

B-37

毛髪分解菌のスクリーニングによる汚泥コンポストの品質向上に関する研究

八戸工業高等専門学校 建設環境工学科
同上○倭 常郎
矢口淳一

1. はじめに

近年、下水道の普及が進むにつれ下水処理によって発生する汚泥の量も年々増加している。廃棄物最終処分場の新規立地が困難で、最終処分場の残余年数も残りわずかという状況をかんがみると、下水汚泥の有効利用への取り組みが急務であるといえる。下水汚泥の有効利用用途として、主に熱・エネルギー利用、建設資材化、緑農地利用がある。建設資材化は近年有効利用量が増加しているのに対し、緑農地利用はここ 10 年間ほとんど増加していない¹⁾。これは、コンポスト化のメリットとは裏腹に、需要と供給のアンバランス、重金属の含有、毛髪の残存などの問題点も多いためである。

下水汚泥を発酵させてコンポストにした時、コンポスト中に最後まで毛髪が残り品質低下を招いている。そこで汚泥のコンポスト過程で毛髪を生物分解できればコンポスト製品の品質向上が図れると考え、毛髪の成分であるケラチンを分解する微生物を探索して分離培養し、初期発酵で 50～60℃ の高温に曝されるコンポスト過程でも機能する微生物をスクリーニングした。

2. 実験方法

図-1 に実験のフローを示す。まず始めに土壌、活性汚泥、底泥、養鶏場付近の土壌などからサンプルを収集する。表-1 に示した分離培地を使用してサンプルを適宜希釈し平板培養する。分離培地には、毛髪の主成分であるケラチン（和光純薬製）と乳タンパク質であるスキムミルク粉末（東京化成製）を単一炭素源とする合成寒天培地を使用し、各寒天培地上で明白なハローを形成した菌株をスクリーニングする。単離した菌株はスラント培地で長期保存する（約 3 ヶ月間）。ここまですべて 1 次スクリーニングと呼ぶ。

次に 2 次スクリーニングでは、分離株のケラチン分解活性と毛髪分解活性を液体培養で測定した。液体培養では表-1 の培地から寒天を除き酵母エキスを 1g/L の濃度で添加したケラチン液体培地及びエタノールと水で洗浄し乾燥させた毛髪 2 g/L に表-1 の無機塩類、酵母エキスを添加した毛髪液体培地を使用し、温度 30℃、回転数 120rpm、期間約 10 日間の条件で 50mL の坂口フラスコで振とう培養を行った。分解生成するアミノ酸をニンヒドリン試薬で定量し²⁾、分離菌の活性を調査した。また液体培養終了後の毛髪をラクトフェノールブルーで染色して顕微鏡で観察し、毛髪の分解状況を調べた。2 次スクリーニング結果で活性が高かった菌株はケラチン液体培地と毛髪液体培地で 22 日間振とう培養し、生成するアミノ酸濃度の経日変化を調べ最適株の選定を行った。

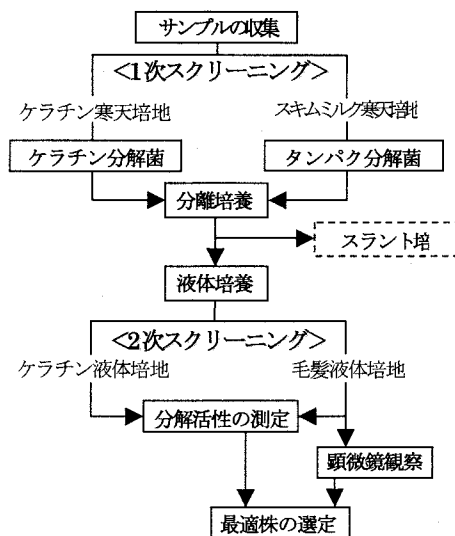


図-1 実験のフロー

表-1 分離培地の組成

無機塩類	K ₂ HPO ₄	1.0g/L
	KH ₂ PO ₄	0.5g/L
	MgSO ₄ ・7H ₂ O	0.025g/L
	CaCl ₂	0.025g/L
	FeSO ₄ ・7H ₂ O	0.015g/L
	ZnSO ₄ ・7H ₂ O	0.005g/L
炭素源	Keratin	10g/L
	Skim milk	30g/L
寒天	Agar	18g/L
pH 7.3		

3. 実験結果と考察

3. 1 1次スクリーニング結果

現在までに分離培養した菌株は約 60 株程度あり、スキムミルク寒天培地から分離したタンパク質分解菌が 50 株、ケラチン寒天培地で分離培養したケラチン分解菌が 11 株であった。分離株のうち 45 株は土壌からで、河川底泥から 8 株、鳥糞から 6 株、腐敗きのこから 2 株分離した。また 80%以上がバクテリアで、放線菌 6 株、カビ 2 株、酵母 1 株であった。

3. 2 2次スクリーニング結果

分離培養した菌株 61 株と購入株 12 株は、ケラチン液体培地と毛髪液体培地で振とう培養し、ケラチン分解活性と毛髪分解活性を測定した。表-4 はケラチンや毛髪分解能力が高い菌株を 10 株スクリーニングした総括表である。顕微鏡などによる形態観察により、No.2、No.4、No.5、No.6 および No.7 株は、*Bacillus* 属、No.8、No.9、No.10 は放線菌であると推測された。*Bacillus* 属と推測された 5 株は芽胞を有し、耐熱性試験の結果 60℃の高温でも耐えられることが確認できた。また、No.8 株と No.10 株についても耐熱性試験で 60℃の高温に耐えうる性質を持っていることが分かった。

液体培養実験によって得られた表-2 に示した 10 株のケラチン分解活性を図-2 に、毛髪分解活性を図-3 に示す。ケラチン及び毛髪を分解して生成したアミノ酸の量は、ケラチン液体培地の方が毛髪液体培地より約 10 倍多く、収率で比べてもケラチン培地では 50%を超える菌株が 3 株見られたのに対し、毛髪培地では 1 株もなかった。これは液体培地中のケラチンと毛髪の初期濃度が 5 倍違うことも影響するが、強固な毛髪の構造も大きく影響していると考えられる。

毛髪の構造はメジュラ、コルテックス、キューティクルの 3 層構造となっており、毛髪内部のコルテックスを硬いうろこ状のキューティクルが被覆し保護している。このように毛髪は強固なキューティクルで保護されているので、ケラチンに比べて分解活性が低かったものと考えられる。

10 株のケラチン分解活性を比較すると、No.10 株が最も活性が高く次いで No.9 株、No.4 株の活性が高かった。一方、図-3 に見られるように毛髪分解活性は各分離株とも分解活性に大きな差は見られなかった。おそらくこれは、No.1、No.2、No.3 株は毛髪を保護しているキューティクルを破壊する能力は高いが、毛髪内部のケラチンを分解する能力は低く、それに対し No.4、No.9、No.10 株はキューティクルを破壊する能力も、内部のケラチンを分解する能力も高いからだと考えられる。写真-1 に No.5 株の液体培養後の毛髪の顕微鏡写真を示す。毛髪は分解が進んで毛髪内部を保護していたキューティクルが破壊され、内部のコルテッ

表-2 スクリーニング結果のまとめ

菌番号	分離源	菌の形態	耐熱性試験*	毛髪の顕微鏡観察**	推定される属
No.1	土壌	長桿菌	—	—	
No.2	土壌	桿菌・芽胞あり	+	+	<i>Bacillus</i>
No.3	河川底泥	球菌	—	++	
No.4	鳥糞	桿菌・芽胞あり	+	++	<i>Bacillus</i>
No.5	土壌	桿菌・芽胞あり	++	+++	<i>Bacillus</i>
No.6	腐葉土	桿菌・芽胞あり	++	++	<i>Bacillus</i>
No.7	購入株	桿菌・芽胞あり	+	+	<i>Bacillus licheniformis</i> (NBRC14206)
No.8	腐敗きのこ	糸状菌	++	+++	放線菌
No.9	土壌	糸状菌	—	+++	放線菌
No.10	腐敗きのこ	糸状菌	++	+++	放線菌

*60℃、2時間の耐熱性試験

(—) : コロニー形成無し、(+) : 一部コロニー形成、(++) : 大部分コロニー形成

**液体培養後の (30℃、10 日間、120rpm) 毛髪顕微鏡観察

(—) : 変化なし、(+) : 一部の毛髪破損、(++) 約半数の毛髪破損、(+++) : 大多数の毛髪破損

クスが露出しマクロフィブリルがほぐれてきていた。No.5株と同様に、No.8、No.9、No.10株はほとんど全ての毛髪で、表面のキューティクルが剥離していた。ケラチン分解活性が高く顕微鏡観察でも良好な結果が得られたNo.9株、No.10株、またケラチン分解活性や毛髪分解活性は他の菌株より劣っていたが、顕微鏡観察ではほとんどの毛髪でキューティクルの剥離が確認できた No.5 株は有望な菌株であると考えられる。また No.5、No.9、No.10 株は耐熱性試験でも良好な結果が得られたので、50～60℃以上となるコンポスト過程でも有効に機能することが期待される。

3. 3 最適株の選定結果

2 次スクリーニングで良好な結果を得ることができた No.5、No.9、No.10 株については、ケラチン液体培地と毛髪液体培地を用いて 22 日間振とう培養を行い、生成するアミノ酸濃度の経日変化を調査した。

図-4 に 3 株のケラチン分解活性の経日変化を示す。No.10 株は実験開始後 5 日目までアミノ酸濃度が最大となったのに対し、No.9 株は 10 日目にピークを向かえた。このピーク値のデータを速度に変換すると、No.5 株は 0.918g/L・日、No.9 株は 0.947g/L・日、No.10 株は 1.834g/L・日となり、No.10 株は No.5 株と No.9 株の 2 倍のアミノ酸生成速度を示した。この結果から No.10 株について良好な結果が得られ、最も有望な菌株であると考えられる。毛髪分解活性の経日変化については、3 株とも同じような挙動を示し実験開始 10 日以降はアミノ酸濃度の増加はほとんど見られなかった。この 10 日目のデータからアミノ酸生成速度を算出すると、3 株とも 0.19～0.22g/L・日の範囲で、ケラチンからのアミノ酸生成速度の約 1/5～1/10 であった。

4. 終わりに

液体培養、耐熱性試験および毛髪の顕微鏡観察による毛髪分解菌のスクリーニング結果から、*Bacillus* 属と推定された 1 株、放線菌であった 2 株が毛髪分解に有望であると推測された。さらにその 3 株について液体培養におけるアミノ酸生成速度を調査したところ、放線菌である No.10 株がスクリーニングした株の中で最も有望であると確認できた。

参考文献

- 1) 松田 尚之：下水汚泥処理処分の現状と今後の方向、Vol45、月間建設 01-10、pp 11-13 (2001)
- 2) 社団法人日本生物工学会編：生物学実験書、培風館、pp6-7 (1992)
- 3) 小山次郎、竹内敏人、堀内忠郎、山科郁夫、山場 力訳：レーニンジャーの新生科学 (上)、廣川書店、P165-185 (1984)

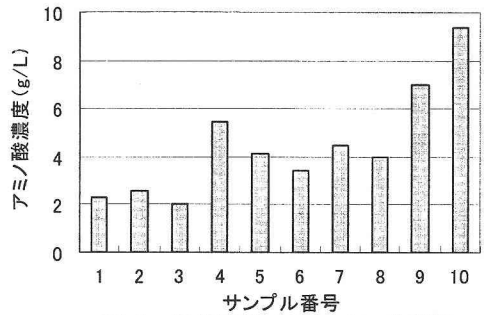


図-2 各分離株のケラチン分解活

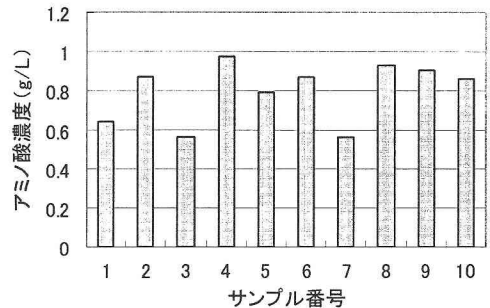


図-3 各分離株の毛髪分解活性

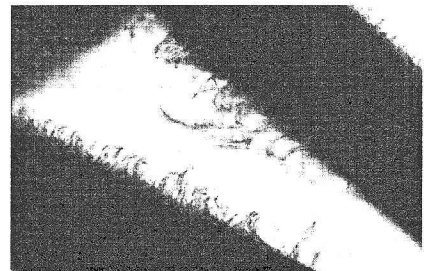


写真-1 No.5 株の液体培養後の毛髪 (×400)

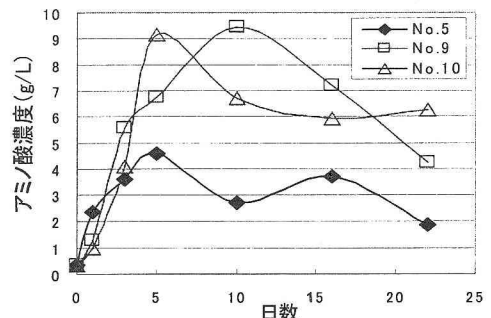


図-4 3 株のケラチン分解活性の経日変化