

メタン発酵消化液を用いた微細藻類培養とバイオガス精製同時プロセス

岸正敏^{1)*}, 尾内秀美²⁾, 田中健児³⁾, 吉田あかり³⁾, 戸田龍樹^{1,3)}

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

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

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

Simultaneous microalgal culture and biogas upgrading using anaerobic digestion effluent

Masatoshi Kishi^{1)*}, Hidemi Onouchi²⁾, Kenji Tanaka³⁾, Akari Yoshida³⁾, Tatsuki Toda^{1,3)}

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

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

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

*Corresponding author: masa-kishi@soka.gr.jp

2021年4月10日受付, 2021年5月25日受理

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

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

As a result, the ADE media was optimized to 10% ADE content, pH 8.0, 0.1 mol L⁻¹ bicarbonate addition, and Mg + Mn addition. While the raw ADE did not allow the growth of *Chlorella sorokiniana*, the maximum algal specific growth rate using the optimized media reached more than 2 d⁻¹, which equals a doubling time of less than 9 hours. The optimized media was then used for the simultaneous microalgae cultivation and biogas upgrading process. The average productivity in the PBR was 206 ± 138 mg L⁻¹ d⁻¹. The carbon dioxide recovery rates for L/G 0.1, 0.3, and 0.5 were 90, 94, and 99%, respectively. On the other hand, O₂ contents in the upgraded gas were 8.5, 8, and 14%, respectively. The content of carbon dioxide and O₂ were in a reverse relationship over various L/G ratios. The current study demonstrated the effectiveness of carbon capture from the biogas, but also suggested further challenge in prevention of oxygen intrusion from algal pure culture. Comparisons with other studies suggest that optimization in gas/PBR volume may enhance the quality of biogas upgrading.

Keywords: carbon dioxide, *Chlorella*, CO₂ capture, waste valorization.

1. 序 論

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

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

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

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

また、バイオガスには、約 60% を占めるメタンの他に約 40% の CO_2 や微量の H_2S が含まれる。バイオガスを天然ガスの代替燃料として利用するためには、メタンガス濃度を 90 ~ 95% 程度まで精製する必要がある (Ángeles et al. 2020)、特に高濃度で含まれる CO_2 を除去する必要がある。バイオガスに含まれる CO_2 の回収方法として、微細藻類培養液への CO_2 の溶解を利用する方法がある。微細藻類が光合成で CO_2 を利用すると、培養液はアルカリ性に傾き、 CO_2 の溶解度が上昇する。この培地に CO_2 を含んだバイオガスを通気することで、pH と溶存無機炭素 (dissolved inorganic carbon; DIC) を一定に保つことができ、 CO_2 供給とバイオガス精製を同時に達成することができる。さらに、微細藻類培地として消化液を用いることで、メタン発酵から生じる排液および排ガスを包括的に利用するプロセスを構築できる可能性がある。

従来の微細藻類を用いたガス精製プロセスでは、 CO_2 濃度 5 ~ 15% 程度の燃焼ガスを対象として微細藻類培養槽に直接ガスを供給しており (Keffer & Kleinhertz 2002, Van Den Hende et al. 2012)、バイオガスを藻類培養槽に直接供給した場合には高濃度 CO_2 による微細藻類の成長阻害 (Meier et al. 2015) や精製ガス中への酸素の混入 (Posadas et al. 2015) という問題が生じていた。

これらの問題を受けて、 CO_2 吸収塔と微細藻類培養槽を用いた 2 槽循環型ガス精製プロセスが提唱された (González-López et al. 2012, Chi et al. 2013, Meier et al. 2015, Posadas et al. 2015, Serejo et al. 2015)。このプロセスでは、高濃度の CO_2 ガスを含むバイオガスを吸収塔に通気し、 CO_2 ガスを液中に溶解させた状態で液分を培養槽に供給することで、高濃度 CO_2 による微細藻類の成長阻害を回避することが可能となった。さらに精製ガスを培養槽からではなく吸収塔上部で回収することで、精製ガス中への O_2 の混入が低減することが示された。また、供給ガス量 (G) に対する CO_2 吸収塔への培地返送量 (L) の比率 L/G 比を調整することで精製ガス中の CO_2 と O_2 濃度を調整し、ガス精製能

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

この課題を解決するために、2 槽循環型ガス精製プロセスの微細藻類培養槽に、光供給効率の高いフラットパネル型リアクターを用いて純粋培養を行うことで、高付加価値な藻類バイオマスの生産と、容積当たりのガス精製性能の向上が期待できる。しかし一方で、閉鎖系での微細藻類生産により O_2 生産量の増加や CO_2 利用量の変化から、最適な L/G 比が変化する可能性がある。高いバイオマス生産性とガス精製効率を同時に達成するには、L/G 比やガス供給速度を検討する必要がある。

そこで本研究では、微細藻類を用いた 2 槽循環型ガス精製プロセスにおける高いバイオマス生産性・ CO_2 回収率を達成することができる L/G 比を明らかにすることを目的とした。

2. 材料と方法

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

本研究ではまず消化液を *C. sorokiniana* の増殖に適

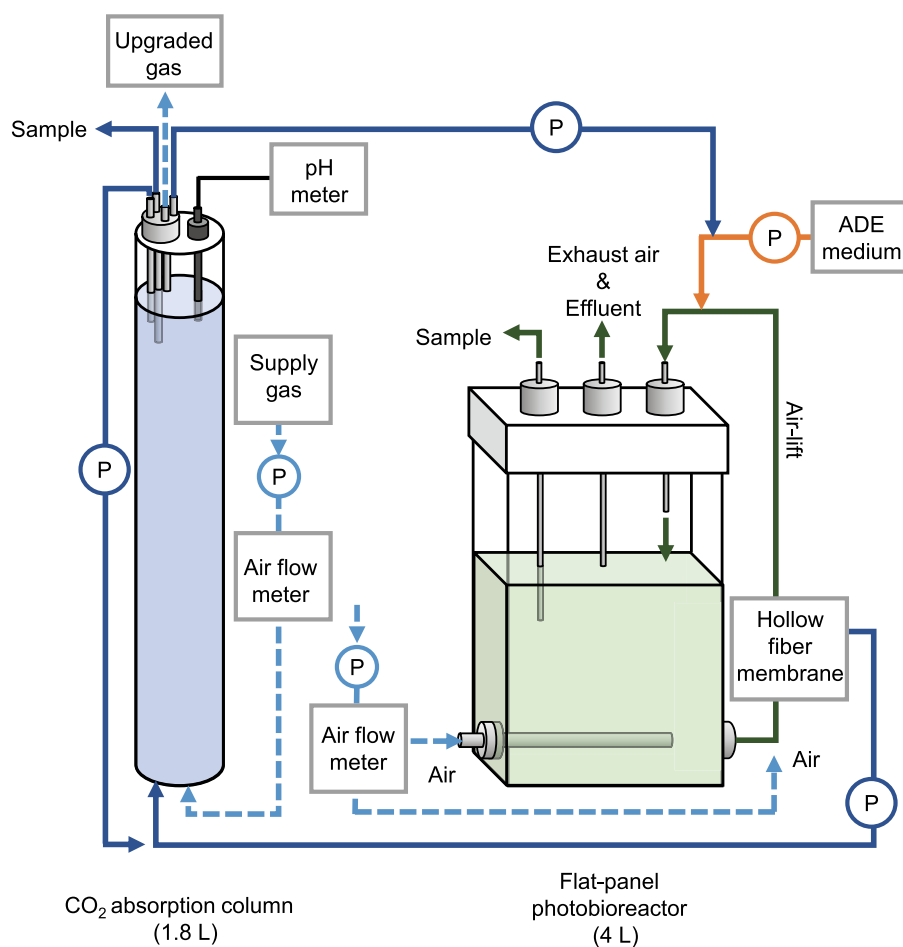


Fig. 1. Schematic diagram of the two-phase CO₂ absorption and microalgae cultivation process.

した性状に調整するため、消化液濃度、pH、DIC 濃度、および金属添加条件の最適化を行った。次に最適化された消化液培地を用いて 2 槽循環型 CO₂ ガス回収プロセスの運転条件の検討を行った (Fig. 1)。

2.1. 消化液培地の最適化

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

2.1.1. 消化液濃度、初期 pH、溶存無機炭素濃度

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

次に、最適濃度の消化液を用いて、異なる初期

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

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

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

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

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

(OD₇₅₀)とした。測定時には、暗所下でボルテックスを用いて攪拌を行ったのち、吸光光度計 (DR-6800, HACH) を用いた。試験管で測定した光学密度(OD_{tube})の 1 cm 光路長への換算には以下の実測値から算出した換算式を用いた:

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

2.1.2. 金属群

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

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

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

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

Table 2. Experimental series of metal optimization tests.

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

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

ぐため、最縁部のウェルには滅菌水を配置し、培養時にはパラフィルムを用いて蓋と本体を密閉したうえで、チャック付クリアパックでプレートを覆った。培養期間中は攪拌装置 (SHM-2002, LMS) を用いて常時攪拌を行った。測定は、マイクロプレートリーダー (EPOCH 2, BioTek) を用いて波長 750 nm における光学密度を測定した。消化液添加培地では 24 時間後に析出に起因するとみられる OD₇₅₀ の上昇が確認されたため、これを差し引いた値を結果の解析に用いた。

2.2. 2 槽循環型ガス精製プロセスを用いた CO₂

ガス回収

2.2.1. 実験条件

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

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

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

吸収塔には、有効容積 1.8 L のアクリル樹脂製円筒形リアクターを使用した (Figure 1)。供給ガスには、バイオガスを模して安全性の高い N₂ ガスと CO₂ ガスを約 65:35 で混合したガスを使用した。供給速度は事前の *C. sorokiniana* 培養試験で見られた培養槽の DIC 濃度の減少分と CO₂-C 供給速度が同等になるよう、7.31

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

培養槽から吸収塔への供給には、藻類細胞に対する CO₂ 阻害を防止するため、中空糸膜 (マイクロザ® MF ラボモジュール PSP-103, 旭化成) を用いて濾過した濾液を供給した。培養槽側面下部からチューブを延ばして中空糸膜を接続し、内部を濡れ空気 0.5 L min⁻¹ で通気を行いエアリフトの形式で内部に培養液を流動させた。2 槽間の液循環速度は、運転 0 日目から 9 日目までを 4 L d⁻¹、9 日目から 14 日目までを 2 L d⁻¹、14 日目から 20 日目までを 1 L d⁻¹ (L/G 比はそれぞれ 0.54、0.27、0.14) と段階的に変化させた。

2.2.2. 測定項目

培養槽では波長 750 nm における光学密度および乾燥重量を、吸収塔では供給ガスと精製ガスのガス組成を、そして両槽で pH および DIC 濃度を測定した。光学密度は紫外可視分光光度計 (UV-2450, 島津)、培養槽内の pH には卓上型 pH メーター (D-51, HORIBA)、吸収塔内の pH には pH ロガー (17SD, SATO TECH [pH 電極: InPro 3030/325, Mettler Toledo]) を用いて測定を行った。乾燥重量は、粒子保持能 0.7 μm のガラス繊維濾紙 (GF/F 25mm, Whatman) 上に捕集し純水で洗浄した試料を 60°C のドライオーブン (DG-82, YAMATO) で 1 日以上乾燥させた後、精密電子天秤 (UMX 2, Mettler Toledo) で計量を行った。DIC 濃度は、試料を孔径 0.7 μm のガラス繊維濾紙 (GF/F 25mm, Whatman) で濾過後、TOC 計 (TOC-V CSH, 島津) の DIC 測定メソッドを用いて塩酸処理後の試料に曝気をし、揮散した CO₂ 量を計測することにより定量した。ガス組成は、ガスクロマトグラフィー (GC-2014, 島津 [分析カラム: Shincarbon-ST 6.0 m × 3.0 mm I.D., キャリアガス: ヘリウム]) を用いて測定した。

3. 結果

3.1. 消化液培地の最適化

3.1.1. 消化液濃度、初期 pH、溶存無機炭素濃度

異なる消化液濃度での培養では、10 ~ 25% の条件で OD₇₅₀ 0.15 程度までの増殖が見られた一方で、50% および 100% 条件ではほとんど増殖が見られず、0.067 ~ 0.096 の間に留まった (Fig. 2a)。10 ~ 25% の条件では、最大比増殖速度が 0.47 ~ 0.55 d⁻¹ となり、10% 消化液濃度で最も高い OD₇₅₀ 0.156 が得られた。

10% 消化液を用いて異なる初期 pH 条件で行った培養では、pH7 ~ 9 の条件で増殖が確認され、pH10 以上ではほとんど増殖が見られなかった (Fig. 2b)。pH7.0 および 8.0 で他の系列よりも有意に高い比増殖速度が得られ ($p < 0.01$)、それぞれ 0.95 および 1.05 d⁻¹ であった。pH8.0 では他の系列の 1.5 倍と有意に高い ($p < 0.01$) 最大 OD₇₅₀ 0.34 が確認された。

10% 消化液、pH8 で行った異なる DIC 濃度下での培養試験では、0.4 mol L⁻¹ の最も高濃度条件を除いて、全ての条件でこれまでの試験よりも高い最大比増殖速度 1.26 ~ 2.04 d⁻¹ が得られた (Fig. 2c)。中でも DIC 濃度 0.05 および 0.1 mol L⁻¹ では倍加時間 8.2 ~ 9.5 h が確認され、最大 OD₇₅₀ も 1.05 とこれまでで最も高い値が得られた。

3.1.2. 金属群

最適化された消化液培地を用いて、異なる金属群添加条件による培養試験を行った (Fig. 3)。消化液に金属を単独で添加した実験では、Mn 添加区、PIV 添加区、および Mg 添加区で消化液区よりも高い比較的良好な増殖が確認された (Fig. 3a)。しかしこれらの比増殖速度および最終 OD₇₅₀ は C 培地区と比較してそれぞれ約 4 倍および 2 倍の差があった。また、Fe、Co、Mo 添加区ではほとんど増殖が確認されず、消化液単独区よりも最終 OD₇₅₀ が低かった。

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

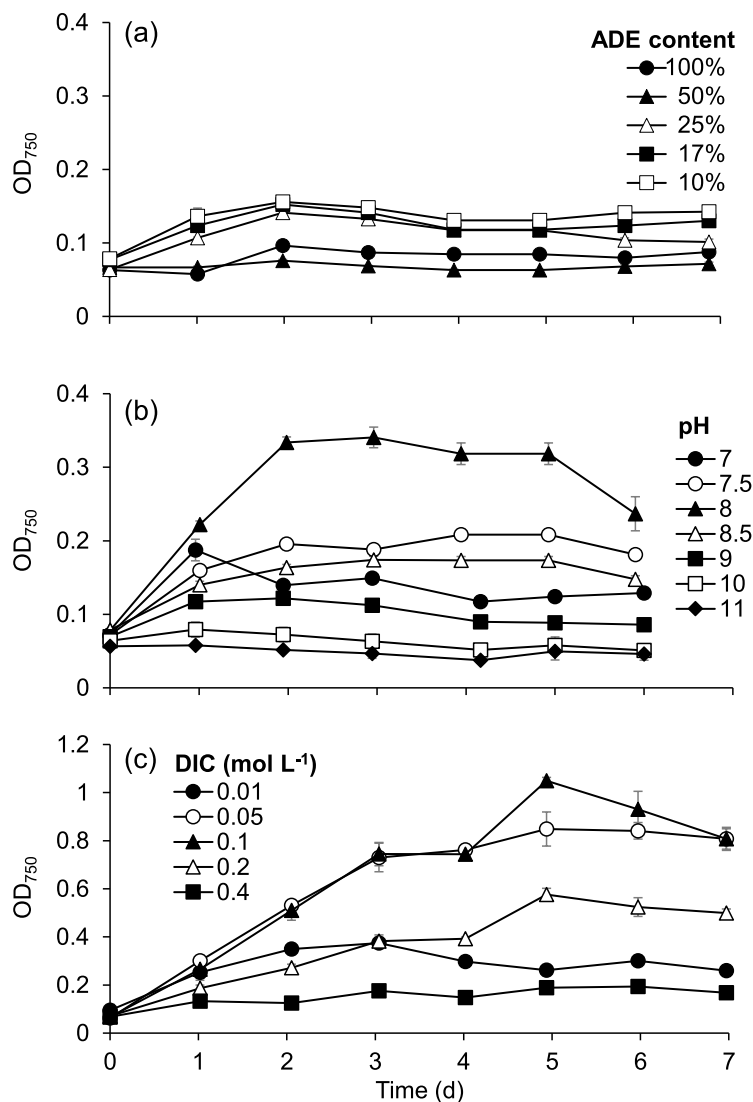


Fig 2. Growth curves of *Chlorella sorokiniana* under different (a) anaerobic digestion effluent (ADE) content, (b) initial pH, and (c) initial dissolved inorganic carbon (DIC) concentrations. Growths are expressed in optical density at 750 nm (OD₇₅₀) with means \pm standard deviation (N = 3).

でC培地と同等の最終 OD₇₅₀ が確認された (Fig. 3b)。特に Mn 添加区ではC培地の最大比増殖速度 $1.1 \pm 0.1 \text{ d}^{-1}$ に近い $0.83 \pm 0.03 \text{ d}^{-1}$ と最も高い値が得られた。一方で、Mg に加えて Fe、Zn、Co、Mo を添加した試験区では、単独添加試験と同様に、消化液区よりも低いか、あるいはほとんど増殖が見られなかった。

3.2. 2槽循環型ガス精製プロセスを用いた CO₂ ガス回収

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

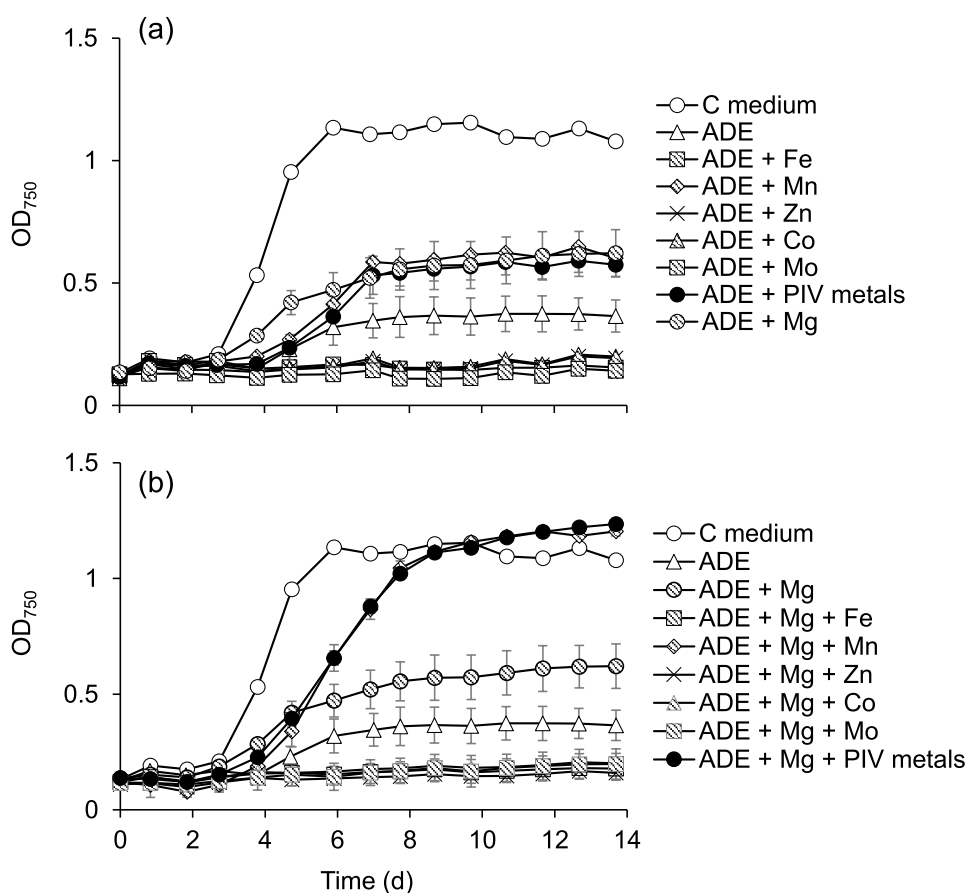


Fig 3. Growth curves of *Chlorella sorokiniana* in diluted anaerobic digestion effluent (ADE) with various metal supplementing conditions; (a) only PIV trace metals; and (b) combinations of Mg and PIV metals. Growths are expressed in optical density at 750 nm (OD_{750}) with means \pm standard deviation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

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

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

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

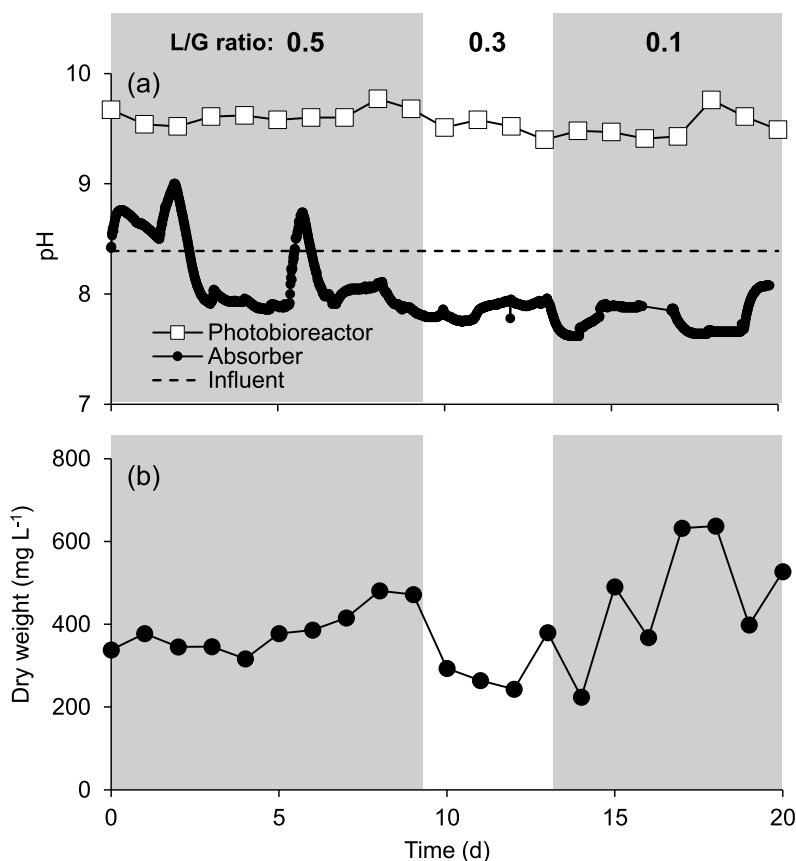


Fig 4. Two-phase CO₂ recovery and algal culture (a) pH and (b) algal cell dry weight. Liquid to gas (L/G) ratio was changed from 0.5 to 0.1 in two steps.

4. 考 察

4.1. 消化液培地の最適化

4.1.1. 消化液濃度、初期 pH、溶存無機炭素濃度

消化液添加濃度は 10 ~ 25% で比較的良好な増殖が確認された (Fig. 2a)。高濃度条件で増殖が見られなかった原因は、高い遊離 NH₃ 濃度にあると考えられる。水に溶けた NH₄ は pH が高いほど NH₃ に遊離した状態の割合が高くなり、25℃の淡水における pKa は 9.25 である (Bates & Pinching 1949)。消化液原液の NH₄-N 濃度は約 1000 mg L⁻¹ であり、培養初日 pH 8.98 の遊離 NH₃ 濃度は約 450 mg-N L⁻¹ つまり 32 mmol L⁻¹ と試算された (Anthonisen et al. 1976 より試算)。本研究と同じ *Chlorella sorokiniana* NIES-2173 株を用いた既往研究によると、本株の遊離 NH₃ に対する EC₅₀ は 1.6 mmol L⁻¹ であり、3 mmol L⁻¹ 以上ではほとんど増殖

を示さなかった (Sekine et al. 2020)。本研究での消化液原液の遊離 NH₃ 濃度は本株の耐性の 10 倍以上の高濃度であり、これが原因で増殖が見られなかったと示唆された。一方、消化液濃度 10% 条件では pH が 8.56 まで低下したことも相まって遊離 NH₃ 濃度は 1.2 mmol L⁻¹ まで低下し、比較的高い増殖となったと考えられる。ところが 10% と類似した増殖が得られた 17 ~ 25% 濃度条件でも遊離 NH₃ 濃度は 3.0 ~ 4.5 mmol L⁻¹ であり、EC₅₀ を 2 倍程度越えていた。既往研究において NH₃ 阻害の度合いは初期バイオマス濃度が高くなると緩和されることが報告されている (Uggetti et al. 2014)。既往研究の EC₅₀ 1.6 mmol L⁻¹ (Sekine et al. 2020) は初期光学密度が約 0.02 で試験されており、本研究では 0.05 以上と 2 倍以上で設定したため、阻害が緩和されていた可能性がある。本研究では遊離 NH₃ 濃度が常に EC₅₀ 以下となる 10% 濃度条件を最適値と定め、そ

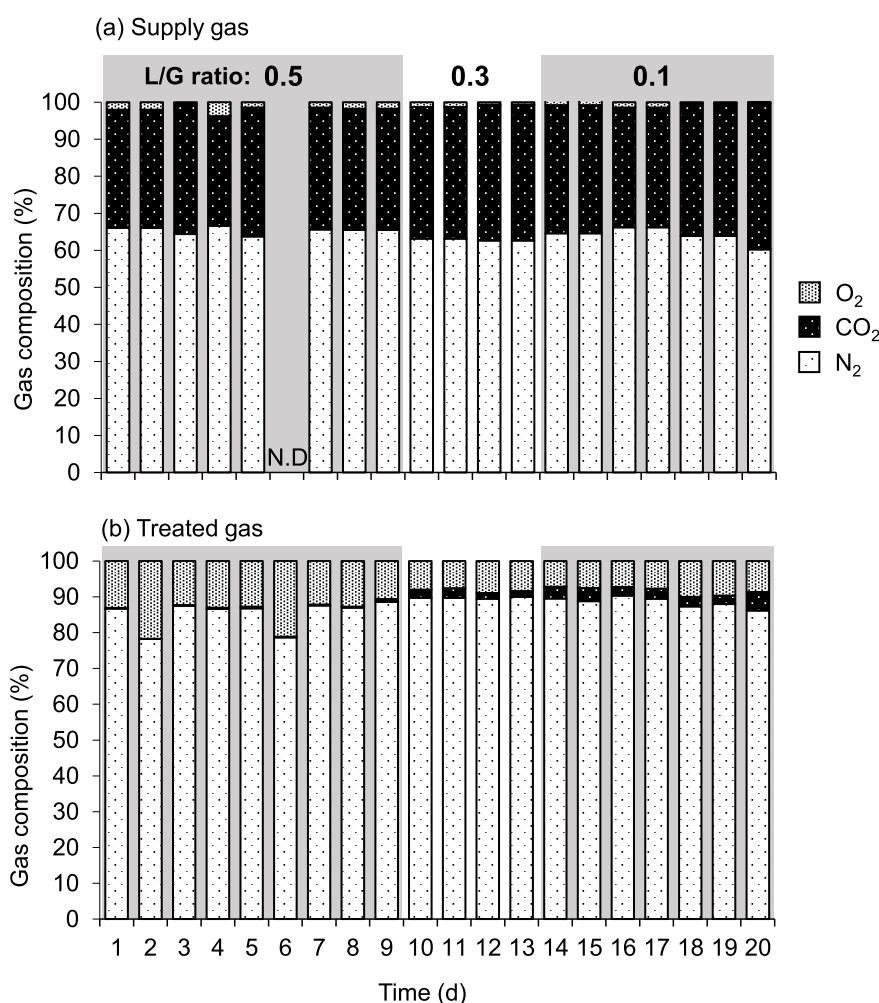


Fig. 5. Gas composition during the two-phase CO₂ supply and algal culture in (a) supply gas and (b) treated gas. Liquid to gas (L/G) ratio was changed from 0.5 to 0.1 in two steps.

の後の実験に供した。

続く pH の最適化では、pH10 未満の条件で増殖が確認された (Fig. 2b)。pH10 以上の条件では遊離 NH₃ が 6.4 mmol L⁻¹ を越え、増殖を完全に抑制していたと考えられる。一方で pH7 ~ 8.5 では遊離 NH₃ は 1.1 mmol L⁻¹ 以下であり、増殖をほとんど妨げない濃度だったと示唆された。その中で pH8 条件では突出して高い増殖が見られた。その明確な原因は不明であるが、繰り返し試験 (N = 6) を行ったところ、ほぼ同様の結果が得られたことから、測定誤差の可能性は棄却された。pH8 で増殖が高かった要因の一つの可能性として、消化液培地の DIC の低さが考えられる。後述の異なる DIC 濃度最適化試験で、最も低い DIC 濃度 0.01 mol

L⁻¹ 条件では、0.05 ~ 0.1 mol L⁻¹ と比較して増殖が大きく抑制された。消化液原液の DIC は約 1000 mgC L⁻¹ であったが、70°C 1 時間の滅菌処理および 10 倍希釈によって DIC 濃度が減少していた可能性がある。そのため、pH 最適化実験でも DIC が増殖の律速になっていた可能性がある。pH はアルカリ性に傾くほど空気中の CO₂ を取り込みやすく、また *Chlorella* 属は重炭酸を炭素濃縮機構によって光合成に利用できることから (Beardall & Raven 1981, Fan et al. 2015)、pH7 や 7.5 の条件よりも pH8 で増殖が高くなった可能性がある。その他の要因として pH 変化に伴う金属分の遊離などが考えうるが、確かなところは今後の研究が必要である。

DIC 濃度条件では、0.05 mol L⁻¹ と 0.1 mol L⁻¹ の条

件で最も高い増殖が得られた。上述のとおり、最も添加量の少ない 0.01 mol L^{-1} ではおそらく DIC 律速のために増殖が抑制された。一方で、 0.2 mol L^{-1} 以上の条件で十分な増殖が得られなかった要因として考えられるのは、高イオン強度である。本実験では、DIC 濃度の調整に NaHCO_3 を使用した。本種は淡水種であり、DIC 濃度が増加するにつれて培地中の Na 塩が増加し、増殖が低かったと考えられる。

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

4.1.2. 金属群

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

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

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

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

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

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

4.2. 2槽循環型ガス精製プロセスを用いたCO₂ガス回収

最適化された消化液培地を用いた2槽循環型ガス精製プロセスを実施した。実験期間を通して各槽のpHは比較的安定していた。供給培地から培養槽にかけてはpHが約8.4から約9.6まで上昇し、その後吸収塔で7.8～8.2程度へと減少した(Fig. 4a)。これは培養槽において培地中のDICを消費することでpHが上昇し(Zeebe & Wolf-Gladrow 2001)、その後CO₂の溶解により再びpHが減少したことを示している。吸収塔のpHはL/G比0.5から0.1にかけて減少させると、培地に対するCO₂の供給割合が増加するため、塔内のpHはやや低下した。この塔内のpH低下がL/G比0.3および0.1におけるCO₂回収率の漸減(91～94%)に影響したと考えられる。また、低L/G比でも培養槽に対するCO₂供給速度は変化しないため、L/G比0.1条件での低い吸収塔pHは培養槽pHに影響しなかった。

CO₂回収率は全体を通して90%以上の高い値を示し、特にL/G比0.5条件では99%とほぼすべての

CO₂が溶解した。一方で同条件ではO₂の混入割合が14%と高く、微細藻類培地の溶存酸素が精製ガスに多く溶け出した。L/G比を0.3、0.1と下げるとCO₂回収率はそれぞれ94、91%と減少する一方で、O₂混入割合が8%程度まで減少した。このようにL/G比は低いとCO₂吸収が不十分となる一方で、高すぎると培養液から酸素がより多く混入してしまうことが確認された。

2槽循環型ガス精製プロセスを用いた既往研究でも同様な傾向が見られている。例えば開放系リアクターで微細藻類バクテリア共生系を用いてバイオガス精製を行った既往研究では、CO₂濃度はL/G比1から0.5にかけては1%以下の非常に低い値を取る一方、L/G比0.3では8.3%まで急激に増加した(Toledo-Cervantes et al. 2017)。同既往研究でO₂濃度はL/G比1の際の0.8%から、L/G比0.8、0.5にかけて0.1%、0.01%と減少した。このようにL/G比の影響は培養槽やリアクター形状など複数の要因によって異なるため、リアクター運転条件に応じて精製ガス中のCO₂及びO₂濃度を低く保つ最適条件を検討する必要がある。

本研究のL/G比0.5における精製ガス中のCO₂濃度は既往研究の中でも低く、高いCO₂回収率が得られたことがわかった(Table 3)。一方で、同程度の

Table 3. Comparison of CO₂ gas upgrading performance using two-phase recirculation process.

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

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

CO₂回収率が得られる条件で、他の研究よりもO₂混入量が多かった。これにはいくつかの要因が絡んでいると考えられる。

まず始めに、用いた微生物の違いが影響した可能性がある。既往研究の多くが微細藻類バクテリア共生系によるH₂SやNH₄の酸化も同時に目的としており (Posadas et al. 2015, Toledo-Cervantes et al. 2016, 2017)、有機物の分解も含めて系内で酸素が活発に利用される状態であった。これらの系列では精製ガスへのO₂混入量は最適条件下で0.01～1.2%であり (Table 3)、L/G比を60程度まで高くしても7%程度に保たれた (Toledo-Cervantes et al. 2016)。一方の微細藻類純粋培養を用いた研究では、特に閉鎖系培養槽を用いた場合は最適条件でも6%と高いO₂混入量が見られた (Meier et al. 2015)。本研究でも*C. sorokiniana*の純粋培養を用いたため、他の微生物による酸素消費が起こらず、O₂混入量が高くなったと考えられる。

次に、培養槽の形状も関係すると考えられる。これまでの多くの研究が開放系培養池を用いたが、常に外気と気液交換が行われることと、光路長が長く (0.15～0.3 m) 容積あたりの酸素生成量が低いため、本研究よりも溶存酸素が空気平衡と近い値だったことが推察される。本研究のように閉鎖系培養槽で光路長が短い (0.05 m) 場合は十分に溶存酸素が除去されず、CO₂吸収塔で精製ガスに酸素が混入してしまった可能性がある。

最後に、微細藻類培養槽 (PBR; photobioreactor) 容積に対するバイオガスの供給量 (Gas/PBR) 比も関係する (Meier et al. 2015)。培養槽に対する炭素供給量が不足すると、培地はアルカリ性に傾き、よりCO₂を吸収しやすい状態になる。そうすると低いL/G比でもCO₂の溶解に対する推進力が増加し、高いCO₂回収率が得られる。既精製ガス中のCO₂とO₂割合が共に低かった研究は0.32以下のGas/PBR比で実施されている (Table 3)。本研究で用いたGas/PBR比は1.83だったため、CO₂溶解の推進力が低く、高いO₂混入量に起因したと考えられる。

CO₂溶解の推進力の低さは、炭素収支の結果からも確認された。培養槽と培地のDICを比較したとき、 $208 \pm 83 \text{ mgC L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ の速度で減少したのに対し、微細藻類の炭素固定速度は $94.3 \pm 71.5 \text{ mgC L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ であった。この差分は曝気によりCO₂として系外に排出されていると考えられ、系外排出のDIC減少全量に対する寄与率は55%であった。同様の結果は海産藻類*Nannochloropsis gaditana*を用いて高いGas/PBR比1.05で実施した研究でも確認されており、バイオガス由来無機炭素の46%が系外にCO₂として排出された (Meier et al. 2015)。一方、同じ研究でGas/PBR比を0.11まで減少させたところ、バイオガス由来の無機炭素だけでは増殖を維持できず、系外のCO₂が培養液中に吸収され光合成に利用された (Meier et al. 2015)。本研究で用いた実験系でもGas/PBR比を最適化することで、より性能の高いバイオガス精製を実施できる可能性がある。さらに、CO₂溶解の推進力を向上させるには、高アルカリ性藻類を用いることも想定され、実際に高いCO₂回収率がこれまで示されている (Chi et al. 2011, Kishi et al. 2019)。しかし消化液を用いた高アルカリ性種の培養には大量のアルカリ剤が必要であるため、消化液での同様の研究が待たれる。

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

以上のように今後運転条件を制御することで、メタン発酵で排出される廃棄物であるCO₂ガスや消化液を資源化し、微細藻類バイオマスの生産に利用可能であることが示された。本技術は燃料単価の低いバイオガスを高純度メタンにし、微細藻類バイオマスを高価値資源として利用できるようにすることで、メタン発酵を起

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

5. 結 論

本研究では、下水汚泥を基質としてメタン発酵消化液を用いた消化液培地の添加濃度と初期 pH に加えて、DIC 濃度と金属群を調整することで、消化液中の栄養塩を微細藻類の培地として使用することが可能であることが示された。特に金属群の調整では、メタン発酵の基質によって消化液中の金属群の組成が変化し、微細藻類の増殖に必要な金属群のうち調整が必要な金属類が変化することがわかった。メタン発酵バイオガス中の CO₂ ガスを除去する 2 槽循環型ガス精製プロセスにメタン発酵槽から排出される消化液を微細藻類の培地として使用することで、バイオガスからの CO₂ ガス精製と有用な微細藻類を生産するための消化液の有効利用を同時に行うことが可能である。本研究では、この 2 槽循環型ガス精製プロセスの微細藻類の培養槽に、閉鎖型のフラットパネル型リアクターを用いて L/G 比を 0.3 ~ 0.5 に設定することで、高い CO₂ 回収率を保ったまま高いバイオマス生産性を達成することが可能であることがわかった。従来大型培養槽を用いることなく省スペースで供給ガス中の CO₂ ガスをほぼすべて精製ガス中から除去可能であることが明らかとなった。今後は O₂ 混入を防ぐための条件の検討が必要となる。

謝辞

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

引用文献

- Ángeles R, Arnaiz E, Gutiérrez J, Sepúlveda-Muñoz CA, Fernández-Ramos O, Muñoz R, Lebrero R (2020) Optimization of photosynthetic biogas upgrading in closed photobioreactors combined with algal biomass production. *J Water Process Eng* 38: 101554.
- Anthonisen AC, Loehr RC, Prakasam TB, Srinath EG (1976) Inhibition of nitrification by ammonia and nitrous acid. *J Water Pollut Control Fed* 48: 835–852.
- Ban S, Toda T, Koyama M, Ishikawa K, Kohzu A, Imai A (2019) Modern lake ecosystem management by sustainable harvesting and effective utilization of aquatic macrophytes. *Limnology* 20: 93–100.
- Bates RG, Pinching GD (1949) Acidic dissociation constant of ammonium ion at 0 to 50°C, and the base strength of ammonia. *J Res Natl Bur Stand* (1934) 42: 419–430.
- Beardall J, Raven JA (1981) Transport of inorganic carbon and the 'CO₂ concentrating mechanism' in *Chlorella emersonii* (Chlorophyceae). *J Phycol* 17: 134–141.
- Chi Z, O'Fallon JV, Chen S (2011) Bicarbonate produced from carbon capture for algae culture. *Trends Biotechnol* 29: 537–41.
- Chi Z, Xie Y, Elloy F, Zheng Y, Hu Y, Chen S (2013) Bicarbonate-based Integrated Carbon Capture and Algae Production System with alkalihalophilic cyanobacterium. *Bioresour Technol* 133: 513–521.
- Dębowski M, Szwaja S, Zieliński M, Kisielewska M, Stańczyk-Mazanek E (2017) The influence of anaerobic digestion effluents (ADEs) used as the nutrient sources for *Chlorella* sp. cultivation on fermentative biogas production. *Waste Biomass Valorization* 8: 1153–1161.
- Fan J, Xu H, Luo Y, Wan M, Huang J, Wang W, Li Y (2015) Impacts of CO₂ concentration on growth, lipid accumulation, and carbon-concentrating-mechanism-related gene expression in oleaginous *Chlorella*. *Appl Microbiol Biotechnol* 99: 2451–2462.
- González-López CV, Acien Fernández FG, Fernández-Sevilla JM, Sánchez Fernández JF, Molina Grima E (2012) Development of a process for efficient use of CO₂ from flue gases in the production of photo-

- synthetic microorganisms. *Biotechnol Bioeng* 109: 1637–1650.
- Guazon NG, Nakahara H, Yoshida Y (1994) Inhibitory effects of heavy metals on growth and photosynthesis of three freshwater microalgae. *Fish Sci* 60: 379–384.
- Ichimura T (1971) Sexual cell division and conjugation-papilla formation in sexual reproduction of *Closterium strigosum*. *Proc 7th Int Seaweed Symp* 208–214.
- Keffer JE, Kleinheinz GT (2002) Use of *Chlorella vulgaris* for CO₂ mitigation in a photobioreactor. *J Ind Microbiol Biotechnol* 29: 275–280.
- Kimura S, Yamada T, Ban S, Koyama M, Toda T (2019) Nutrient removal from anaerobic digestion effluents of aquatic macrophytes with the green alga, *Chlorella sorokiniana*. *Biochem Eng J* 142: 170–177.
- Kishi M, Yamada Y, Katayama T, Matsuyama T, Toda T (2019) Carbon mass balance in *Arthrospira platensis* culture with medium recycle and high CO₂ supply. *Appl Sci* 10: 228.
- Meier L, Pérez R, Azócar L, Rivas M, Jeison D (2015) Photosynthetic CO₂ uptake by microalgae: An attractive tool for biogas upgrading. *Biomass Bioenergy* 73: 102–109.
- 中川悦光 (2003) ふん尿とエネルギー利用による循環型社会を目指して 八木バイオエコロジーセンターの稼働状況の報告. *システム農学* 19: 9–20.
- 中村真人 (2011) メタン発酵消化液の液肥利用とその環境影響に関する研究. *農村工学研究所報告* 50: 1–57.
- Park J, Jin HF, Lim BR, Park KY, Lee K (2010) Ammonia removal from anaerobic digestion effluent of livestock waste using green alga *Scenedesmus* sp. *Bioresour Technol* 101: 8649–8657.
- Posadas E, Serejo ML, Blanco S, Pérez R, García-Encina P, Muñoz R (2015) Minimization of biomethane oxygen concentration during biogas upgrading in algal–bacterial photobioreactors. *Algal Res* 12: 221–229.
- Provasoli L (1960) Artificial media for fresh-water algae: problems and suggestions. *Ecol Algae Spec Pub* 2: 84–96.
- Sekine M, Yoshida A, Akizuki S, Kishi M, Toda T (2020) Microalgae cultivation using undiluted anaerobic digestate by introducing aerobic nitrification–desulfurization treatment. *Water Sci Technol* 82: 1070–1080.
- Serejo ML, Posadas E, Boncz MA, Blanco S, García-Encina P, Muñoz R (2015) Influence of biogas flow rate on biomass composition during the optimization of biogas upgrading in microalgal–bacterial processes. *Environ Sci Technol* 49: 3228–3236.
- Toledo-Cervantes A, Madrid-Chirinos C, Cantera S, Lebrero R, Muñoz R (2017) Influence of the gas–liquid flow configuration in the absorption column on photosynthetic biogas upgrading in algal–bacterial photobioreactors. *Bioresour Technol* 225: 336–342.
- Toledo-Cervantes A, Serejo ML, Blanco S, Pérez R, Lebrero R, Muñoz R (2016) Photosynthetic biogas upgrading to bio-methane: Boosting nutrient recovery via biomass productivity control. *Algal Res* 17: 46–52.
- Uggetti E, Sialve B, Latrille E, Steyer JP (2014) Anaerobic digestate as substrate for microalgae culture: The role of ammonium concentration on the microalgae productivity. *Bioresour Technol* 152: 437–443.
- Van Den Hende S, Vervaeren H, Boon N (2012) Flue gas compounds and microalgae: (Bio-)chemical interactions leading to biotechnological opportunities. *Biotechnol Adv* 30: 1405–1424.
- Xia A, Murphy JD (2016) Microalgal Cultivation in treating liquid digestate from biogas systems. *Trends Biotechnol* 34: 264–275.
- Zeebe R, Wolf-Gladrow D (2001) CO₂ in Seawater: Equilibrium, Kinetics, Isotopes. Elsevier Science B.V., Amsterdam, 100 pp.