

(8) 走査型電子顕微鏡による藻類の凝集フロックの特性評価

ESTIMATION OF COAGULATED ALGAE FLOC CHARACTERISTICS BY SCANNING ELECOTRON MICROSCOPE

秋葉道宏 * 後藤光亀 * 野田修司 ** 佐藤敦久 *

Michihiro AKIBA Kohki GOTOH Syuji NODA Atsuhsisa SATOH

ABSTRACT ; The coagulation characteristics of four kinds of suspension, such as *Chlorella* sp., *Dictyosphaerium* sp., *Microcystis viridis* and Kaoline, was discussed by the results of Jar test and photograph of Scanning Electron Microscope (SEM) and Energy Dispersive System (EDS). Although the turbidity of *Dictyosphaerium* sp. is the highest of the four kinds of suspension at the optimum Alum dosage, its zeta potential is -35mV and the smallest of the four kinds of suspension. From the photograph of SEM and the analysis of EDS, although Aluminium hydroxide insufficiently absorbed on the surface of *Chlorella* sp., it strongly absorbed on that of *Dictyosphaerium* sp.. Although the floc of *Microcystis viridis* and Kaoline was easy to be formed by sweep flocculation, the floc of *Chlorella* sp. and *Dictyosphaerium* sp. was easy to be formed by adsorption of Aluminium hydroxide on the algae surface. Therefore, the coagulant dosage of *Dictyosphaerium* sp. and *Chlorella* sp. becomes larger than that of Kaoline.

KEYWORDS ; coaulation, algae, scanning electron microscope.

1. はじめに

水源の富栄養化による水質劣化の中で、藻類の凝集処理が不十分なための浄水障害が報告されている^{1), 2)}。特に、相模湖を水源とする浄水場から報告されているように、*Microcystis* sp. 及び *Dictyosphaerium* sp. が数万個/ml ろ過水に多量にリークするなどの極端な例がある。しかしながら藻類の凝集に関する研究例は少ない。

本研究では、形状が球状の3種類の藻類を用いた。緑藻類では細胞表層が単純な *Chlorella* sp. (凝集障害報告なし) と細胞表層が寒天質状物質で包まれている *Dictyosphaerium* sp., 藍藻類では *Microcystis viridis*, また、これまで多数の凝集に関する報告のあるカオリン懸濁液を用いて、ジャー試験により凝集時の濁度除去とゼータ電位について比較、検討した。また、走査型電子顕微鏡による写真撮影とエネルギー分散分析により凝集フロックを解析し、それぞれの藻類の表面性状と凝集特性について評価した。

* 東北大学工学部土木工学科 (Dept. of Civil Eng., Faculty of Eng., TOHOKU Univ.)

** 島根県立工業技術センター (Institute of Industrial Science and Technology, Shimane)

2. 実験方法

2.1 実験試料

供試藻類には、宮城県釜房ダムより単藻分離した *Chlorella* sp. と神奈川県相模湖より単藻分離した *Dictyosphaerium* sp. 及び国立環境研究所より分与していただいた *Microcystis viridis* (以下 *M. viridis*) を用いた。培地として *M. viridis* は Table 1 に示す M-11 培地を、*Chlorella* sp. と *Dictyosphaerium* sp. は凝集効果に影響を及ぼすとされる EDTA を除いた M-11 培地を用いた。培養は、恒温培養槽内に完全混合培養槽を設置して行い、完全混合培養槽には容量 10 ℥ の円筒型のガラス製のものを用いた。培養条件は培養温度 20℃、照度は培養槽上面から白色蛍光灯により 2.5klux の連続照射とした。また、Table 1 Composition of M-11 medium 槽内の混合を保証するために培養液を無菌空気でばっ氣した。無菌空気はエアーポンプからの空気を 0.2 μm フィルターを通過させることにより得た。

試料水は、対数増殖期の各藻類の培養液を用いて遠心分離器(3000rpm, 15min)により藻体を分離して蒸留水で3回洗浄し、蒸留水に藻体を添加して積分球式濁度計により濁度40度に調整したも

component	(mg/l)
NaNO_3	100
K_2HPO_4	10
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	75
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	40
NaCO_3	20
Fe-citrate	6
$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1

Table 2 Condition of suspension

り濁度40度に調整したものを用いた。この試料水に NaHCO_3 を用いてアルカリ度30mg/lに調整した。各試料水の懸濁液条件をTable 2に示す。

粒子個数はコールターカウンター (ZM型:50 μm アーチャーチューブ使用) で行い、1 μm 以上を計数した結果である。

Dictyosphaerium sp. は浮遊性で群体を形成し、透明な寒天質状の基質で包まれている³⁾。しかし、自然湖沼でも環境条件により群体状から単細胞状に分散するとされる¹⁾。培養系では群体は形成しにくいといわれ、本実験でも藻体は単細胞状に分散していた。また、*M. viridis* も自然水中で群体を形成するが、本培養系では一部が 2~3 ケの群体を形成する程度であった。

カオリンは市販のカオリンを用い、蒸留水で20g/lの懸濁液を作成し、3時間沈降させて粗大粒子を除去し、その上澄水をカオリン原液とした。

2.2 凝集実験

凝集実験はジャーテストで評価し、急速攪拌は100rpmで5分、緩速攪拌は40rpmで15分、静置沈殿30分の条件で行った。凝集剤は硫酸アルミニウムを用い、pHは凝集剤添加後ただちに0.1N-NaOH、0.1N-H₂SO₄を用いて約5と7に調整した。

凝集能力は、沈澱静置後の上澄水の濁度及び急速かくはん直後の藻体及びカオリンフロックのゼータ電位で評価した。ここで、上澄水濁度の測定の際、一部藻体フロックの浮上が認められたので、採水は水面下1cmより注射器によるものに統一した。ゼータ電位はRANK BROTHER社製のゼータメータにより測定を行い、極性を反転して各10回計測し、その平均値を用いた。

2.3 走査型電子顕微鏡による写真撮影

藻類及びカオリンの凝集フロックの状態を観察するため、走査型電子顕微鏡（Scanning Electron Microscope：以下 SEM）による写真撮影を行った。

藻類の SEM 試料作製の手順は一般的な手法を用いた。試料は 2.2 と同じでジャーテストでの上澄水濁度が最小となる Al 注入率付近での凝集フロックを用い、固体物として耳かき一杯程度を試料とした。前固定（グルタール・アルデヒド固定）の手順は 70% グルタール・アルデヒド 0.5ml, 0.2M リン酸緩衝液 7 ml, 蒸留水 6.5ml

入れて、計14mlとし、8°Cで2時間固定した。前固定後、0.1Mリン酸緩衝液で10分間、2回洗浄を行った。後固定（四酸化オスミウム）は4%四酸化オスミウム2.5ml、0.2Mリン酸緩衝液5ml、蒸留水2.5mlを入れて計10mlとし、8°Cで2時間行った。後固定後、0.1Mリン酸緩衝液で10分間2回洗浄を行った。脱水は、50, 70, 80, 90, 95, 100%のエタノールシリーズを各ステップ10分程度を2回ずつ行った。脱水後、酢酸イソアミル1mlを加えてエタノールを置換し保存した。この試料を臨界点乾燥後Au蒸着を行い、走査型電子顕微鏡（日立S-2100）にて写真撮影した。また、同試料をエネルギー分散分析（Energy Dispersive System：以下EDS）を行い、藻体への付着物について検討を加えた。

3. 結果及び考察

3.1 pH 7での残留濁度とゼータ電位

Fig.1はそれぞれ *Chlorella* sp., *Dictyosphaerium* sp., *M. viridis* 及びカオリンのpH 7におけるジャーテストの結果を示す。

残留濁度でみると4つの試料中では *M. viridis*, *Chlorella* sp. が最も低く、ついでカオリンとなり、*Dictyosphaerium* sp. が最も大きい。凝集効果として残留濁度5度、10度となるときの薬注量を比較するとTable 3のようになる。ここで濁度10度は凝集し始め、5度以下の時は大きなフロックが視覚的に認められる凝集条件である。

Table 3 Coagulation results of Jar test (Alum)

Sample	pH	dosage (mgAl/l)				
		residual turbidity		zeta potential		
		<10 (deg.)	<5 (deg.)	isoelectric point	-10mV	-20mV
<i>Chlorella</i> sp., <i>Dictyosphaerium</i> sp., <i>Microcystis</i> viridis kaolin	7	0.8 0.9 0.2 0.15	0.8 0.5 0.2 0.3	6 2 3.2 0.3	1.2 1.2 2.6 0.2	0.7 0.9 1.2 0.13
<i>Chlorella</i> sp., <i>Dictyosphaerium</i> sp., <i>Microcystis</i> viridis kaolin	5	0.7 1.2 0.35 0.8	0.7 4.0 0.4 1.2	1.7 0.7 1.7 0.07	1.0 0.4 0.7 0.025	0.7 0.32 0.45 —

濁度基準で凝集特性を考察すると、5~10度以下の残留濁度を得るにはカオリンが薬注量で0.15~0.3mgAl/lであるのに対し、*Chlorella* sp. では0.8mgAl/l、*Dictyosphaerium* sp. では0.5mgAl/l、*M. viridis* では0.2mgAl/lとなり、*M. viridis*が同程度以外は無機濁質の

カオリンより藻類の方が薬注量が大きい。特に *Chlorella* sp. ではカオリンの約3倍の薬注量となる。また、*M. viridis* は藻体の中では残留濁度の低減がよいが、水面上に一部フロックが浮上した。

藻体の密度は一般には約1.01~1.18⁴ g/cm³で、カオリンの約2.6g/cm³に比較して小さいので、今回のジャーテストのような沈降分離性を評価する実験では小

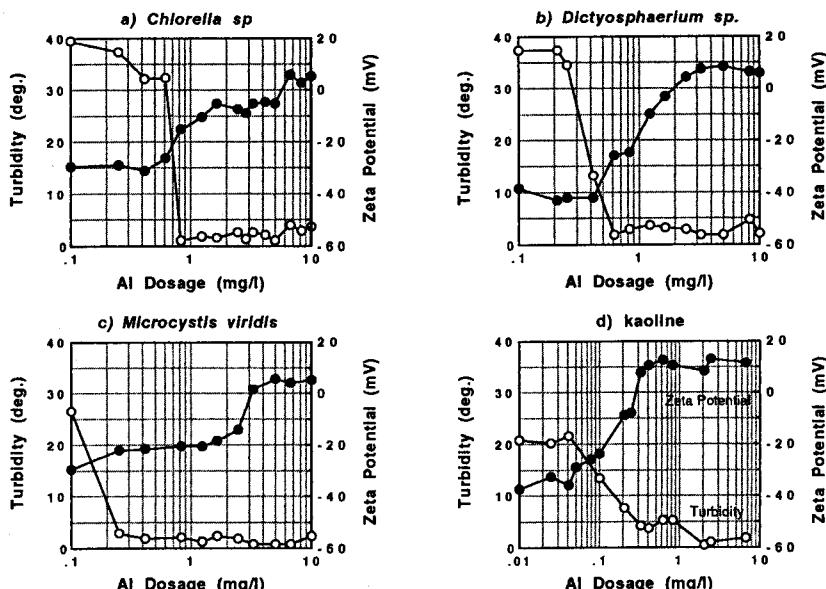


Fig.1 Residual turbidity, zeta potential vs. Al dosage (pH7.0)

さい ALT比（アルミニウム/濁度比）でカオリンの除去率が良い。上澄水濁度が最も低下する凝集条件のゼータ電位は各濁質で異なる。カオリンは従来の研究報告のように臨界ゼータ電位内（-15～15mV以内）のときに濁度が除去されている⁵⁾。また、上澄水の濁度低下も0.1～2 mgAl/lで徐々に低下し、残留濁度が5度以下になるのはフロックのゼータ電位がプラスになってからである。これに対し、*Chlorella* sp. では残留濁度が5度以下となるゼータ電位は約-15mV, *M. viridis* では-22mV, *Dictyosphaerium* sp. では-26mV付近と低い。また、*Dictyosphaerium* sp. はこれら4つの懸濁物質中では最も低い値を示す。

Table 3にpH 7での各試料のゼータ電位と薬注量の関係を示した。ゼータ電位がゼロになる等電点の薬注量はカオリンが0.3mgAl/lと最も小さく、ついで *Dictyosphaerium* sp. の2 mgAl/l, *M. viridis* の3.2mgAl/lであり、*Chlorella* sp. は6 mgAl/lと最も大きい。*Chlorella* sp. は *Dictyosphaerium* sp. とほぼ同じ薬注量でゼータ電位が-10～-20mVの荷電中和を生じ、濁度除去は良好に進むが、フロックのゼータ電位をゼロにするには他の3つの濁質より多量の凝集剤注入を必要とする。これに対し、*Dictyosphaerium* sp. は薬注量の増加により、すみやかに等電点に至る。*M. viridis* は *Chlorella* sp. と *Dictyosphaerium* sp. の中間の特性を示す。すなわち、-25mV～-10mVまでは薬注量の増加によっても荷電の変化は小さく、-10mVから等電点まではすみやかに変化する。ゼータ電位を-20mVから等電点までの荷電中和に要する薬注量の増加は *Dictyosphaerium* sp. とカオリンが約2.3倍、*M. viridis* が約2.7倍であるのに対し、*Chlorella* sp. は約8.6倍となり、大きな差が認められる。

3.2 pH 5での残留濁度とゼータ電位

Fig. 2にpH 5における各試料の凝集実験後の残留濁度と凝集フロックのゼータ電位を示す。

pHが5の場合、残留濁度が5度以下となる薬注量は、*Chlorella* sp. はpH 7の場合より若干低いがほぼ同じであるが、*M. viridis* では約2倍、*Dictyosphaerium* sp. では約8倍、カオリンでは約4倍の薬注量を必要とする。これに対し、pH 5において-10mVまで荷電を中和するのに必要な薬注量は *Chlorella* sp. ではpH 7での薬注量の約83%，*Dictyosphaerium* sp. で33%，*M. viridis* 27%，カオリンで13%であり、等電点までの薬注量の場合にはそれぞれ28%，35%，53%，23%に減少する。特に *Chlorella* sp. はゼータ電位が-10mVまでの荷電中和がpH 5と7ではあまり差は生じないが、等電点までの薬注量の差があるのが特徴である。

これらはpH 5付近ではアルミニウム水和物が荷電中和能力の高い多価のポリマーで存在するため、等電点にいたる薬注量が減少することを示している。一方、この場合フロック径の成長はpH 7より顕著でないためジャーテストのような重力沈降分離を指標とする場合には残留濁度5度以下にするのにpH 7よりも多量の薬注量が必要と

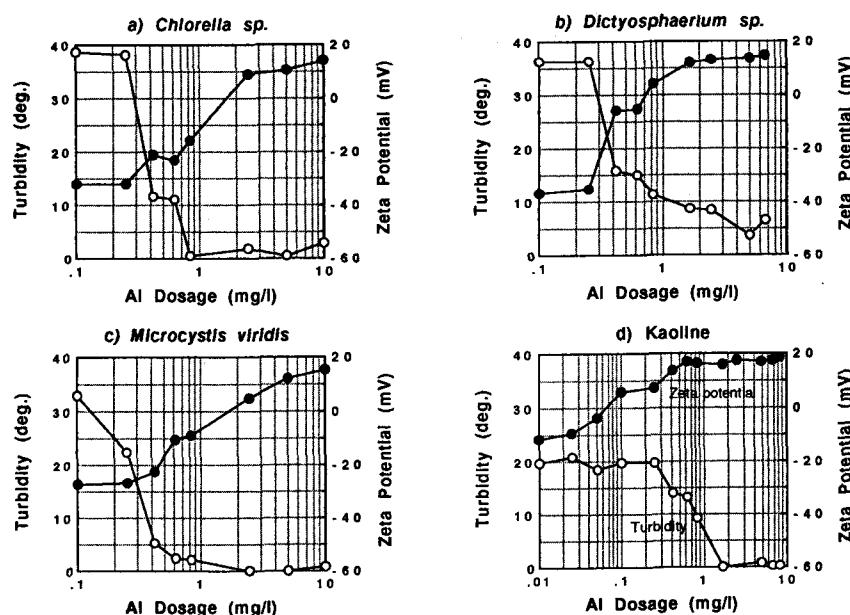


Fig.2 Residual turbidity, zeta potential vs Al dosage (pH 5.0)

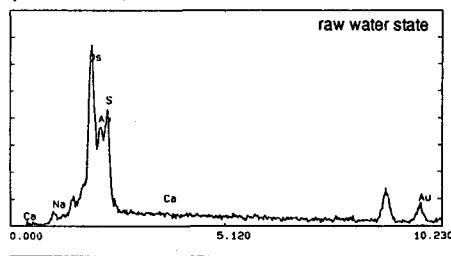
なる。

また、藻体の生産する高分子物質として、ウロン酸、中性糖、たんぱく質、脂肪酸、硫酸塩が検出され、凝集能力が認められている。藻体の場合、細胞表層にアミド基、カルボキシル基のような官能基がある場合、pHの低下によりカルボキシル基の解離が抑えられ、ゼータ電位がゼロに近づく。本実験ではpH 7での藻体のゼータ電位は *M. viridis* で-28mV、他の2種類は-35mVで、pH 5では *M. viridis* が-26mVで他の2種類が-32mV付近である。したがって、pH 5付近では藻体の表面官能基による荷電中和に対する影響は小さかった。

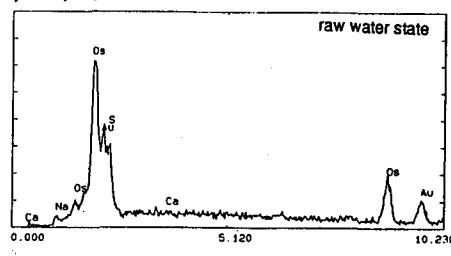
Table 4 Coagulation results of Jar Test

Sample	particle size range (μm)	average particle size (μm)	surface area (mm^2/ml)	dosage ($\text{mgAl}/\text{mm}^2 \times 10^{-3}$)					
				pH 7			pH 5		
				residual turbidity < 5	isoelectric point	-10mV	residual turbidity < 5	isoelectric point	-10mV
<i>Chlorella</i> sp.	2.2~4.0	3.3	2.2	0.36	2.68	0.54	0.31	0.76	0.45
<i>Dictyosphaerium</i> sp.	1.4~2.8	2.1	1.0	0.49	1.96	0.18	3.92	0.69	0.39
<i>Microcystis viridis</i>	2.2~3.2	3.0	0.9	0.22	3.56	2.89	0.44	1.89	0.78

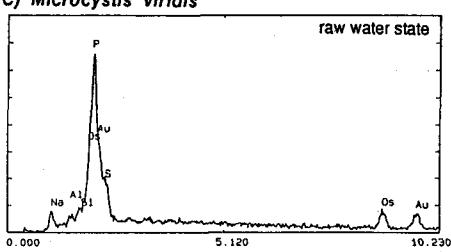
a) *Chlorella* sp.



b) *Dictyosphaerium* sp.



c) *Microcystis viridis*



d) Kaoline

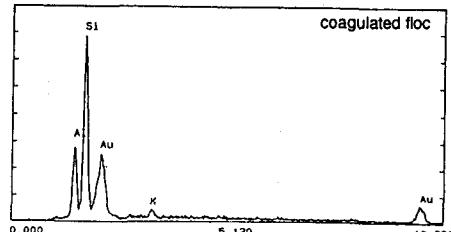
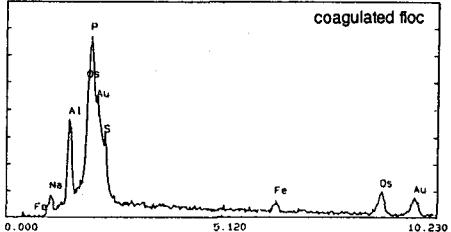
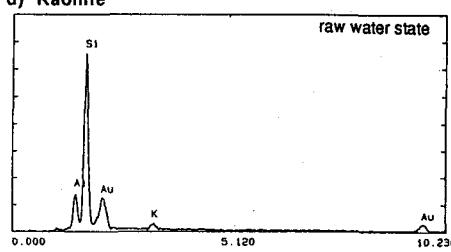


Fig. 3 Chart of EDS

Table 4は藻体の平均径と藻体個数の結果より、藻体を球、藻体が単体に分散していると仮定し、上澄水濁度5度未満、等電点、ゼータ電位が-10mVとなる各凝集状態の藻体単位表面積当りのAl量を示したものである。この結果よりpH7で残留濁度を5度以下にする場合には*M. viridis*<*Chlorella* sp.<*Dictyosphaerium* sp.の順に薬注量が大きくなることが示された。また、等電点では*Dictyosphaerium* sp.<*Chlorella* sp.<*M. viridis*となり、*Dictyosphaerium* sp.が最もAl量が少ないことが示された。pH5の場合、残留濁度を5度以下にするには*M. viridis*<*Chlorella* sp.<*Dictyosphaerium* sp.の順、等電点では*Chlorella* sp.=*Dictyosphaerium* sp.<*M. viridis*の順となり、pH7の順よりほとんど変化はない。

以上の結果はジャーテストのような沈降分離を生じさせる凝集を評価するレベルでは*Dictyosphaerium* sp.が最もAl量を消費しており、*M. viridis*は最も消費しないことを示す。等電点では*Chlorella* sp.と*Dictyosphaerium* sp.はほぼ同様のAl量を消費しているが、*M. viridis*は他の2種類の藻体よりも約2倍のAl量を消費する。

本実験では培地及び細胞外代謝有機物を2.2に示したように蒸留水により十分洗浄しているがその影響については検討していない。また、*Dictyosphaerium* sp.は表面に透明な寒天質状の基質で包まれて群体をなす。しかし、今回の*Dictyosphaerium* sp.では単細胞体であり、この寒天質状物質の有無は確認していない。しかしながら、藻類の凝集特性は藻体表面性状に大きく起因することが示唆された。

3.3 SEMによる凝集フロックの観察

いずれのSEM写真も固定、脱水、置換処理及び臨界点乾燥、Au蒸着を行っており、撮影条件を同一にしている。Fig.3に藻類及びカオリンのエネルギー分散分析によるスペクトル図を示す。上図は無薬注の藻体の場合で、Na, S, Au, Osのピークが認められる。Osは後固定時の四酸化オスミウムによるものであり、Auは蒸着による。*M. viridis*の場合、他にPの顕著なピークが認められる。*Chlorella* sp.及び*Dictyosphaerium* sp.ではOsのピークは顕著でもPのピークは明確でない。この原因は*M. viridis*のリンの過剰取り込みかリン酸緩衝液による洗浄時の吸着かは明らかでない。また、Sのピークは*Chlorella* sp.で大きいが他の藻体では小さい。これに対し、無機質のカオリンではOsの吸着は生じず、藻体のような有機物の存在で生じるベースラインの上昇はない。カオリンでは、Auの他、層状構成物質のSi, Alの強いピークとKのピークが認められる。下図の最適薬注時の凝集フロックの場合、アルミニウム水和物とリン酸緩衝液のリンの凝集により、各試料ともスペクトル上のOsの付近にPのピークが生じる。また、Alのピークも明確となる。

このスペクトル上のAlのバンドを用いて、pH7で最適薬注量の条件下凝集させた*Chlorella* sp.上に付着している物質の線スペクトル解析を行い、結果をPhoto.1に示す。線スペクトルは写真中央の藻体の中心付近を通る横線上をとった。Photo.1a)図は未凝集の*Chlorella* sp.の線スペクトルでFig.3(a)に示すAlの付着していないベース状態を示す。Photo.1b)図は凝集した*Chlorella* sp.の線スペクトル図である。スペクトルの高さはPhoto.1a)図の藻体後方のベースより、藻体上の付着物の位置では大きくなっているが、明らかにAlの存在が確認された。

Photo.2~5に、各試料の未凝集の藻体とpH7及び5で凝集させたフロックのSEM写真を示す。a)図は未凝集、b), c)図はそれぞれpHが7, 5の場合の凝集フロックである。

カオリンは板状の形状をしており、また*Chlorella* sp.は粒径が2.2~4.0μmで細胞表層は滑らかである。*Dictyosphaerium* sp.では粒径が1.4~2.8μmで細胞表層はしづく状となっているが、前処理時に表層の寒天質物質の収縮によるものと考えられる。*M. viridis*では粒径

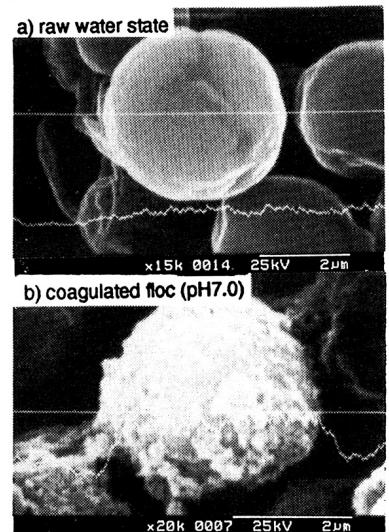
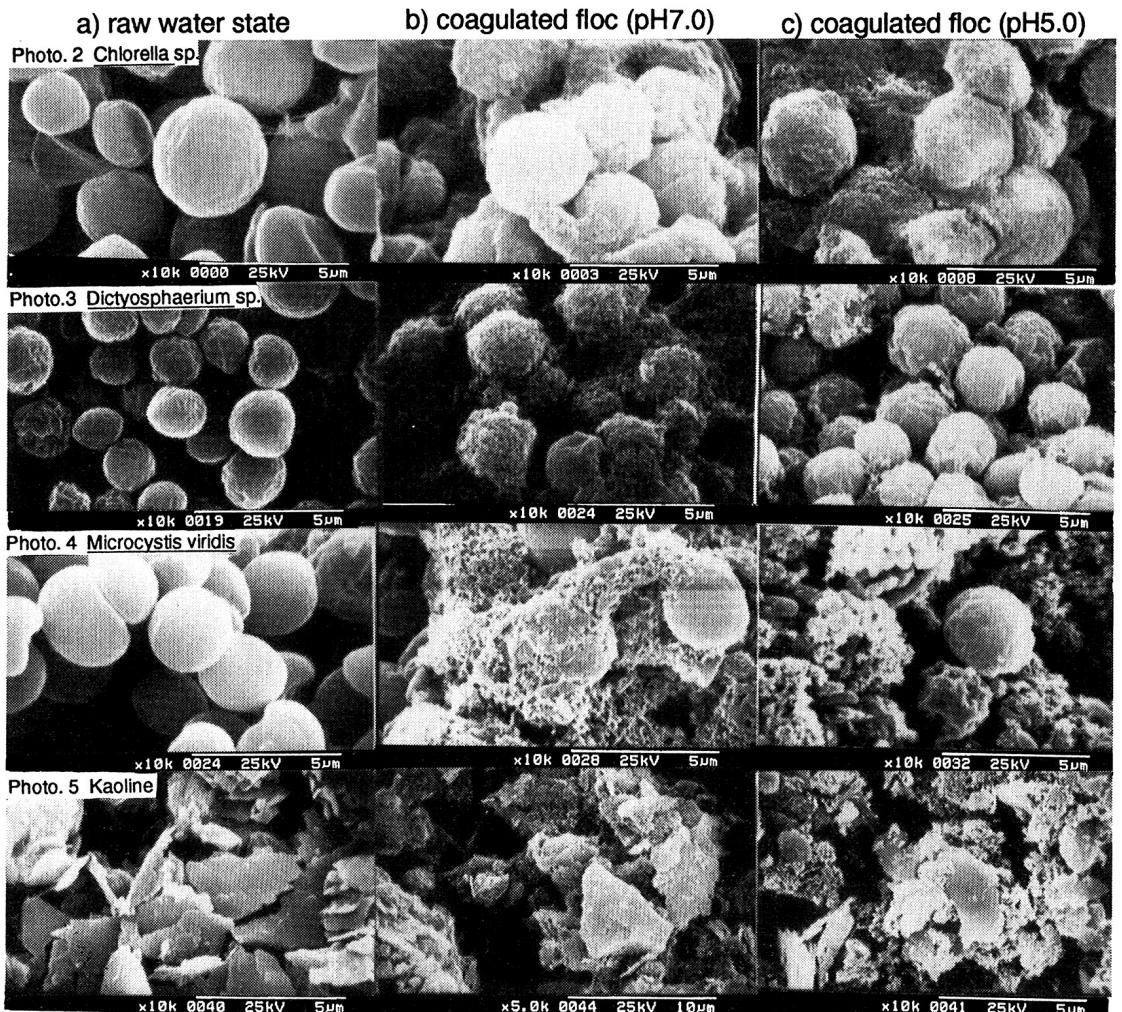


Photo. 1 Line scan analysis of EDS (*Chlorella* sp.)



が $2.2\sim3.2\text{ }\mu\text{m}$ であり、表層は比較的滑らかである。

pH 7 の場合、カオリンの凝集フロックはアルミニウム水和物によりカオリン粒子が捕捉されているが、粒子表面に均一に付着していない。*Dictyosphaerium* sp. では藻体表層一面に顕著にアルミニウム水和物の付着が見られる。*Chlorella* sp. ではアルミニウム水和物が藻体表面にほぼ一様に付着しているように見えるが、藻体表面でも付着の少ない部分も存在する。しかし、各フロック群でも藻体表面にほとんどアルミニウム水和物が付着していないと思われる藻体がフロック中に取り込まれている箇所が見受けられ、*M. viridis* でその傾向が特に顕著である。

この SEM 写真と Table 3, 4 の結果から、pH が 7 付近で沈降性のよいフロックを形成するためには *Dictyosphaerium* sp. は単位藻体当りの Al 消費量が最も大きいが、それは藻体表面一面に Al 水和物が吸着するためであると考えられる。また、*M. viridis* は単位藻体当りの Al 消費量が最も小さいが、これは一部に藻体表面にほとんど Al 水和物を吸着させていない藻体がフロック中に取り込まれているためである。この特性はカオリンの SEM 写真と似ている。また、*Chlorella* sp. は Jar test の結果も SEM 写真からも *Dictyosphaerium* sp. と *M. viridis* の中間の特性を示す。また、pH 5 での SEM 写真は全体的に pH 7 の場合ほど Al 水和物の形成は認められない。

SEM撮影は、前述の固定、脱水、置換などにより、水中にあるフロック状態と同一状態で評価はできないと考えられる。特に藻体へのAl水和物の付着形態（立体性など）は前処理の脱水時に変化しているものと考えられる。しかし、各藻体へのAl水和物の表面付着部位については再現性があると考えている。また、pH、藻体の表面状態や原液濃度等の原水水質条件、凝集剤の注入量、かくはん条件等の凝集操作条件により、藻体のアルミニウム水和物への取り込み形態が変化し、凝集・沈殿処理が影響を受けるものと推察される。

4.まとめ

緑藻類の*Chlorella* sp. と *Dictyosphaerium* sp., 藍藻類の*M. viridis* 及びカオリンを用い、原水濁度を40度としてジャーテストによる凝集実験を行い、その凝集特性とSEMによる写真観察及びエネルギー分散分析より次の知見を得た。

- (1) 濁度基準でみた場合、pH 7では*Chlorella* sp. は硫酸アルミニウムによるジャーテストでは上澄水清澄度が高く、カオリンよりも低い-22mV付近のゼータ電位で凝集するが、等電点までの凝集剤注入量は最も大きく6 mgAl/lとなり、カオリンの約20倍となる。その凝集特性は*Dictyosphaerium* sp. と *M. viridis*の中間の特性を示す。
- (2) *Dictyosphaerium* sp. は上澄水濁度が最も高いが、他の3つの濁質と比較して最も低い-26mV付近のゼータ電位で凝集可能である。また、単位藻体表面積当たりのAl量は他の藻体より大きく、SEM写真でも藻体表面にAl水和物が一面に付着しているのが観察された。
- (3) *M. viridis*残留濁度5度以下にする薬注量は他の2種類の藻体よりも少ないが等電点での単位藻体表面積当たりの薬注量は他の藻体の約2倍となる。
- (4) pHが5の場合、残留濁度が5度以下になる薬注量は*Chlorella* sp. ではpH 7とほとんど同じであるが、*Dictyosphaerium* sp. で8倍、*M. viridis*で約2倍、カオリンで約4倍と増加した。ただし、等電点までの薬注量は1/2～1/4に大きく減少した。
- (5) SEMによる凝集フロックの観察によれば、微視的には*Chlorella* sp. の藻体表面には不均一なアルミニウム水和物の付着があるが、*Dictyosphaerium* sp. では雪が積もったように多量の付着が観察される。*M. viridis*ではアルミニウム水和物のほとんど付着されていない藻体も観察された。この傾向はカオリンのものと酷似している。したがって、*M. viridis*やカオリンなどはアルミニウム水和物に濁質が取り込まれて凝集フロックが形成され易いのに対し、*Chlorella* sp., *Dictyosphaerium* sp., では藻体表面へのアルミニウム水和物の付着が多く生じるので、沈降分離の大きなフロックを形成させるには前者より多くの凝集剤が必要とするものと考えられる。

参考文献

- 1) 斎藤昭二、穂積克宏、有井鈴江：微小緑藻類ディクティオスフェリウムによる浄水処理障害の特徴と対策、第39回水道研究発表会講演要旨集、138-139、1989
- 2) 横浜市水道局：相模湖に繁殖した藍藻類*Microcystis aeruginosa*による濁度上昇について、横浜市水道局年報、228-231、1979
- 3) 山岸高旺、秋山優：淡水藻類写真集1巻、内田老鶴園、1984
- 4) R. L. Oliver, A. J. Kinnear, G. G. Ganf : Measurements of cell density of three freshwater phytoplankton by density gradient centrifugation, Limnol. Oceanogr., 26, 285-294, 1981
- 5) 中村文雄：水処理における凝集剤注入量の決定方式に関する研究、東北大学学位論文、1973