu J, Sun Z, Gerken H, Liu Z, Jiang, Y, Chen F (2014). *Chlorella zofingiensis* as an alternative microalgal producer of astaxanthin: Biology and industrial potential. *Mar Drugs* 12: 3487–3515.
- Sun N, Wang Y, Li YT, Huang JC, Chen F (2008). Sugar-based growth, astaxanthin accumulation and carotenogenic transcription of heterotrophic *Chlorella zofingiensis* (Chlorophyta). *Process Biochem* 43: 1288–1292.
- Sun Z, Zhang Y, Sun LP, Liu J (2019). Light elicits astaxanthin biosynthesis and accumulation in the fermented ultrahigh-density *Chlorella zofingiensis*. *J Agric Food Chem* 67: 5579–5586.
- Wan M, Zhang Z, Wang J, Huang J, Fan J, Yu A, Wang W, Li Y (2015). Sequential Heterotrophy–Dilution–Photoinduction Cultivation of *Haematococcus pluvialis* for efficient production of astaxanthin. *Bioresour Technol* 198: 557–563.
- Zhang Z, Huang JJ, Sun D, Lee Y, Chen F (2017). Two-step cultivation for production of astaxanthin in *Chlorella zofingiensis* using a patented energy-free rotating floating photobioreactor (RFP). *Bioresour Technol* 224: 515–522.

引用文献の書き方

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

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

[例]

論文

中尾賢志 (2019) 閉鎖性水域における栄養塩類管理を目的とした下水高度処理の運転管理. 用水と廃水 61: 655–661.

Cervantes-Avilés P, Keller AA (2021) Incidence of metal-based nanoparticles in the conventional wastewater treatment process. Water Res 189: 116603. (論文番号のみの場合)

Wangpraseurt D, You S, Azam F, Jacucci G, Gaidarenko O, Hildebrand M, Kühl M., Smith AG et al. (2020) Bionic 3D printed corals. Nat Commun 11: 1748. (著者が8人のみの場合)

Bakraoui M, Karouach F, Ouhammou B, Aggour M, Essamri A, El Bari H (2020). Biogas production from recycled paper mill wastewater by UASB digester: Optimal and mesophilic conditions. Biotechnol Reports 25: e00402, doi.org/10.1016/j.btre.2019.e00402 (電子版のみの場合)

単行本

小久保清治 (1932) 浮游生物分類学. 恒星社厚生閣, 東京, 394 pp, 34 pls.

高原義昌 (編著) (1980) 廃水の生物処理. 地球社, 東京, 384 pp.

Speece RE (1996) Anaerobic Biotechnology for Industrial Wastewaters. Archae Press, Tennessee, 393 pp.

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)

2025 年 10 月 20 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 美光印刷株式会社
〒198-0024 東京都青梅市新町 9-2183-5
Tel: 0428-30-5433

第 5 号（2025 年 10 月） 目次

◆ 原著論文

- 異なる廃棄物原料由来のバイオ炭の化学処理による
リン酸の形態変化とリン施肥効果
増淵由香、佐藤伸二郎 1
- 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、松山達、井田旬一 18
- Effects of short hydraulic retention time on UASB reactor performance
inoculated with pre-aggregated anaerobic digestion granular sludge
Mfor E. Agborambang, Gemechu Kassaye, Eshetu Getahun, Pranshu Bhatia,
Masaaki Fujiwara, Daiki Maruyama, Kanako Kimura, Shin-ichi Akizuki,
Nigus Gabbiye Habtu, Shinjiro Sato, Tatsuki Toda 25
- Impact of impeller rotational speed on sludge velocity distribution in a
double helical ribbon reactor: A CFD-based study
Mfor E. Agborambang, Gen Satoyoshi, Masaaki Fujiwara, Pranshu Bhatia,
Tatsuki Toda, Kouji Yoshida, Ryosuke Okimune 37
- ### ◆ 短報
- 宇宙で動物プランクトンを培養できるのか？
～微小重力環境下でのカイアシ類の摂餌速度～
高山佳樹、秋月真一 46
- Cellular characteristics of *Chromochloris zofingiensis*
in different nutritional modes
Anupreet Kaur Chowdhary, Masatoshi Kishi, Tatsuki Toda 51