

## (22) 活性汚泥中の糸状体量の測定とその意味

山梨大学 工学部

○河野 哲郎

石川島播磨重工業 技術研究所

福永 栄

### 1 はじめに

活性汚泥の膨化はプラントの維持において、最も困難な問題である。膨化は糸状性・非糸状性とに分けられるがいずれの膨化であるかの区別、あるいは、糸状体量と沈降性との間の関連性と言った点については、十分に明らかであるとは、現在、言いがたい。活性汚泥中の糸状体量の測定は、沈降性の指標 S V I が総合的である点を補って、より具体的な情報を示すものと期待され重要な点であると考えられる。

演者らは、Olson<sup>1)</sup>の考案した考え方をを用いることにより、活性汚泥中の糸状体量の測定を試みて来た。この結果を始めに報告する。次に、実際プラントの活性汚泥を用いて、膨化の程度を示す指標として、先に提案した S S V I<sup>2)</sup>を用いて糸状体量と沈降性との関連性について述べる。

### 2 比糸状体長の測定方法

乾重 1gr の活性汚泥中の糸状体長を比糸状体長  $L_{sp}$  として測定する方法について述べる。

#### 2-1 Olson の考え方

長さ  $\ell$  の一定の直線の  $x$  軸方向への投影長は Fig. 1 を参照して、 $|\ell \cos \theta|$  ( $0 \leq \theta < \pi$ ) と示せる。この投影長の期待値  $\bar{\ell}$  は、直線と  $x$  軸の交角  $\theta$  が一様分布、すなわち  $\Pr(\theta < \theta + d\theta) = d\theta / \pi$  とすると (1) 式で示せる。

$$\bar{\ell} = E(|\ell \cos \theta|) = 2\ell / \pi \quad (1)$$

次に長さ  $\ell_j$  ( $j = 1, 2, \dots, n$ ) が各々異なる場合は、それぞれの投影長の合計の期待値  $X$  を  $L = \sum \ell_j$  として、

$$\begin{aligned} X &= E(\sum \ell_j |\cos \theta_j|) \\ &= \sum 2\ell_j / \pi = 2L / \pi \end{aligned} \quad (2)$$

となり (1) 式と同じ結果となる。Olson の示した方法は、等間隔  $d$  の  $(n+1)$  本の格子線をそれぞれ  $x$  軸、 $y$  軸方向にとり、この正方形内の糸状体長の合計を次の様にして求めている。すなわち、 $x$  軸、 $y$  軸方向の各々  $n$  本の格子線と糸状体が交差する数の合計の平均に  $\pi/2$  と格子巾  $d$  を乗じて正方形内の全糸状体長  $L$  に近似するものである。Fig. 2 に例を示した。

2-2 活性汚泥中の糸状性細菌の比糸状体長の測定手順  
活性汚泥中の糸状体長を測定するとき、幾つかの問題点がある。

- i) Photo 1、Photo 2 に示したように、糸状体が塊りになったり、束状になったものはどの様にみなすか？
- ii) ズーグレア状のクロック内にある糸状体はどの様にみなすか？
- iii) ズーグレア状のフロックから多数の糸状体が放射状に出ているものの存在は i)、ii) の場合と同様に計測の誤

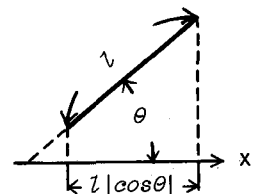


Fig. 1

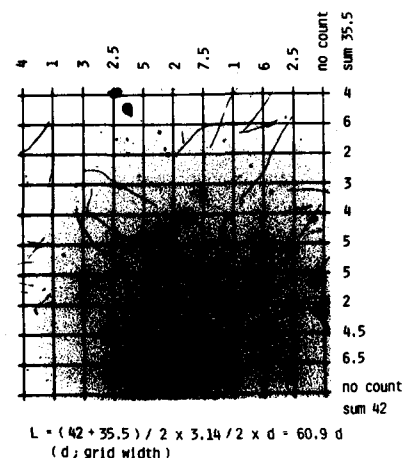


Fig. 2 Representation of Olson's Method  
Note. When the end of a filament is just on a line, number of intersection is 0.5.

差を大きくする。

沈降性との関連で比糸状体長を測定しようとするれば活性汚泥に何ら処理を加えない方が望ましいと考えられるが、測定の精度をあげることに、全量をできるだけおさえることを目的とし、汚泥試料をワーリング・ブレンダーでホモジナイズしたのち、試料を希釈し、格子入りのメンブランフィルター（ミリポアHAWG 025）上に、一定量をろ過することにより、糸状体のフィルター面上への分散を一様にする方法を用いた。フィルター上の糸状体の光学密度を増すため、桜井<sup>3)</sup>の示した方法を用いた。染色後、乾燥（60℃ 1晩）し、スライドガラス上の油浸オイルの上に、不要な部分を切り落としたフィルターを載せ透明にした。次にフィルター上に油浸オイルを一滴おき、カバーガラスをのせたのち、メンブラン・フィルターの格子を目安にして、1試料につき視野を変え顕微鏡写真を12枚から36枚とり、印画紙上の10cm×10cmの正方形内の格子線との交叉数を計数して、計測視野内糸状体長Labを求めた。対物レンズは10倍か20倍のplan apochromatを用い、フィルムはミニコピー、印画紙は月光のV3のキャビネを用いた。

直接、方眼ミクロメーターを使用して測定することも可能である。測定は汚泥試料FS、FH以外は写真をとって行った。比糸状体長Lspは、(3)式で求めた。

$$L_{sp} = Lab \div Mab \times S_F \div Sab \times 10^m \div x \div w$$

$$= Lab \times Mab \times S_F \times 10^{m-2} \div x \div w \quad (3)$$

ただし

Lab； 接眼a倍、対物b倍のもとでの印画紙上の10cm×10cmの計測面積内での全糸状体長（cm）

Mab； 接眼a倍、対物b倍のもとでの総合倍率

Sab； 10cm×10cmの計測部分の実面積（cm<sup>2</sup>）  
（10<sup>2</sup>/Mat<sup>2</sup>に等しい）

S<sub>F</sub>； フィルター有効ろ過面積（1.84cm<sup>2</sup>）

10<sup>m</sup>/x； 希釈倍率；すなはち、ホモジナイズした試料を10<sup>m</sup>倍希釈したのちxmlろか。

w； 希釈前の試料中の汚泥乾重量（gr/ml）

Fig. 2に写真を用いた時の計数例を示した。格子板はOHP用紙に0.1mm巾の格子線をひいたものを用いてある。

### 2-3 Olsonの方法の信頼性

Fig. 3は、0.1mm巾の直線の計測格子線数を10、15、20、として同一の写真をそれぞれ計数した時の10cm×10cm内の全糸状体長の値と、写真の計測面積内の実糸状体長をデバイダーで実測した値との比をとった結果を示したものである。

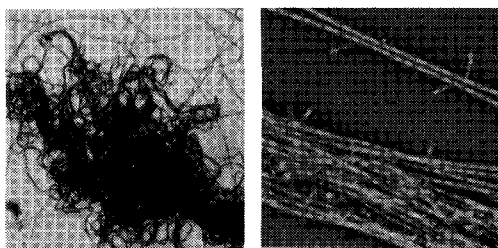


Photo 1 Entangled filaments      Photo 2 Tufted filaments

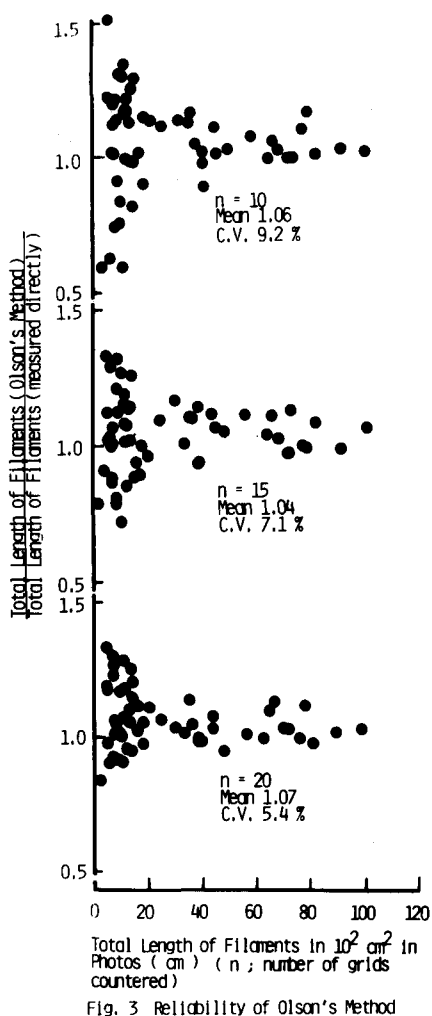


Fig. 3より以下の点に分かる。

- i) 幾分大きめの値が測定されるが、比は1と考えてさしつかえない。
- ii) 10 cm×10 cmの印画紙上で長さ(Lab)が長くなると誤差が小さい。
- iii) 計測格子線数が多いと誤差が小さい。

以後の測定はすべて計測格子線数20で計数を行った。

#### 2-4 ホモジナイズ時間の効果

ホモジナイズは、日本精機のワーリング・ブレンダーを用い18000rpm、20ml容量のもので行った。凍結乾燥後保存しておいた沈降性の異なる3種類の汚泥(TK, YN, NS)と、活性汚泥から分離したSphaerotilus T-2株と、下水溝から分離したSphaerotilus T-7株を用いてホモジナイズ時間の効果を調べた。汚泥試料の場合がFig. 4で、ホモジナイズ時間の経過とともにLspの値は増加しその後一定の値をとる傾向がある。Table1にSphaerotilusを用いた結果を示した。この試料は凍結乾燥をしていない。数分程度で値がほぼ一定することがわかる。Table1の結果は後ほど述べる希釈によって値の最も大きくなった時のもので、この結果を用いて糸状体の回収率を計算することが出来る。糸状体の平均の巾を $\delta$ 、湿密度を $\rho_s$ 、菌体の水分含有率を $C_w$ とすると、回収率Rは(4)式で示される。

$$R = Lsp \times \pi \delta^2 \div 4 \times \rho_s \times (1 - C_w) \quad (4)$$

巾の測定は、クリスタルバイオレットで染色後、対物100倍を用い、明視野で顕微鏡写真をとって行った。 $\delta$ の値は、T-2株が1.28 $\mu$ 、T-7株は1.45 $\mu$ である。 $\rho_s$ はアラビアゴムを用いた不連続密度勾配法<sup>4)</sup>によった。遠心は2800rpmで20分を行った。含水率 $C_w$ は、遠沈洗浄後の菌体のペレットをメンブラン・フィルター上にのせ、減圧下で水を十分に切ったのち、秤量ビンを用いて測定した湿重量と、80℃で数時間と104℃で2時間乾燥し、放冷したのちの乾重量との差を測定して求めた。T-7株は死滅して $\rho_s$ と $C_w$ は測定出来ていないので、T-2株の結果を用いた。T-2株で $C_w$ は平均0.819であり、 $\rho_s$ は、1.04 gr/cm<sup>3</sup>と1.05 gr/cm<sup>3</sup>の間に菌体が層となったため1.045gr/cm<sup>3</sup>と評価した。回収率をTable1中に示した。値が15%から10%程度低めである。これは、ホモジナイズの結果、写真上で糸状体とみなさない部分が生じたためと考えられる。しかしながら、活性汚泥の場合、糸状体がSphaerotilusと同様の結果を示すか否かは判断出来ないで、活性汚泥の場合は値がほぼ最大で一定になる時間までホモジナイズすることが必

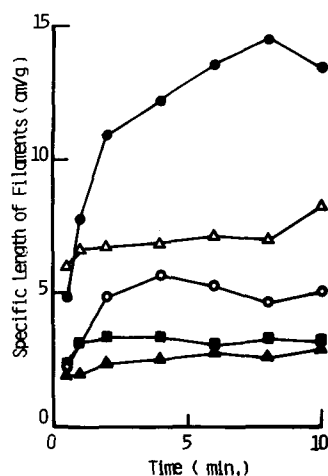


Fig. 4 Effect of Homogenization Time on Specific Length of Filaments

● TK/911 (Wide Filaments)  $\times 10^7$   
● TK/911 (Total)  $\times 10^6$   
▲ YN/911 (Wide Filaments)  $\times 10^6$   
▲ YN/911 (Total)  $\times 10^5$   
■ NS/911 (Total)  $\times 10^5$

Table 1 Effect of Homogenization Time on the Recovery of Filaments

| Sphaerotilus T-7           |      |      |      |      |
|----------------------------|------|------|------|------|
| Homogenization Time (min.) | 1    | 6    | 10   |      |
| Lsp ( $\times 10^8$ cm/g)  | 2.86 | 2.97 | 2.82 |      |
| Recovery                   | 0.89 | 0.93 | 0.88 |      |
| Sphaerotilus T-2           |      |      |      |      |
| Homogenization Time (min.) | 3    | 5    | 7    | 9    |
| Lsp ( $\times 10^8$ cm/g)  | 3.55 | 3.85 | 3.78 | 3.53 |
| Recovery                   | 0.86 | 0.94 | 0.92 | 0.86 |

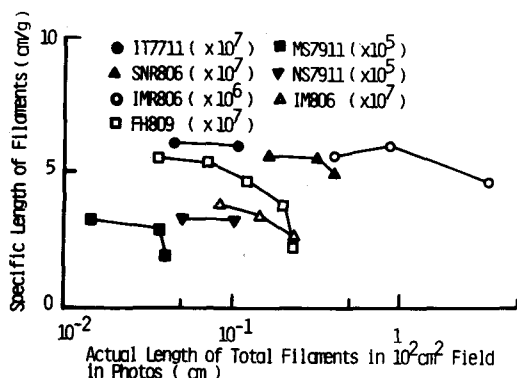


Fig. 5 Effect of Dilution on the Value of Specific Length of Filaments

要であると考えた。

## 2-5 希釈の効果

Fig. 5に、測定視野内の全糸状体の実長と比糸状体長  $L_{sp}$  との関係を示した。希釈段階を大きくしていくと、 $L_{sp}$  の値が増加したのち一定の値をとる傾向のあることが分かる。希釈の段階が小さいと、比糸状体長の大きい試料では糸状体がからまりあう結果であり、比糸状長の小さい試料では破壊されかかっているズーグレア状のフロックにかくれる糸状体が増加する結果、それぞれ、 $L_{sp}$  の値が小さめになる。必要な希釈の程度は試料により一定しないようであるが、 $L_{sp}$  値に大差のない所まで希釈することが必要である。

## 2-6 測定の精度

ホモジナイズ時間と希釈の各々に対して、 $L_{sp}$  が最大である所を選べば良いのであるが、所要の精度を得るためには、視野が何個必要かという点が問題となる。

1回の測定の誤差を変動度係数  $C.V.$  で示せば  $n$  回の測定の平均には  $C.V./\sqrt{n}$  の誤差がみこまれる。Fig. 6に計測視野内糸状体長  $L_{ab}$  と変動度係数の関連を示した。図中に格子区間数 20 の場合の Olson の方法に結果する変動度係数も区間平均して示しておいた。Olson の方法に起因する誤差を  $C.V._o$ 、糸状体がメンブラン・フィルター上に均質に分散していないことに起因する誤差を  $C.V._d$ 、全体の誤差を  $C.V._T$  とすると  $C.V._d^2 = C.V._T^2 - C.V._o^2$  であるが、Fig. 6で、 $C.V._T^2 \div C.V._d^2$  であることから、測定の誤差は、主に、糸状体のメンブラン・フィルター上の分布の不均質性に結果することが分かる。

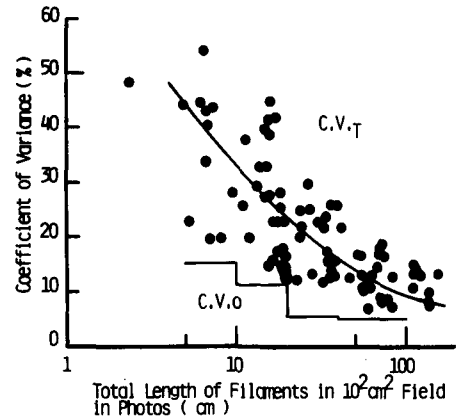


Fig. 6 Relationship between Total Length of Filaments in  $10^2$  cm<sup>2</sup> Field in Photos and its Coefficient of Variance

## 3 比糸状体長および比糸状体体積と沈降性との関連性

### 3-1 沈降性の指標について

Fig. 7は、測定時の  $SS$  濃度の変化に伴って、 $SVI$  の値は一定のパターンで変動することを示している。<sup>2)</sup> Fig. 7中の  $SV^X$  は 30分沈降率が  $X\%$  である

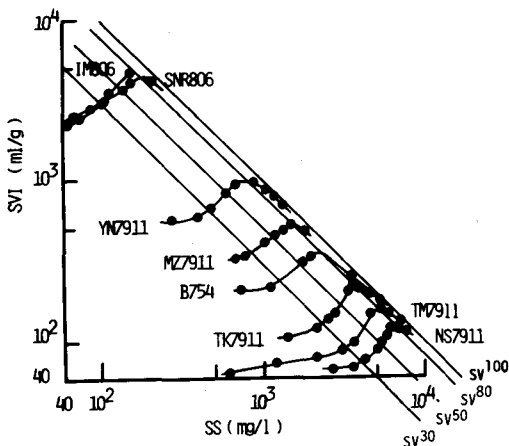


Fig. 7 Relationship between  $SS$  and  $SVI$

ときの  $SS$  濃度と  $SVI$  の関係を示している。活性汚泥では " $30 \leq X < 80\%$  位までの間で、 $\log SVI$  は  $\log SS$  に対して傾きが約 1 程度で増加し、 $X$  が 80% 程度で  $SVI$  の最大値を取り、その後  $SS$  の増加と共に  $SVI$  の値は減少する"、と言う変動をとるものが多い。同様の観察を Bryant Fitch ら<sup>5)</sup> も報告している。また、膨化の程度の大きいもの程、曲線が一般に上に位置する。<sup>2)</sup> したがって、膨化の程度を相互に比較する時は、 $SS$  濃度の  $SVI$  値への影響を除くことが必要である。30分沈降率が 50% である  $SVI$  の値を  $SSVI$  として、汚泥の膨化の程度を表示すると、合理的であることを先に報告した。<sup>2)</sup> しかしながら、その後  $SSVI$  は水温の違いによって値が異なる

ことが分かったため (Fig. 8)、今回の検討では水温を 20℃ とし、メスシリンダーはガラス性の 200ml の同一サイズのものに統一して測定を行なった。

### 3-2 比糸状体長と 20℃ での SSVI との関連性

Fig. 9 に比糸状体長と SSVI との関連性を示した。図中の MS は都市下水処理場、NS はし尿処理場、MK は蚕糸工場、YN と TK は味噌製造工場、MZ は工業寒天製造業、FS は製菓子、SNR、IM、IT、IMR は凍豆腐製造工場のそれぞれの処理施設の活性汚泥であることを示し、名称のあとの数字はサンプリングを行った時期を示している。FS 以外には、Photo3 に示したようなフロックを有するものはなかった。また、存在した糸状微生物は全て糸状細菌であった。Fig. 9 は比糸状体長の増加が沈降性の悪化を比較的良好に説明しているが、定量的な関連性は少し乏しい。また、FS の汚泥は Photo3 に示したような細胞外に多量の莢膜物質を蓄積した典型的な非糸状性バルキング汚泥であるが、他の糸状性バルキング汚泥との区別が乏しい。

### 3-3 比糸状体体積と沈降性との関連性

本方法で比糸状体長を測定する時、糸状体巾の異なるものの区別が可能である。そこで、巾の大きいものと細いものとに区別して比糸状体長を測定し、別に糸状体の巾  $\delta$  を求め、次式で示される比糸状体体積  $V_{sp}$  を求めた。

$$V_{sp} = \sum \pi \delta_j^2 L_{sp,j} / 4 (j = 1, 2, \dots) \quad (5)$$

糸状体の巾は、糸状体の形態的な差異から汚泥中の糸状体の区別が可能である<sup>6)</sup>ため、各タイプ別に巾を測定し、Table2 に示した。Table2 の中で  $V_{sp}$  を求めた手順も示してある。巾の近いものは、二乗平均の平方根で平均巾とした。比糸状体体積  $V_{sp}$  と SSVI の関連をみた結果が Fig. 10 で、糸状性細菌量の増加と沈降性の悪化

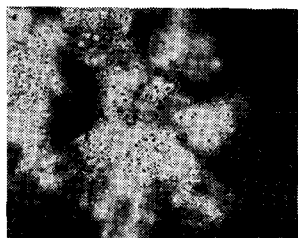


Photo 3  
Non filamentous bulking floc  
of activated sludge FS802  
( Negative staining

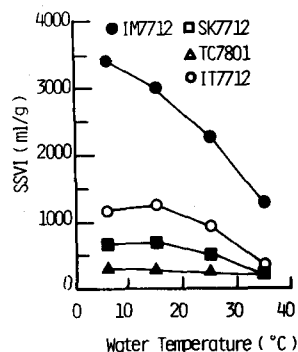


Fig. 8 Effect of Temperature on Settability

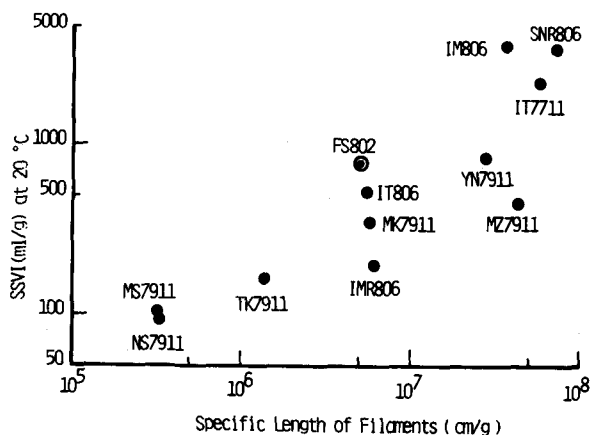


Fig. 9 Relationship between Specific Length of Filaments and Settability

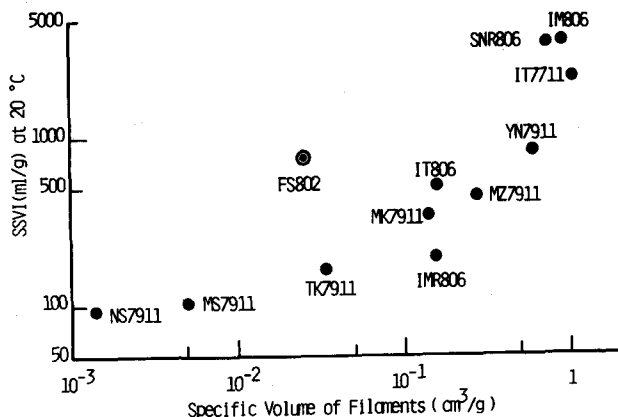


Fig. 10 Relationship between Specific Length of Filaments and Settability

Table 2 Calculation of Specific Volume of Filaments

| Types of Filaments<br>in Activated Sludges | Diameter ( $\mu$ ) |        | Lsp.1<br>( cm/g )  | Vsp.1<br>( cm <sup>3</sup> /g ) | Vsp.3<br>( cm <sup>3</sup> /g ) |  |
|--------------------------------------------|--------------------|--------|--------------------|---------------------------------|---------------------------------|--|
|                                            | Mean               |        |                    |                                 |                                 |  |
| IM806                                      |                    |        |                    |                                 |                                 |  |
| IM-1                                       | 2.66               | ) 1.25 | $1.06 \times 10^7$ | 0.589                           | 0.919                           |  |
| IM-2                                       | 1.31               |        | $2.69 \times 10^7$ | 0.330                           |                                 |  |
| IM-3                                       | 1.18               |        |                    |                                 |                                 |  |
| MZ911                                      |                    |        |                    |                                 |                                 |  |
| MZ-1                                       | 0.90               |        | $4.34 \times 10^7$ | 0.276                           | 0.276                           |  |
| SNR806                                     |                    |        |                    |                                 |                                 |  |
| SNR-1                                      | 2.04               | ) 1.94 | $1.25 \times 10^7$ | 0.369                           | 0.635                           |  |
| SNR-2                                      | 1.83               |        | $6.02 \times 10^7$ | 0.266                           |                                 |  |
| SNR-3                                      | 0.75               |        |                    |                                 |                                 |  |
| IT806                                      |                    |        |                    |                                 |                                 |  |
| IT-1                                       | 2.28               | 1.49   | $2.56 \times 10^6$ | 0.105                           | 0.156                           |  |
| IT-2                                       | 1.49               |        | $2.90 \times 10^6$ | 0.051                           |                                 |  |
| IMR806                                     |                    |        |                    |                                 |                                 |  |
| IMR-1                                      | 3.46               | ) 2.89 | $1.58 \times 10^6$ | 0.104                           | 0.152                           |  |
| IMR-2                                      | 2.17               |        | $4.53 \times 10^6$ | 0.048                           |                                 |  |
| IMR-3                                      | 1.16               |        |                    |                                 |                                 |  |
| YN911                                      |                    |        |                    |                                 |                                 |  |
| YN-1                                       | 2.55               | 1.23   | $0.70 \times 10^7$ | 0.357                           | 0.598                           |  |
| YN-2                                       | 1.23               |        | $2.03 \times 10^7$ | 0.241                           |                                 |  |
| IT7711                                     |                    |        |                    |                                 |                                 |  |
| IT-1                                       | 2.42               | 1.46   | $0.24 \times 10^7$ | 0.111                           | 1.02                            |  |
| IT-2                                       | 1.46               |        | $5.43 \times 10^7$ | 0.509                           |                                 |  |
| MK911                                      |                    |        |                    |                                 |                                 |  |
| MK-1                                       | 2.48               | 0.62   | $2.69 \times 10^6$ | 0.130                           | 0.139                           |  |
| MK-2                                       | 0.62               |        | $3.16 \times 10^6$ | 0.009                           |                                 |  |
| TK911                                      |                    |        |                    |                                 |                                 |  |
| TK-1                                       | 2.69               | ) 2.38 | $5.80 \times 10^5$ | 0.026                           | 0.034                           |  |
| TK-2                                       | 2.02               |        | $8.20 \times 10^5$ | 0.008                           |                                 |  |
| TK-3                                       | 1.27               |        |                    |                                 |                                 |  |
| FS802                                      |                    |        |                    |                                 |                                 |  |
| FS-1                                       | 1.0                | 0.5    | $2.6 \times 10^6$  | 0.02                            | 0.025                           |  |
| FS-2                                       | 0.5                |        | $2.4 \times 10^6$  | 0.005                           |                                 |  |
| MS7911                                     |                    |        |                    |                                 |                                 |  |
| MS-1                                       | 1.39               |        | $3.26 \times 10^5$ | 0.0049                          | 0.0049                          |  |
| NS7911                                     |                    |        |                    |                                 |                                 |  |
| NS-1                                       | 0.72               |        | $3.40 \times 10^5$ | 0.0014                          | 0.0014                          |  |

の関連性をFig. 9よりきれいに示している。

Fig. 10の結果にもとづいて、糸状性バルキングを発生させる糸状体の存在割合の評価を行ってみる。20℃でのSSVI値で200を膨化の目安とすれば、Vspは約 $0.08 \text{ cm}^3/\text{gr}$ である。Cwを幾つかの菌株で測定した所、*Bacillus cereus*; 0.696、*E. coli*; 0.753、*Saccharomyces cereviceae*; 0.722であり、*Flavobacterium*と見られる菌で0.772であった。T-2株の0.819を合せ、平均すると0.74である。菌体の湿密度はほぼ $1 \text{ gr}/\text{cm}^3$ とみなされる。これらの値から、約2.1%の存在量で膨化となることが指示される。

#### 4 まとめ

糸状体の存在量を比糸状体長Lsp,あるいは比糸状体体積Vspとして測定し、汚泥の膨化の程度との関連性を示した。こ

の中で、以下の点を示した。

- i) 比糸状体長の測定方法を示した。
- ii) 比糸状体体積は比糸状体長に比較して、より糸状性細菌による膨化を説明するようにみえる。
- iii) また、1例であるが、非糸状性バルキングが比糸状体体積で糸状性バルキングと区別された。
- iv) 数%の糸状体の存在割合で膨化が発生する。

おわりに、この研究は、昭和54年度文部省科学研究費補助金奨励研究(A)の補助をうけて進められたことを記し謝意を表します。

#### 引用文献

- 1) Olson, F.C.W (1950) "Quantitative Estimates of Filamentous Algae" Trans. Amer. Microsc. Soc. 59, 272-279
- 2) 河野哲郎 (1976) "標準汚泥容量示標の提案とその合理的な使い方" 下水道協会誌, 13, No. 144, 17-25
- 3) 桜井善雄 (1969) "水中浮遊性細菌の全菌数測定法" 用水と廃水, 11, 721-722
- 4) 阿南功一ら 基礎生化学実験法1, 丸善, 昭和49年, 134-137
- 5) Bryant Fitch and Peter Kos (1976) "Toward a More Meaningful Index of Sludge Quality" J.WPCF, 48, 1979-1987
- 6) Tetsuro Kohno, Susumu Takii and Hiroshi Kitamura (1978) "Filamentous Bulking Phenomenon in Activated Sludge System" in "Microbiology for Environmental Cleaning" Scientific Reports of the Research Project "Environmental Cleaning by Microorganisms, 1974-1977" Edited by Kei Arima, p137-156