汚泥の自己造粒化に関する一考察

Studies on Self-Immobilization of Sludge

明賀春樹, 浅野英之, 角田ふで子

Haruki MYOGA, Hideyuki ASANO and Fudeko KAKUDA

(オルガノ株式会社総合研究所)

(Central Research Laboratories, Japan Organo Co., Ltd.)

Abstract

Experimental investigations of the effects of the different kinds of hydrogen donors addition on the sludge self-immobilization of upflow sludge blanket (USB) denitrification reactors were carried out. Results indicated that highly settleable and active granular sludge was produced when using methanol as the hydrogen donor and *Hyphomicrobium* was the dominant bacteria in the granular sludge. On the other hand, in tests using glucose and acetate as the hydrogen donor, reactor performance was much poorer than when using methanol as the donor. Although the mechanism of sludge self-immobilization could not be made clear, the factors such as tangling of filamentous-like bacteria, gentle mixing, upflow reactor situation and extracellular biopolymers production, seem to be most important for granular sludge formation in comparison with other self-immobilization processes.

1. 緒言

生物学的水処理技術におけるリアクター内への微生物保持方法の流れを振り返ると、標準活性汚泥法、オキシデーションディッチ法に代表される活性汚泥法（浮遊式微生物法）あるいは散水濾床法、接触酸化法に代表される生物膜法から包括固定化法へ、さらには自己造粒法（自己固定化法、グラニュール化法）へと研究の流れが向っていることが感じられる。包括固定化法に関しては

ゲル製造コストが高価なこと、ゲル層による基質拡散律速により当初想定されていたほどの反応速度がとれないこと等から、一時ほど多くの研究報告がなされなくなってきたが、自己造粒法については注目が継続している。実用化の面では活性汚泥法、生物膜法の時代がまだ継続し、一部の特殊な排水に対して包括固定化法、自己造粒法が適用されていくと考えられている。

自己造粒法の代表的なものとしてはUASB（Upflow Anaerobic Sludge Blanket）法¹⁾があり、既に全世界で数百基の実装置が稼働している。また、その他の自己造粒法としてUSB（Upflow Sludge Blanket）法²⁾、MRB（Multi-Stage Reversing-Flow Bioreactor）法³⁾、AUSB（Aerobic Upflow Sludge Blanket）法⁴⁾が報告されている。これらの自己造粒化のメカニズムは明確になっておらず今後の課題とされているが、各法の自己造粒化現象について比較することにより、自己造粒のメカニズムについてさらに深い検討が加えられると考える。

筆者らはUSB法、UASB法による実験を継続しており、本報においては各種水素供与体を用いたUSB法の脱窒実験結果を中心として、UASB法、MRB法、AUSB法等についての研究例と比較することにより、自己造粒化のメカニズムについて若干の考察を加えた。

2. 材料及び方法

2.1 実験装置

USB実験装置のフローを図1に示す。USBリアクターはジャケットタイプとし、上部に固液分離のためのガスソリッドセパレーターを設けている。ガスソリッドセパレーター下部の有効容量は1.26リットル（内径40mm、高さ1000mm）であり、カラム内部には発生ガスのガス抜けを良好にし、汚泥のブリッジングを防ぐためにピケットフェンス状の攪拌機を設け、2 rpmで回転させた。また、リアクターのジャケット内に恒温水を流すことによって、反応温度を20℃にコントロールした。

リアクターへの流入水供給は軟水装置を通してカルシウムを除去した水道水を希釈水とし、濃厚原水を所定濃度まで希釈して流入原水とし、リアクター下部から上向流で流入させた。なお、硝酸態窒素容積負荷は有効容量である1.26リットルを基準として算出した。種汚泥として下水処理場の余剰汚泥（MLSS 16000mg・l⁻¹）を用い、各実験においてリアクターに0.5リットル添加した。

図1 実験装置フロムシート

表1 USB実験装置流入水基質組成

基質組成	濃度 (mg・l ⁻¹)
NaNO ₃	607
KH ₂ PO ₄	13
CaCl ₂ ・2H ₂ O	110
MgCl ₂ ・6H ₂ O	20
FeCl ₂ ・nH ₂ O	0.7
CuSO ₄ ・5H ₂ O	0.5
MnSO ₄ ・4H ₂ O	0.08
Na ₂ MoO ₄ ・2H ₂ O	0.05
ZnCl ₂	0.2
CoCl ₂ ・6H ₂ O	0.008
水素供与体	所定濃度

2.2 水素供与体の影響

実験用原水組成を表1に、実験条件を表2に示す。リアクター内のpHを脱窒菌に適した7～9とするため、流入水のpHを酢酸の系では6に、グルコースの系では8に水酸化ナトリウム溶液により調整した。スタートアップ時の硝酸態窒素容積負荷は0.5gN・l⁻¹・d⁻¹とし、処理水中の酸化態窒素総濃度が流入水の硝酸態窒素濃度基準での除去率として95%以上となったことを確認した後、負荷上昇をステップワイズに行い、リアクター内でのグラニュール形成状況の観察および許容容積負荷から、水素供与体の種類がUSB法におけるグラニュール形成に及ぼす影響を検討した。

表2 USB法実験条件（水素供与体の影響）

実験区	I	II	III
NO ₃ -N濃度 (mgN・l ⁻¹)	100	100	100
Ca濃度 (mgCa・l ⁻¹)	30	30	30
CH ₃ OH濃度 (mg・l ⁻¹)	300	—	—
CH ₃ COOH濃度 (mg・l ⁻¹)	—	536	—
C ₆ H ₁₂ O ₆ 濃度 (mg・l ⁻¹)	—	—	536

2.3 微生物学的検討

グラニュールを構成する微生物群の形態観察を走査型電子顕微鏡を用いて行った。また、非常に良好なグラニュールを形成し脱窒能にも優れた、メタノールを水素供与体とした系のグラニュールを滅菌生理食塩水に加えブレンダーで破碎したものを検体として、メタノール酸化性の脱窒菌として知られる*Hyphomicrobium*⁷⁾の分離用培地（表3、4、5）により継代培養を行なった。

表3 *Hyphomicrobium* 分離用培地組成

試薬	添加量
硝酸カリウム	5 (g)
メタノール	5 (ml)
微量金属溶液SL4	10 (ml)
基礎培地337	1000 (ml)

3. 結果及び考察

3.1 水素供与体の影響

従属栄養性脱窒法は脱窒反応時の水素供与体となる有機物の種類により、菌の種類や特性、脱窒速度に差異が生じると言われている⁸⁾。活性汚泥法等の従来型の脱窒反応の水素供与体としては多くの有機物、すなわち、炭水化物類、アルコール類、有機酸類、下水等の使用が報

表4 *Hyphomicrobium* 分離培地用SL4組成

試 薬	添加量
Titriplex III (トーマイトCyDTA)	500 (mg)
FeSO ₄ ·7H ₂ O	200 (mg)
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0 (mg)
MnCl ₂ ·4H ₂ O	3 (mg)
H ₃ BO ₃	30 (mg)
CoCl ₂ ·6H ₂ O	20 (mg)
CuCl ₂ ·2H ₂ O	1 (mg)
NiCl ₂ ·6H ₂ O	2 (mg)
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	3 (mg)
蒸 留 水	1000 (ml)

表5 *Hyphomicrobium* 分離培地用基礎培地337組成

試薬	添加量
KH ₂ PO ₄	1.36 (g)
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	2.85 (g)
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.5 (g)
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.2 (g)
CaCl ₂ ·2H ₂ O	10 (mg)
FeSO ₄ ·7H ₂ O	5 (mg)
MnSO ₄ ·4H ₂ O	2.5 (mg)
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	2.5 (mg)
蒸 留 水	1000 (ml)

告されているが²⁹⁾、USB法においてはメタノール使用に関する報告²⁹⁾がほとんどであるため、メタノール、酢酸、グルコースを水素供与体とした時のUSB法の脱窒能について検討を行った。

メタノール、酢酸、グルコースによる脱窒反応は化学量論的には以下の様に示される。

(メタノール)

(酢酸)

(グルコース)

上式によれば、1gの硝酸態窒素を除去するためには、1.90gのメタノール、2.68gの酢酸、2.68gのグルコースが

必要である。しかし、実際には菌体の増殖分や流入水中の溶存酸素濃度の影響等により理論量のための添加では脱窒が充分になされないため、原水の硝酸態窒素1gに対しメタノール、グルコース、酢酸を各々3.0g、5.36g、5.36g原水中に添加し実験を行った。

水素供与体をメタノール、グルコース、酢酸とした実験での、許容容積負荷、グラニユール径、汚泥濃度等についての実験結果を表6に示す。

メタノールを水素供与体とした系では、実験開始後7日目にカラム下部にグラニユール状の汚泥が形成され、その後順調に脱窒能が向上し、許容容積負荷として9 gN·l⁻¹·d⁻¹が許容され、良好で安定した脱窒能を示した。

酢酸を水素供与体とした系では実験開始後5日目にグラニユール状の汚泥がカラム下部に形成された。容積負荷3 gN·l⁻¹·d⁻¹までは順調に脱窒能が向上したが、5 gN·l⁻¹·d⁻¹に負荷を上昇するとグラニユールは肥大してゼリー状の物質で覆われるようになった。さらに処理を継続するとグラニユール状物質は崩壊し、粘性を帯びた汚泥が攪拌羽やリアクター壁面に付着した。その結果処理水質は悪化し、負荷を半減させても脱窒能の回復は認められなかった。

グルコースを水素供与体に用いた系においては実験開始後12日目にグラニユール状汚泥がカラム下部で形成され、4 gN·l⁻¹·d⁻¹まで脱窒能が向上した。しかし、発酵性基質のグルコースを用いた実験であるため、基質の腐敗、乳酸発酵等が基質タンク内や流入配管中で度々起こり、その結果脱窒能が著しく低下することとなった。従って、グルコースを水素供与体として用いることは、処理の安定性の観点から実用化には不適であるとの結論に至った。

また、酢酸、グルコースを水素供与体として用いた実験において形成されたグラニユール状汚泥は、カラム側面のサンプリングコックからの抜き出し操作により大部分が崩壊し、メタノールを水素供与体とした実験で形成されたグラニユールに比較すると非常に弱いものであった。

以上の結果より、USB法における脱窒反応の高効率化に水素供与体を与える影響は大きく、供試した3種の水素供与体の中ではメタノールのみが良好なグラニユール形成、脱窒能を示し、酢酸、グルコースはUSB法の水素供与体としては不適であることが示された。

3.2 微生物学的観察

1) 走査型電子顕微鏡による観察

メタノール、酢酸、グルコースを水素供与体とした実験において形成されたグラニユール状汚泥の走査型電子顕微鏡による観察結果を図2、図3、図4に示す。メタ

表 6 USB法実験結果（水素供与体の影響）

水素供与体	メタノール	酢 酸	グルコース
許容容積負荷 ($\text{gN} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)	9	3	(4)
グラニュール径 (mm)	3.0	肥大	2.0
MLSS ($\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$)	45000	13000	30300
MLVSS ($\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$)	41400	11700	27500
VSS比 (%)	92	90	91
グラニュール性状	良好	脆弱	脆弱

ノールを水素供与体とした場合には、形態学的に特徴を有するメタノール資化性の脱窒菌として知られる

*Hyphomicrobium*様の細菌が優的に増殖していることが観察された。明らかに*Hyphomicrobium*とは異なる桿菌等も観察されたが、その数は*Hyphomicrobium*様の微生物に比較し非常に少ないものであった。酢酸を水素供与体とした場合には桿菌が主体となっており、グルコースを水素供与体とした場合は桿菌、コンマ状菌が多く観察された。酢酸、グルコースを水素供与体とした場合に優占となった細菌の、形態上での菌種の推察は困難であった。

2) メタノールを水素供与体とした系で生成されたグラニュールの構成細菌の単離

*Hyphomicrobium*分離用液体培地を用いてで数回植え継いで単離した菌株の顕微鏡写真を図5に示す。楕円状の細胞から菌糸を伸ばした特徴的な菌体が認められ、細菌性状試験結果（データは割愛）と合わせ、この菌は*Hyphomicrobium*と結論付けられた。単離した菌体(図5)と、グラニュール中で優占となっていることが電子顕微鏡観察により認められた菌(図2)との比較より、メタノールを水素供与体として形成されたグラニュールの優占細菌は*Hyphomicrobium*であることが推定された。

図2 USBグラニュールSEM写真
(水素供与体：メタノール)

図3 USBグラニュールSEM写真
(水素供与体：酢酸)

図4 USBグラニュールSEM写真
(水素供与体：グルコース)

図5 *Hyphomicrobium* 顕微鏡写真

写真6 UASBグラニューールSEM写真

3.3 各種自己造粒法とUSB法との比較

1) USB法におけるグラニューール形成条件

前述のように、水素供与体の種類によりUSBリアクター内で優占となる微生物種が異なってくるにもかかわらず、いずれの水素供与体を用いた場合においてもリアクター内でグラニューール状汚泥の形成が認められた。一方、メタノールを単一水素供与体とした活性汚泥法による脱窒リアクターにおいては、水素供与体等の基質組成が本報のUSB法実験と同等であり、優占微生物も同じ *Hyphomicrobium* であるにもかかわらず、グラニューール状汚泥の形成は報告されていない¹⁴⁾。これらの結果から、USB法におけるグラニューール形成の条件として以下のことが挙げられる。

- ①過度の剪断力のかからない上向流のリアクターで、発生ガスによるマイルドな攪拌を受けることにより、汚泥の造粒化が可能となる。
- ②汚泥を造粒化させること自体に対しては、菌糸を延ばした細菌の存在は必ずしも必要ではない。このことは、酢酸、グルコースを水素供与体として用いた実験結果より明らかである。この場合の微生物同士の付着には、通常のプロック形成と同様に微生物から代謝される粘質物が関与していると考えられる。
- ③緻密で強度に優れたグラニューールが形成された時には、菌糸を延ばした増殖形態をとる *Hyphomicrobium* の存在と、その菌糸が絡まり合うようにしてグラニューールを形成していることが確認された。したがって、USB法においては微生物同士の絡まり合いがより強固なグラニューール形成に関与していると想定された。

2) 各種自己造粒法の比較

USB法、UASB法、MRB法、AUSB法の自己造粒法においてグラニューールが形成される環境条件、優占微生物

等を表7に示す。また、各種自己造粒法のグラニューール化の必要条件の比較において、以下のことが共通点として挙げられる。

表7 各種自己造粒法のグラニューール形成条件

	環境条件	通水方向	攪拌手段	優占微生物	糸状性微生物
USB法	通性嫌気	上向流	発生ガス	<i>Hyphomicrobium</i>	<i>Hyphomicrobium</i>
UASB法	絶対嫌気	上向流	発生ガス	<i>Methanotrix</i>	<i>Methanotrix</i>
MRB法	微好気	上向流	上向流	硫酸還元菌	<i>Beggiatoa</i>
AUSB法	好気	上向流	機械攪拌	好気性菌	<i>Sphaerotilus</i> 等

①糸状性の形態を持つ微生物の存在

USB法においては菌糸を延ばしながら増殖する

*Hyphomicrobium*が、UASB法においては糸状性の増殖を行う *Methanotrix*が優占種となっている¹⁵⁾。グルコース、グルタミン酸ナトリウムを主成分とする合成排水を基質としたUASB実験装置（内径60mm、高さ1000mm）において¹⁶⁾形成されたグラニューールの構成微生物（主として *Methanotrix*と推定される）の走査型電子顕微鏡写真を図6に示す。

MRB法とAUSB法の造粒汚泥においては、その外周部を *Beggiatoa*、*Sphaerotilus*等の糸状性の形態を示す微生物により取り囲まれており¹⁴⁾¹⁵⁾、自己造粒化に糸状性の微生物が大きく関与していることが推定される。糸状性の微生物の関与がないものとして、USB法で水素供与体に酢酸あるいはグルコースを用いた場合に形成されるグラニューール状汚泥や、UASB法でメタノールを基質とした時に形成される *Methanosarcina*が優占種になったグラニューール状汚泥も観察されているが¹⁶⁾、いずれも強度的に弱く実用的とは言い難いものであった。

USB法、UASB法で形成されるグラニューールは糸状性の菌体が優占種となっているため非常に強度的にも優れており、MRB法、AUSB法で形成される造粒汚泥は周囲を糸状性微生物に取り囲まれているだけであり、造粒物全体に渡っての絡まり合いがないため、強度的には弱くなっていると考えられる。糸状菌体に適度な攪拌条件を与えると菌体同士が絡まり合い造粒物を形成することは、糸状性細菌 *Type021N*を用いた実験¹⁷⁾あるいは真菌類を用いた多くの培養実験¹⁸⁾においても確認されている。

②マイルドな攪拌

全ての自己造粒法で満たされている条件であり、過度の剪断力は凝集物の破壊や、細胞外代謝物質の菌体周囲からの剥離につながっていると考えられる。USB法、UASB法では上昇流と微細な発生ガスによって、MRB法では上昇流のみによって、AUSB法では上昇流と緩速機

械攪拌によりマイルドな剪断力を微生物に与えている。また、マイルドな攪拌が凝集物質に対し造粒効果を持つことは、浄水処理や下水汚泥処理での各種フロック形成操作において周知の通りである。

③上向流式の通水形態

この条件も上述の全ての自己造粒法に共通している点である。②項のマイルドな攪拌とも関連する事項であるので単純に切り離して考えることは難しいが、糸状性細菌Type021Nがフラスコ培養によって造粒化したことから必須条件とは言い難い。しかしながら、実排水の処理においては原水中に雑多な微生物や浮遊物質が含まれていることが多く、これらの中で不要なものを系外にウォッシュアウトした方がグラニュール化に好ましいことを考慮すれば、排水処理においては上向流の通水も必要条件として良いのではないかと考えられる。

④細胞外代謝物質の寄与

フロック形成に大きく関与していると考えられ、細胞外代謝物質の関与しない微生物系を作ることが実質上不可能であるため、この影響を定量的に把握することは難しい。酢酸のみを有機源としたUASB法において形成されたグラニュールが*Methanothrix*が優占種であるにもかかわらず非常に小さく、酢酸、蔗糖の混合基質を用いたUASB法において2~3mmの良好なグラニュールが形成されたこと¹⁹⁾(蔗糖を加えることにより酸生成菌が増殖し、その産生する細胞外代謝物質により微生物同士の付着が促進されたと推定されている)や、AUSB法における細胞外代謝物質の凝集能の解析²⁰⁾を考え合わせると、自己造粒化にプラスに作用していることは確実と言える。

各種の自己造粒法の共通点を中心にグラニュール化の必要条件の検討を行ったが、自己造粒あるいはグラニュール化といった言葉自体の定義が曖昧なため、今後も数多くの報告から共通事象として捉えて良いものとするのではないものを区別しながらさらに検討を加えていく必要があると考える。本報で自己造粒化として捉えたものは、単に汚泥が粒状になったという点だけではなく、粒状化に伴い微生物相の変遷が起り、結果として高性能の処理能力につながったものを選定した。いずれにせよ、グラニュール化のメカニズムには不明な点が多く、今後さらに検討を加えていく必要があると考える。

4. まとめ

USB法において水素供与体の種類が汚泥の自己造粒化、リアクターの脱窒能に与える影響を検討し、メタノールを水素供与体として使用した場合に良好な自己造粒汚泥が形成され、高い脱窒能を示すことが明確となった。

一方、酢酸あるいはグルコースを水素供与体とした場合には、良好なグラニュール形成はなされなかった。

USB法等の自己造粒法のグラニュール化メカニズムは未解明であるが、各種自己造粒法の比較を行ない、これらの自己造粒に関与する共通な事項として、以下の点が挙げられた。

- (1) 糸状性細菌あるいは糸状性の増殖形態をとる微生物が、互いに絡まり合うことにより自己造粒化グラニュールを形成している場合が多い。糸状性の微生物の関与していないグラニュールの形成も認められているが、強度的に脆く、実用的なものではない。
- (2) マイルドな攪拌を行なうことは、全ての自己造粒法で満たされている条件である。
- (3) 上向流の通水も全ての自己造粒法で満たされていることではあるが、糸状性細菌のType021Nがフラスコ培養によって造粒したことから必須条件とは言い難い。しかし、不要な微生物等を系外にウォッシュアウトすること及びマイルドな攪拌への寄与等により、排水処理において上向流通水は必要条件となると考えられる。
- (4) 微生物の細胞外代謝物質のフロック形成への関与は、自己造粒化以前の問題として既に認められていることであるが、自己造粒化においてもプラスに作用していると考えられる。

引用文献

- 1) Lettinga, G. and van Velsen A.F.M. : Toepassing van Methaangisting voor de Behandeling van Minder Geoconcentreerd Afvalwater, H₂O, 7 : 281-289 (1974)
- 2) 原田秀樹, 荒木信夫, 四蔵茂雄, 桃井清至 : 多段槽型上昇流スラッジベッド反応器による高効率脱窒素プロセスの処理特性, 衛生工学研究論文集, 21 : 153-162 (1985)
- 3) Klapwijk, A. and Lettinga, G. : Discussion on the Paper of Bailey and Thomas, Prog. Wat. Technol., 7 (33) : 338 (1975)
- 4) Miyaji, Y. and Kato, K. : Biological Treatment of Industrial Wastes Water by Using Nitrate as an Oxygen Source, Wat. Res., 9 : 95-101 (1975)
- 5) 高橋正宏, 京才俊則 : 多段反転流式バイオリアクター(MRB)の開発, 土木学会第24回年次学術講演会講演概要集, 836-837 (1987)
- 6) 三島浩二, 栃久保英二 : 活性汚泥の自己固定化—好気性上向流式汚泥床法の下水処理への適用—, 用水と廃水, 31 (1) : 28-34 (1989)
- 7) Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8th Edition, Part 4, Budding and/or Appendaged Bacteria,

- 8)遠矢泰典：生物学的脱窒素法に関する研究(Ⅲ)－活性汚泥の脱窒素機能および有機炭素源に関する検討－，下水道協会誌，7(76)：23-39(1970)
- 9)Narkis,N.,Rebhum,M. and Sheindor,C.H.：Denitrification at Various Carbon to Nitrogen Ratio, Wat. Res., 13：93-98(1979)
- 10)van der Hoek,J.P.,Latour,P.J.M. and Klapwijk,A.：Denitrification with Methanol in the Presence of High Salt Concentrations and at High pH Levels, Appl. Microbiol. Biotechnol., 27：199-205(1987)
- 11)Timmermans,P. and Haute,A.V.：Denitrification with Methanol:Fundamental Study of the Growth and Denitrification Capacity of *Hyphomicrobium* sp., Wat. Res., 17(10)：1249-1255(1983)
- 12)Zehnder,A.J.B.,Huser,B.A.,Brock,T.D. and Wuhrmann,K.：Characterization of an Acetate- Decarboxylating, Non-Hydrogen-Oxidizing Bacterium, Arch. Microbiol, 124：1-11(1980)
- 13)明賀春樹，熊谷清己：UASB法による高濃度有機性排水の処理，用水と廃水，31(1)：42-48(1989)
- 14)Takahashi,M.and Kyosai,S.：Pilot Plant Study on Microaerobic Self-Granulated Sludge Process (Multi-Stage Reversing-Flow Bioreactor:MRB), Wat. Sci. Tech., 23：973-980(1991)
- 15)Mishima,K.and Nakamura,M.：Self-Immobilization of Aerobic Activated Sludge-A Pilot Study of the Aerobic Upflow Sludge Blanket Process in Municipal Sewage Treatment, Wat. Sci. Tech., 23：981-990(1991)
- 16)須藤隆一 編：微生物固定化法による廃水処理，220-280，産業用水調査会(1988)
- 17)中村信子，千種薫：Type 021Nの自己造粒法，第25回水質汚濁学会講演集，250-251(1991)
- 18)藤田正憲，岩堀恵祐，山川公一郎，立田茂：カビの pellet形成能とそのデンプン廃水処理への応用に関する研究，日本水処理生物学会誌，11：45(1991)
- 19)原田秀樹，桃井清至，石浜英司，種市尚仁：嫌気性細菌の自己造粒化機構を利用したメタン発酵リアクターの高速処理特性，衛生工学研究論文集，24：241-251(1988)
- 20)安井智子，三島浩二，宮晶子，栃久保英二：好気性活性汚泥の自己固定化(第3報)－自己造粒汚泥における菌体外高分子の性状－，第25回水質汚濁学会講演集，246-247(1991)