

活性汚泥フロック分散状態の 定量的な把握手法について

田中 孝国^{*1}, 吉川 成美^{*2}, 田中 ひとみ^{*3}, 小林 康浩^{*4}

Quantitative monitoring of Activated sludge flocs at dispersed state

Takakuni TANAKA, Narumi YOSHIKAWA, Hitomi TANAKA and Yasuhiro KOBAYASHI

The main characteristic of the activated sludge is degradation of waste water. Various bacteria form flocs in the activated sludge. These flocs must be the most suitable bacteria density for waste water treatment. It is necessary to know the state of the flocs immediately to perform processing smoothly. In this report, we tried to analyze the activated sludge flocs using Image J. Image J is an image analysis program that was created at the National Institutes of Health (open source). We present a new approach to determine volumes, related factors, and compositions of the bacteria of activated sludge flocs. As a result, Image J was proved to be effective for the analysis of the floc images. There was not the relation of Image analysis, MLSS and metabolic activity.

KEYWORDS : activated sludge, image analysis, floc, Image J

1. はじめに

一般的な活性汚泥の示す排水処理能は、活性汚泥中の微生物(群)が形成するフロックの状態が深く関わっていることが知られている。排水に含まれる汚濁成分は、フロックにより、ろ過および吸着される。続いて汚濁成分は、フロック内外の微生物(群)によって分解を受け、生存のための代謝エネルギーもしくは、生物体増殖のためのエネルギー源となる¹⁾。このように、フロックは活性汚泥の示す排水処理に関わる重要なパラメータの 1 つである。

現在、フロックの状態を把握する手法として、様々な光学的センサーによる測定が広く採用されているが、より簡便にフロックの性状を把握する手法として、顕微鏡²⁾や CCD カメラ等による直接観察法がある。荏原製作所では、プローブから活性汚泥フロックを吸いこみ、内蔵された小型顕微鏡でフロックを自動撮影し、撮影データを外部モニターで観察する装置を開発している³⁾。明電舎は、活性汚泥中に出現する原生動物を観察し、その画像解析を行うことによる処理能の状態把握の可能性について報告している⁴⁾。これらの報告によれば、活性汚泥中のフロックや生物相を直接観察し、排水処理能を判断することは十分可能で

*1 物質工学科(Dept. of Materials Chemistry and Bioengineering), E-mail: Tanakatakakuni@oyama-ct.ac.jp

*2 専攻科 複合工学専攻(Advanced Course of Materials Chemistry and Bioengineering) 平成 26 年 3 月 修了

*3 物質工学科(Dept. of Materials Chemistry and Bioengineering) 平成 27 年 3 月 卒業

*4 電気電子創造工学科(Dept. of Innovative Electrical and Electronic Engineering)

あると考えられる。

我々は、活性汚泥フロックの状態を撮影・画像解析する手法として、医学的な画像解析で使用されているソフトウェア ImageJ (フリー) の使用を検討した。ImageJ はアメリカ国立衛生研究所 (National Institutes of Health : NIH) によって開発されたオープンソースの画像解析ソフトウェアである。このソフトウェアは Java 言語で開発されており、様々な種類の画像フォーマットに対応している⁵⁾。更に、ImageJ は、二値化処理法を用いる事により、画像がもつ情報を定量的に抽出する手法としても広く使用されている。例えば、医療分野では X 線写真における病巣部の検出⁶⁾、免疫組織標本の染色強度の数値化や細胞内コロイド金粒子密度の測定⁷⁾、生物学分野ではニンジンカサの生育状態を画像解析する研究例がある⁸⁾。このように、画像データを定量的に解析する研究は活発に行われている。これらの報告例から、我々は ImageJ を用いて活性汚泥フロックの定量的な解析を試みた。その結果、フロックの状態(大きさ)が定量的に把握できることが判明した。しかし、分散状態やその他の排水処理に関するパラメータとの関連性は明確には出来なかった⁹⁾。

今回我々は、フロックの分散状態の定量的な解析を進めると同時に、その他の活性汚泥のパラメータとの関連付けについて検討を行ったので報告する。

2. 実験方法

2.1 馴養活性汚泥の準備

本実験でもこれまでと同様、小山市内の水処理センター(小山扶桑水処理センター)から採取した活性汚泥を使用した。採取した活性汚泥は、空気を 4.0L/min で供給し攪拌を行い、模擬家庭用排水(排水の成分はグルコース 0.4g/L・ポリペプトン 0.4g/L・リン酸 1 カリウム 0.02g/L)を fill and draw 法により毎日添加し、3 週間以上馴養させてから実験に使用した¹⁰⁾。

2.2 活性汚泥サンプルの準備

まず、生理食塩水 240mL と馴養活性汚泥 60mL を準備した。これらの溶液を三角フラスコに入れ、超音波照射無し、3 種類の周波数条件(28, 45,

100kHz)で各々 60 秒超音波照射を行ったサンプル 4 種を準備した。これらのサンプルについて、MLSS [mg/L], 酸素消費速度 [mg/(L・min)] の測定を行った。MLSS の測定は、活性汚泥をサンプリングし 1 日乾燥させた後の乾燥重量から算出した。微生物の酸素消費速度の速さは、微生物の代謝活性を示すことが知られており、溶存酸素計を用いた消費速度の測定で評価可能であるため¹¹⁾、本研究でもこの手法を採用した。

2.3 撮影および画像解析

2.2 で準備したサンプルを CCD カメラ(島津顕微鏡カラーテレビ装置 CCD-X2)を用いてフロックの撮影を倍率 100 倍で行い、Image J による画像解析を行った。これまでの研究では、活性汚泥サンプルをシャーレやスライドガラスに分取し、観察を行っていたが、本実験では、図 1 に示す装置により連続的な活性汚泥観察を試みた。図 1 の形状は運動精子回収用シャーレ(市販品)を模擬したものである。シャーレの高さに合わせてアクリル板を切ったものを、10 [mm] 幅の経路が出来るようにシャーレの内側に接着し、シャーレの両側面に穴をあけ、チューブ型ジョイントを接着し、活性汚泥溶液を流しつつ撮影を行った。作製した図 1 を顕微鏡の観察台に固定し、ポンプで活性汚泥溶液を流し、連続的に観察・撮影を実施した。

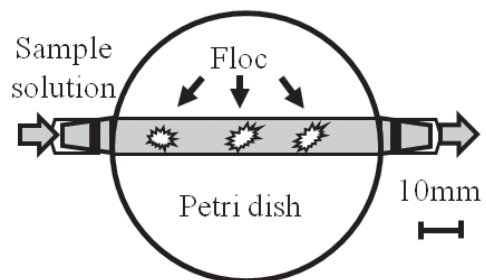


図1 活性汚泥観察装置

撮影した画像は、まず二値化処理により、活性汚泥フロックを抽出した。続いて、クロージング (Closing), 穴埋め (Fill Holes), 細線化 (Thinning) を行ってノイズを除去し、定量的な解析に必要な形のみを保護することで、より正確な画像情報を得られるように画像処理を施した^{6,7)}。以上の処理により、活性汚泥フロック領域を抽出し、抽出範囲内の画素数(Pixel)をカウントし活性汚泥フロ

ックの単面積とした。尚、今回の Image J の設定条件は初期値の状態で行った。尚、2.4以降のパラメータも含め測定サンプル数は 20 サンプルである。

2. 4 その他のパラメータの測定

活性汚泥プロセスにおいて、通常測定されるパラメータと画像解析を行った結果との関連を調査するために、MLSS、酸素消費速度の測定を行った。まず、活性汚泥濃度の指標となる MLSS (Mixed Liquor Suspended Solids) [mg/L] は、重量既知のろつばに活性汚泥溶液を採取し、乾燥器 (50[°C]) 内で 1 日乾燥させた後、重量を測定し(1)式により乾燥重量として算出した。

$$\text{活性汚泥浮遊物量 (MLSS) [mg/L]} \\ = \text{乾燥重量 [mg/L]} \times 1000 / \text{採取量 [mL]} \cdots (1)$$

また、酸素消費速度を測定することで、活性汚泥の示す代謝活性の評価を行った。測定は遠心管に培養液を 40 [mL] 採取し、遠心分離を行った (3,000 [rpm]×10 [min])。その後、上澄み液を捨て、遠心管に 40 [mL] 生理食塩水(0.8 [wt%] NaCl 溶液)を加え洗浄し、再び遠心分離(3,000 [rpm]×10 [min])を行った。上澄み液を捨て、洗浄した活性汚泥を集菌後、飽和曝気状態の生理食塩水とともにサンプル管へ移し、溶存酸素計(TOA-DKK,DO-31P)の電極でサンプル管に空気が入らないように密栓し、1 分毎に溶存酸素計の数値を記録した。得られた値から、酸素消費速度 [mg/(L・min)]を算出し、代謝活性とした。

3. 結果および考察

CCD カメラで活性汚泥フロックを撮影した画像を図 2 に示した。まず超音波照射時のフロック分散状態について判断を行った。その結果、超音波周波数 28kHz 照射時とコントロール(超音波無し)の差は見られなかったが、45kHz と 100kHz 照射時はフロックが分散していることが判明した。簡易 USB 接続型顕微鏡を用いた以前の報告¹²⁾の結果では、100kHz のみ分散が観察されたことから、撮影精度の上昇した CCD カメラを用いた今回の方が、詳細な画像観察が可能であることが示唆された。

続いて 2 値化および、解析に不用なノイズ処理を Image J により行った⁷⁾ (図 3)。カウントした画素数の結果を表 1 に示した。コントロール条件のカウントした画素数を 1 とし他条件の画素数の変化率を求めた。画素数の変化率より、28kHz の条件を除いて、全ての条件でフロックの分散および微細化が見られた。ここで述べるフロックの微細化とは、画像処理後に画素数がカウント出来ない粒子が増えたことを意味している。一般に、活性汚泥に対して分散処理を行うと可溶化(溶解化)と表現され、水溶液中に破碎された微生物の内容物等が溶解するとされている¹³⁾。表 1 の変化率のデータから、Pixel 数の減少が見られたため、可溶化現象が考えられた。そのため次の試みとして、活性汚泥中の微生物(群)の濃度を調べるため、活性汚泥濃度 MLSS の測定(図 4)を実施したが違いは見られず、可溶化まで活性汚泥の分解が進行しなかったと考えられた。これらの結果より、今回の超音波照射条件では、分散処理は可溶化までは至らないものの、画像処理不可能なサイズにまで微細化が進行することが示唆された。また、微細化したフロックが画像の一部として撮影されたとしても、不鮮明なため画像処理においてノイズとして除去されたことも考えられた。今回の実験では、MLSS と画像解析結果に関連性は見られなかった。



図 2 活性汚泥のフロック画像 (画像処理前)



図 3 活性汚泥のフロック画像 (画像処理後)

表1 カウントした単位ブロックあたりの画素数

	Control	28kHz	45kHz	100kHz
Pixel数 [$\times 10^3$ 個]	33.1 ± 11.4	33.1 ± 5.00	28.3 ± 5.01	26.6 ± 7.77
変化率[-]	1	1.000	0.852	0.802

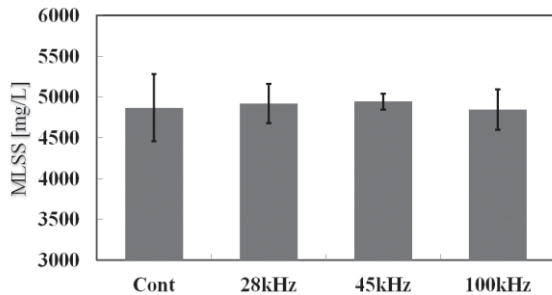


図4 MLSS 比較データ

続いて、それぞれの分散条件における酸素消費速度の比較を行った(表2)。超音波照射を分散目的で行うと、活性汚泥中の微生物細胞の一部が可溶化(死滅)し、細胞内の成分が溶出することで他の細胞が利用しやすくなる¹³⁾と考えられている。しかし表2および図5より、代謝活性は超音波を照射することで1.2倍以上に上昇したが、MLSSおよび単位ブロック辺りの画素数との関連性は今回の結果では見られなかった。

表2 フロック分散条件の違いによる代謝活性(酸素消費速度[$\times 10^{-2}$ mg/L/min])の比較

	Control	28kHz	45kHz	100kHz
酸素消費 速度	4.00 ± 0.24	4.76 ± 0.39	4.79 ± 0.44	5.10 ± 0.66
変化率[-]	1	1.20	1.20	1.28

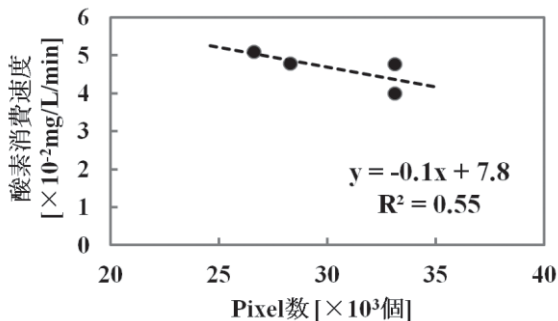


図5 Pixel数と酸素消費速度の関係(表1および2の平均値をプロット)

4. まとめ

以上より、Image Jを用いた活性汚泥フロックの画像処理の有効性が確認出来、詳細な分散状態の把握に役立つことが判明した。今回、2値化処理を決定する閾値はImage Jの自動設定で行ったが、活性汚泥フロックの撮影では周囲の光のあたり具合を精密にコントロールすることで、より安定的なデータが得られる^{3,4)}との報告から、撮影方法についても検討を重ねたい。また、分散の状態を大きく変化させたサンプルについても試験を行いたい。

参考文献

- 1) 化学工学協会編：生物学的水処理技術と装置，pp.7-10，培風館（1978）
- 2) 須藤隆一編：環境微生物実験法，pp.17-19，講談社（1997）
- 3) 鈴木一如：活性汚泥微生物の画像認識による下水処理の制御，EICA，Vol.4，No.2，pp.27-40（1999）
- 4) 市川雅英 他：画像認識による微生物の同定，用水と廃水，Vol.38，No.11，pp.47-52（1996）
- 5) 上村逸郎他：Image Jとは，画像ラボ，No.2，pp.59-64（2007）
- 6) 石田隆行 他：「医用画像処理入門」，オーム社，pp.42-48（2008）
- 7) 宮東 昭彦，川上 速人：Image J を用いたデジタル画像解析の基礎(D.見る!顕微鏡の基礎から最新のイメージング技術-組織細胞化学の挑戦-臨床応用研究への飛躍)，組織細胞化学 2012，171-180，2012-07-10
- 8) 南峰夫 他：「画像処理装置によるニンジンカルスの生育の解析」，信州大学農学部紀要，Vol.29，No.2，pp.121-128（1992）
- 9) 田中孝国 他：「ImageJを用いた活性汚泥フロックの画像解析手法の検討」，工業用水，No.625，pp.69-73（2014.07）
- 10) 田中孝国 他：「前処理として超音波照射を行った活性汚泥による難分解性物質分解の評価」，環境バイオテクノロジー学会誌，Vol.9，No.2，pp.135-139（2009.12）
- 11) 須藤隆一：「環境微生物実験法」，講談社，pp.172-174（1997）
- 12) 田中孝国，小林康浩：「画像解析手法を用いた活性汚泥濃度(MLSS)測定法の改良」，工業用水，No. 606，pp.72-75（2011.05）
- 13) 松本幹治，ケイ新会：「媒体攪拌ミル破砕による有機性汚泥の可溶化と再利用技術」，環境技術，Vol.30，No.11，pp. 872-877（2001）

【受理年月日 2015年 7月27日】