研究論文

油脂分解菌を用いた厨房排水の浄化に関する研究

龍田 典子*・横堀 加奈里*・井上 綾*
案浦 謙二*・手嶋 功**・上野 大介*
井上 興一*・染谷 孝*

要 旨

飲食店や食品工場の排水には、多量の油脂分が含まれていることがあり、下流側の下水管の閉塞防止や下水道への汚濁負荷低減を図るためにグリストラップの設置が義務づけられている。本研究では、グリストラップから新規に油脂分解菌の分離を行い、311株の分離細菌株から油脂分解能、タンパク質分解能およびデンプン分解能の高い分離株 *Aeromonas* sp. KHU を選抜した。本菌の培養および保存性に適した培地を選定した結果、この培地中で安定した菌数を 30℃ で約 5 週間維持できることを培養法および蛍光染色法により確認した。本菌を厨房排水処理に適用する目的で、その油脂分解性を実験室で測定した結果、厨房排水に含有する油脂分（n-ヘキサン抽出物）濃度の高低にかかわらず 15～48 時間で 86～91% の高い分解率を示した（油脂分解速度：20～46 mg/ℓ/hr）。さらに現場適用試験の結果、300 ℓ のグリストラップに本菌を每晚 100 ml 接種することにより油脂分が 90% 以下にまで分解され、約 5 週間の試験期間中、油脂分濃度を 40 mg/ℓ 以下に維持した。

キーワード：油脂分解菌, *Aeromonas*, グリストラップ, 厨房排水処理

はじめに

飲食店等の厨房排水には、動植物油が含まれており、これが冷えて凝固すると下水管の閉塞を招くほか、終末処理場の汚濁負荷の一因となる。この問題を解消するため、下水道法第 12 条および建築基準法では、あらかじめ個々の発生源で事前に処理を行うことが必要であるとし、グリストラップの設置を義務づけている。

グリストラップとは、厨房から出る汚水を受ける 200 ℓ 程度の貯め樽であり、構造としては、厨芥の受けカゴと、油脂分（グリス）が浮き上がるように隔て板が 2 枚以上設けてあり、水面に油脂分の層ができるようになっていいる。冷えて凝固した油脂分は、人手で清掃回収され、産業廃棄物として焼却処分などの適切な処分を行うことが必要である。トラップ内に蓄積された油脂分は、定期的に除去される必要があり、その周期

は設計段階で定められており、一般には 7～10 日である。また、トラップ内の受けカゴの厨芥は、原則として毎日除去することが必要であり、長く放置しておくと厨芥の一部が腐敗して悪臭を放ち、非衛生的になる恐れがある。

近年、グリストラップに曝気装置を設置し、同時に微生物資材を使用し、油脂分を好氣的に分解浄化させ、グリストラップの清掃保守の負担を軽減させるバイオ技術が出現し、その用途に用いる油脂分解菌に関する論文もいくつか報告されている¹⁻⁵⁾。これらでは、油脂分解菌培養液の注入装置を現場に設置して、約 1 ヶ月間かけて毎日一定量接種する方式が主流である。この場合、微生物の油脂分解力と生存性の維持が品質管理の上で特に重要となると考えられる。しかし我が国では、微生物資材には品質管理の法的な制度や基準がなく、効果の疑わしいものも少なくない⁶⁾。

* 佐賀大学農学部 Noriko RYUDA, Kanari YOKOBORI, Aya INOUE, Kenji ANNOURA,
Daisuke UENO, Koichi INOUE, Takashi SOMEYA

** (株)九州ケミカルクリーン Isao TESHIMA

2009 年 6 月 4 日受付

2009 年 9 月 17 日受理

そこで本研究では、厨房排水の浄化に有効な細菌を得るため、油脂分解能およびタンパク質分解能の強い細菌をグリストラップ内の厨房排水から新規に分離・選抜し、培養および保存性に適した培地を検討した。さらに、選択した油脂分解菌の菌種を同定し、厨房排水中での油脂分解性を実験室試験および現場グリストラップ試験により検証した。

1. 材料および方法

1.1 油脂分解菌の分離および性状試験

1.1.1 試 料

九州各地の飲食店および旅館のグリストラップ 11 箇所より厨房排水を 11 点採取した (表 1)。

1.1.2 分 離 培 養

滅菌生理食塩水を用いて、グリストラップ試料を $10^4 \sim 10^5$ 倍希釈し、その $100 \mu\text{l}$ を試料当たり 3 枚の普通寒天培地 (栄研化学 : 5.0 g/l 肉エキス, 10.0 g/l ペプトン, 5.0 g/l NaCl, 15.0 g/l 寒天, pH7.0) に塗抹接種し、 30°C で 7 日間培養した。得られた細菌コロニーから試料当たり約 40 株を釣菌し画線塗抹分離法により純粋培養を得た。

1.1.3 有機物分解試験

分離株の有機物分解能を寒天平板上で試験した。油脂分解能試験には Tween20 培地 (10.0 ml Tween20, 10.0 g/l ペプトン, 5.0 g/l NaCl, 0.1 g/l $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$,

15.0 g/l 寒天, pH7.4) を用い、新鮮培養菌液を塗抹接種し 30°C で 5 日間培養後、コロニーの周囲にみられる Tween20 分解によるカルシウム塩の白濁帯をもつものを油脂分解能陽性菌として判定した⁷⁾。タンパク質分解能試験には、カゼイン培地 (10.0 g/l カゼインナトリウム, 5.0 g/l N-Z Case Plus, 2.5 g/l 酵母エキス, 1.0 g/l グルコース, 0.88 g/l CaCl_2 , 4.4 g/l クエン酸 3 ナトリウム, 15.0 g/l 寒天, pH6.6) を用い、 30°C で 2 日間培養後、カゼインの分解による白濁帯をもつものをタンパク質分解能陽性菌として判定した⁸⁾。デンプン分解能試験には、デンプン培地 (1.0 g/l 酵母エキス, 5.0 g/l 可溶性デンプン, 15.0 g/l 寒天, pH 無調整) を用い、 30°C で 3 日間培養した後、培地にルゴール液 (6.7 g/l ヨウ化カリウム, 3.3 g/l ヨード) を注ぎ、デンプン・ヨード反応により濃紫色となった培地上で透明帯を示した株をデンプン分解能陽性菌として判定した⁹⁾。

1.1.4 病原因子試験

病原因子試験として、DNA 培地 (栄研化学 : 500 g/l ウシ心臓抽出液, 10.0 g/l ペプトン, 2.0 g/l デオキシリボ核酸, 5.0 g/l NaCl, 0.45 g/l CaCl_2 , 15.0 g/l 寒天, pH7.4) を用いて核酸分解酵素産生の有無を、羊血液寒天培地 (栄研化学) を用いて溶血毒素産生の有無を調べた。DNA 培地では、被験菌を 37°C で 18~20 時間培養し、培地表面に 1.5N の塩酸を約 5 ml かけて

表 1 厨房排水試料の細菌数および分離菌株の油脂分解能およびタンパク質分解能

試料 番号	採取場所	pH	培養可能 細菌数 (CFU/ml) *	分離 株数	分離株に占める割合 (%)			
					グラム陰性菌	油脂分解菌	蛋白質分解菌	油脂+蛋白質
1	レストラン R	9.0	ND	0	NT	NT	NT	NT
2	レストラン P	6.1	2.5×10^7	39	100	67	74	13
3	うどん店 S	4.8	3.6×10^5	38	89	24	97	26
4	旅館 K	6.6	4.7×10^7	38	97	39	92	32
5	レストラン P	6.4	1.1×10^7	40	90	25	100	28
6	レストラン T	6.8	7.8×10^5	39	100	59	44	21
7	ラーメン店 K	測定不可	3.3×10^6	0	NT	NT	NT	NT
8	飲食街 D	4.7	1.7×10^7	40	100	23	78	20
9	旅館 A	5.7	8.0×10^6	0	NT	NT	NT	NT
10	旅館 B	5.8	1.9×10^8	40	65	28	93	30
11	レストラン B	4.5	5.2×10^8	37	81	27	89	30
計				311	90	36	83	29

* 普通寒天培地

ND : Not detected (検出限界 : 30 CFU/ml) , NT : Not tested

15分以内にコロニーの周囲にDNAの分解による透明帯が形成されたものを陽生と判定した。羊血寒天培地では、被験菌を37℃で2日間培養し、コロニーの周囲に接して境界が明瞭で無色透明な溶血環が観察されたものを β 型溶血、コロニーの周囲に狭い緑色の溶血環が観察されたものを α 型溶血、溶血が全く認められないものを γ 型溶血（非溶血）と判定した。

1.2 分離株の同定

1.2.1 API

分離株の新鮮培養液を簡易同定キット API20NE（日本ビオメリュー）の培養ウェルに接種し、37℃で24時間好気培養した。培養ウェル中の自発的な反応および試薬添加による呈色反応を記録し、その結果を7桁のAPIプロファイルコードに変換し、これをAPI20NEプロファイルインデックスと照らし合わせて菌種を同定した。

1.2.2 シークエンシング

分離株の16S rRNAの塩基配列を決定し、菌種を同定した。新鮮培養菌液からDNAを抽出し¹⁰⁾、10F（5'-AGTTTGATCCTGGCTCAG-3'）および1510R（5'-GGCTACCTGTGTTACGACTT-3'）プライマーを用いてPCR法によりDNAを増幅した。PCR条件は、96℃で5分間のホットスタート後、96℃で30秒間の変成、60℃で1分間のアニーリング、72℃で1分間の伸長を25サイクル行った。PCR産物を1%アガロースゲルでの電気泳動（100V, 20min）後、エチジウムブロマイド染色し、バンドを切り出した。QIAEX II（QIAGEN）で精製し、DNA解析システム¹⁰⁾を用いて塩基配列を決定した。得られた塩基配列データの編集にはGENETYX-MAC（ゼネティックス）を使用し、データベース検索にはDNA Data Bank of Japan（DDBJ）のBLASTを利用した。

1.3 培養液の保存性試験

分離株の液体培養に適した培地の検討および培養液中における生存性を培養法および蛍光染色法を用いて検証した。

1.3.1 液体培地の検討

PYG培地（10.0 g/ℓ ペプトン, 5.0 g/ℓ 酵母エキス, 10.0 g/ℓ グルコース, 1.0 g/ℓ KH_2PO_4 , 0.5 g/ℓ $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1.0 g/ℓ NaCl, pH7.0）およびPY培地（10.0 g/ℓ ペプトン, 5.0 g/ℓ 酵母エキス, 1.0 g/ℓ KH_2PO_4 , 0.5 g/ℓ $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1.0 g/ℓ NaCl, pH7.0）それぞれとそれらを2倍および5倍希釈した液体培地を用いて被験菌の培養性・保存性を検討した。これらの培地18 mLを入

れたL字管に被験菌の新鮮培養液（普通ブイヨンで30℃, 18時間振とう培養したもの：普通ブイヨンは普通寒天培地から寒天を除いた培地）180 μL を接種し、30℃で24時間振とう培養した後、そのまま30℃で42日間静置培養し、普通寒天培地を用いた平板培養法により経時的に菌数を測定した。

1.3.2 液体培養の保存性試験

5倍希釈PY培地1,800 mLを2ℓ容のポリプロピレン製ボトルに入れ、滅菌した。被験菌の新鮮培養液をこの培地に2 mL接種し、30℃で2日間静置培養した後、そのまま30℃で1ヶ月間静置保存した。経時的に菌液を1 mL採取し、普通寒天培地を用いた平板培養法（30℃, 2日間）およびCTC-SYBR Green I二重蛍光染色法により菌数を測定した。

1.3.3 CTC-SYBR Green I 二重蛍光染色法

5-cyano-2,3-ditolyl tetrazolium Chloride (CTC) 法¹¹⁾により、被験菌の生細胞数を定量した。本法は、呼吸活性を有する細胞を蛍光顕微鏡下で検出することにより生細胞を検出・定量する方法である。CTCは蛍光を持たないが、菌体内に取り込まれた後、電子伝達系の働きにより還元されて蛍光性で不溶性のCTC-formazanに変わり、細胞内に沈着する。これに青色(B)励起光を照射すると、オレンジ色の蛍光を発する。ただし、CTC-formazan粒子は、1細胞中に数個存在することがあり、また、細胞外にCTC-formazan粒子が観察されることもある。そこでSYBR Green Iで細胞全体を染め、細胞内にCTC-formazanを持つものを計数するYoshida & Hiraishi (2004)の方法¹¹⁾に従った。

被験菌液試料を除菌滅菌生理食塩水を用いて3回遠心洗浄し（14,000 rpm, 5min），除菌滅菌生理食塩水1 mLに再懸濁した。マイクロチューブに除菌水400 μL 、基質液（5,000 mg/ℓ 酵母エキス）50 μL 、10 g/ℓ CTC溶液50 μL 、10 mMメルドラスブルー（電子伝達補助剤）5 μL および培養液試料500 μL を入れ、よく混合し、30℃で4時間インキュベートし、ホルマリン固定液（ホルマリン原液に30 g/ℓ ホウ酸ナトリウム溶液を加えて中性にしたもの）を20 μL 添加し固定した。吸引濾過器にメンブランフィルター（孔径5 μm ）とヌクレポアフィルター（孔径0.2 μm ）を順にのせ、その上にファンネルをセットした。ヌクレポアフィルターは、あらかじめ、Poly-L-lysine（100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）水溶液に一晩浸し、親水化処理したものを使用した。ファンネルに除菌水を約2 mL程度入れてから、試料を適量添加し、

吸引濾過した。除菌水数 ml により余剰染色液を洗浄し、再度吸引濾過した。これに、0.1 M Phosphate buffer (pH 7.2) を用いて 2,000 倍に希釈した SYBR Green (SG) I 溶液を約 1 ml のせ、室温、遮光状態で 3 分間対比染色した。吸引濾過して染色液を取り除き、スライドガラスにイマージョンオイル (Olympus 製、非蛍光、屈折率 1.516) を 1 滴落とし、そこに上記ヌクレオフィルをのせ、その上にイマージョンオイルを 1 滴のせて、カバーガラスで封入し、落射型蛍光顕微鏡 (Nikon Optiphot EFD-3) の B 励起下 (450~490 nm)、対物 100 倍で検鏡した。黄緑~緑色の蛍光を発する細胞内に、赤色~橙色の CTC-formazan 粒子が観察される細胞を生菌として計数した。

1.4 油脂分解試験

1.4.1 サラダ油培地による油脂分解試験

普通ブイヨンに市販のサラダ油 (神戸物産 MK6, 原材料; なたね油, 大豆油) を 5 ml/ℓ 添加したものをサラダ油培地 (pH 7.0±0.2) として用いた。この培地 100 ml を 200 ml 容三角フラスコに入れ、シリコ栓を付けてオートクレーブ滅菌した。

普通ブイヨンによる被験菌の新鮮培養液 1 ml をサラダ油培地 100 ml, 3 本にそれぞれ接種した。30℃, 120 rpm で 48 時間振とう培養 (レシプロカル振とう培養機: Thomas, AT-12R), 経時的に 1 本ずつ取り出して、n-ヘキサン抽出物定量法 (JIS K 0102) にて油脂分濃度を測定し、生菌数を普通寒天培地による希釈平板法にて測定した。

1.4.2 厨房排水による油脂分解試験

中華料理店 (愛媛県松山市) および佐賀大学学生食堂の厨房排水を油脂分解試験に供した。厨房排水には固形物や固形状の油脂分が含まれ、そのままでは測定誤差が大きくなるため、ガラス繊維濾紙 (孔径 1 μm) を用いて濾過し、固形物を除去したのち、ホモジナイザー (日本精機 AM-11 型) を用いて 15,000 rpm, 15 分間の分散処理を行い、油脂分をエマルジョン化した。この処理液を分液漏斗 (1 ℓ 容) に入れて約 10 分間静置した後、乳化した溶液のみを分取し、1M NaOH を用いて pH 7.0~7.3 に調整した。

上記前処理した厨房排水を 2 ℓ 容の三角フラスコ 2 個に 1 ℓ ずつ入れ、1 個は無接種で、1 個には被験菌株の新鮮培養液を 1 ml 接種し、いずれも 30℃ で通気培養 (通気量 1.5 ℓ/min), 経時的に試料 100 ml を採取し、油脂濃度を測定した。

1.5 グリストラップへの接種試験

佐賀大学学生食堂のグリストラップ (実容積 300 ℓ) を用いて実地試験を行った。この食堂では平日約 1,000 食を提供し、1 日約 8 m³ の厨房排水があった。グリストラップに曝気装置とタイマー付ペリスタポンプによる自動接種装置 (オイルコントロールシステム) を設置し、最初の 37 日間は曝気処理 (5 ℓ/min) のみとし、その後、被験菌を毎晩 21 時に 100 ml 接種し、これを 35 日間続けた。経時的に試料を採取し、油脂分濃度および pH (ガラス電極法) を測定した。なおサンプリングは学生食堂が営業する直前の午前 9 時に行った。

2. 実験結果および考察

2.1 油脂分解菌の分離および同定

九州各地の飲食店および旅館のグリストラップ 11 箇所から 11 点の厨房排水を採取した (表 1)。これらの試料の pH は 4.5~9.0 で、普通寒天培地による培養可能な細菌数は不検出ないし 10⁵~10⁸ CFU/ml であった。このうち試料 1 では菌数が不検出で pH が 9.0 であったことから、アルカリ性漂白殺菌剤が高濃度に使用されたため、一時的に無菌状態になったものと考えられた。また試料 7 では、グリストラップがラード分で満たされ、pH 測定が不可能であった。細菌数が比較的高い試料 8 点から細菌株を分離純化し、311 株を得て、それらをグラム染色および各種有機物分解試験に供した (表 1)。分離株の 90% はグラム陰性菌で、油脂分解能およびタンパク質分解能を有する株はそれぞれ 36% および 83% で、油脂およびタンパク質分解の両方をあわせ持つ株は 29% であった。

上記の結果から、厨房排水中の細菌は、その生育環境を反映して有機物分解能を有する細菌が多いことが判明した。グリストラップ内は富栄養環境であるとともに、消毒剤などの影響も大きく、極端な環境変動がみられる微生物生態系であるといえる。

得られた 311 株の分離菌株から、油脂分解能に加えてタンパク質分解能およびデンプン分解能の高い 3 株 (KY8-27, KHU, KY5-1) を選抜し、API を用いて同定し、同時に、病原因子について試験した。これら 3 菌株はいずれもグラム陰性無芽胞桿菌で、KY8-27 株は *Rahnella aquatilis* (同定確率 79.4%), KHU 株は *Aeromonas hydrophila* (94.0%) および KY5-1 株は *Serratia marcescens* (99.6%) と同定された。病原因

子の確認試験の結果、これら3菌株のうち、KY5-1株のみが核酸分解酵素を有しており、*S. marcescens*の一般的な性状と一致した。また、溶血性はいずれの菌株にも認められなかった。*R. aquatilis*は腸内細菌科に属しており、病原的意義は不明なものが多いとされる¹²⁾。一方、KHU株については、核酸分解酵素および溶血性いずれも陰性であり、インドール産生能、アセトインおよび硫化水素産生性などいくつかの項目で、*A. hydrophila*との相違が確認された(表2)。さらに、16SrDNAにおける約1,500塩基のシーケンシングにより、*Aeromonas*属細菌と99%の確率で一致した。

これらの結果から、KY5-1株は、病原因子を有する*S. marcescens*であり、現場での使用には適さないと判断した。KHU株は*Aeromonas*属の非病原性細菌と判断され、各種有機物分解能も高いことから、油脂分解菌の最良株として選定した。

2.2 *Aeromonas* sp. KHU株の保存性

微生物を用いたグリストラップ内の油脂分解システムでは、油脂分解菌の培養液注入装置を現場に設置して、毎日一定量を接種する方式が主に採用されている。そのため、培養液中の微生物の長期間の生存性の維持が品質管理の上で特に重要となる。杉森ら³⁾は、開発した油脂分解菌が保存中に急速に死滅したと報告している。そこで*Aeromonas* sp. KHU株を現場適用するための基礎試験として、培養と保存を兼用する液体培地の組成および生存性について検討した。

PYG培地、PY培地およびそれらを2倍、5倍希釈した液体培地を用いて*Aeromonas* sp. KHU株の培養および生存性を検討した結果(図1)、PYG培地およびその2倍ないし5倍希釈培地では、当初 10^8 CFU/mlの菌数が1日後に 10^{10} CFU/mlに増殖したが、いずれの濃度の培地においても7日間で 10^2 ないし 10^6 CFU/mlまで急激に低下し、その後も徐々に減少した。7日間以降では、いずれの培養液もpH5.0以下であり、酸性化が認められた。一方PY培地では、初発の 10^8 CFU/mlから1~2日で 10^{10} CFU/mlへ増殖し、その後7日間で約 10^8 CFU/mlにまで低下したが、いずれの濃度の培地においても、その後もこの菌濃度を維持し、5倍希釈PY培地が最も良好な結果を示した。このとき、PYG培地とは対照的にpH8.5程度のアルカリ性であった。これらの結果から、PYG培地では、培地に含まれるグルコースを本菌が資化し、有機酸を蓄積したことによりpHが著しく低下したため、菌数が激減したと考えられる。

表2 *Aeromonas* sp. KHUの性状および類縁菌との鑑別性状

性 状	<i>Aeromonas</i> sp. KHU	<i>A. hydrophila</i>
グラム染色性	—	—
細胞形態	短桿菌	短桿菌
カタラーゼ	+	+
オキシダーゼ	+	+
運動性	+	+
硝酸還元	+	+
インドール産生	—	+
ブドウ糖発酵性	+	+
ウレアーゼ	—	—
β -グルコシダーゼ	+	+
プロテアーゼ	+	+
β -ガラクトシダーゼ	+	+
グルコース利用性	+	+
L-アラビノース利用性	+	+
D-マンノース利用性	—	+
D-マンニット利用性	+	+
マルトース利用性	+	+
クエン酸利用性	+	+
アルギニンデヒドロラーゼ	—	+
アセトイン産生 (VPtest)	—	+
硫化水素産生	—	+
インドール産生	—	+
DNA 分解酵素	—	+
β -溶血毒素	—	+

本菌が増殖可能なpHの範囲はpH5.5~8.5であり(データ示さず)、両培地における生存性の差異には、培養液中のpHの変動が大きく影響したと推察される。以上の結果から、最も高い菌濃度を維持した5倍希釈PY培地を本菌の培養および保存に適した培地と判断した。

次に、実用レベルの保存性を検証するため、5倍希釈PY培地1.8ℓに本菌を接種し、30℃で35日間静置培養し、培養法および蛍光染色法を用いて菌数を測定した(図2)。平板培養法では、初発の菌濃度 10^8 CFU/mlから1日後に 10^7 CFU/mlのレベルに増加し、その後の約3週間は多少の増減はあるものの 10^7 CFU/ml前後の値を示し、その後、 10^6 CFU/mlに低下した。一方、CTC-SG I二重染色法による菌濃度は、平板法と似たパターンを示したが、そのレベルは 10^8 CFU/mlで、平板法の3.0~59倍高かった。自然界の細菌の多くは培養できない

図1 *Aeromonas* sp. KHUの保存性に及ぼす培地の影響

PYG 培地, PY 培地およびそれぞれを2倍および5倍希釈した液体培地に本菌の新鮮培養液を1/100量接種し, 30°Cで24時間振とう培養した後, そのまま30°Cで41日間静置培養した。

図2 *Aeromonas* sp. KHUの30°Cにおける増殖・保存性

5倍希釈PY培地1.8ℓに本菌を2ml接種し, 30°Cで2日間静置培養した後, 30°Cで35日間静置保存し, 平板法およびCTC-SYBR Green I二重蛍光染色法により菌数を測定した。

状態にあることはよく知られているが¹³⁾, 上記の結果は培養可能な細菌の新鮮培養菌においても, 培養法では正確な菌数が測定できていない場合があることを示すものと考えられる。また, 製品管理を行ううえでは, 菌数を迅速に定量することが重要であるが, 培養法では測定に約1~2日間を費やすが, CTC-SG I二重染色法では約5時間で済み, 製品管理にはより適していると考えられる。

以上の結果により, 5倍希釈PY液体培地中において30°Cで*Aeromonas* sp. KHU株を21日間にわたり高濃度で安定して保存する方法を確立した。現場への適用において, 培養液中の微生物の長期間の生存性の維持が品質管理の上で特に重要となると考えられるが, 微生物

物資材の保存および安定性に関する報告は極めて限られている。杉森ら³⁾は, 開発した油脂分解菌の保存中における生存性について検討し, 凍結乾燥菌体でも, 保存30日後の生存率は25°Cでは15%, 40°Cでは4%であり, 長期間の保存には, さらなる製剤化方法の検討が必要としている。本研究で示されたように, 培地の種類によっては, 培養には適していても, 保存には適さない場合もあり, 製品開発および管理において, 保存性を十分検討することが重要である。

2.3 *Aeromonas* sp. KHU 株の油脂分解試験

Aeromonas sp. KHU 株の油脂分解力をサラダ油培地を用いた振とう培養により検定した。その結果(図3), 油脂分(n-ヘキサン抽出物)は初発濃度約4,000 mg/ℓから48時間後には約2,500 mg/ℓに減少し, 38%が分解した。このときの油脂分解速度は32.2 mg/ℓ/hと算

図3 サラダ油培地における*Aeromonas* sp. KHUの油脂分解および増殖

普通ブイヨン100 mlに市販サラダ油を5 ml/ℓ添加し, 本菌新鮮培養液1 mlを接種し, 30°Cで48時間振とう培養した。

定された。一方、本菌の菌濃度は、初発の 5.0×10^6 CFU/ml から 12 時間後には 1.2×10^{10} CFU/ml に増加し、その後、48 時間後まではほぼ一定の高い菌濃度を維持した。本菌の比増殖速度は 12 時間までの増殖曲線から 0.63/hr (平均世代時間 1.1 時間) と算定される。これらの結果より、本菌は、植物油を好氣的に分解して増殖することが確認された。また、本菌が定常期に達した後も油脂分解が持続しているが、これは菌体外に分泌された油脂分解酵素の働きによるものであると考えられる。

厨房排水を用いた本菌による油脂分解試験の結果を図 4 に示す。この場合、現場グリストラップへの菌接種量と同程度の 1/1,000 量を接種した。低濃度の油脂含有厨房排水では (図 4A), 初発の油脂濃度約 330 mg/l から直線的に減少し、15 時間後には約 30 mg/l に減少した。このときの油脂分解速度は、20 mg/l/hr と算定された。一方、未接種 (曝気のみ) の場合、5 時間までは接種区と同様に油脂分は減少したが、その後、減少速度が低下した。本菌無接種区では 15 時間で油脂分解率は 39% であったのに対し、接種区では 91% で、分解率が 52% 高まった。一方、高濃度油脂含有厨房排水では (図 4B), 初発の油脂濃度 2,500 mg/l に対して、無接種区においては 24 時間で油脂分解率が 38%, 48 時間で 61% であった。一方、接種区では、24 時間で 46%, 48 時間で 86% の油脂分解がみられ、無接種と比べ分解率が 25% 高まった。このとき、油脂分解速度は約 46 mg/l/hr と算定された。

上記の結果は、厨房排水中の油脂は、曝気すること

で常在菌により多少分解すること、*Aeromonas* sp. KHU 株の接種により分解が促進されたこと、および排水中の油脂濃度の高低にかかわらず、本菌は高い分解能力を発揮することが判明した。

2.4 *Aeromonas* sp. KHU 株によるグリストラップ内油脂分解試験

Aeromonas sp. KHU 株を現場のグリストラップに適用し、その浄化効果を検証した (図 5)。まず、最初の 37 日間は曝気処理のみとし、14 日間おきに業者による清掃を行った。油脂分は測定開始時に 155 mg/l で、その後、徐々に増加し約 220 mg/l となり、清掃によりいったん減少したが、その後再び増加するというパターンを繰り返した。しかし、本菌の毎夜接種開始後は 7 日間で 40 mg/l 以下の値となり、その後も 35 日後まで同様の値を推移した。pH は、当初 pH4 台の酸性を示したが、本菌接種後から徐々に上昇し、35 日後には pH7 に達した。この pH の上昇は、排水中に当初有機酸が蓄積されていたものが、本菌接種により好氣的分解が促進され、有機酸が消費されたためと推察される。

以上のように、本実地試験により、グリストラップ内の油脂分解において、本菌接種の効果が実証された。グリストラップの現場適用試験に関しては、報告が少ない。現場での数日間¹⁾または 1 週間程度³⁾の試験成績に関しては報告があるが、菌接種前後の数ヶ月間にわたる現場試験は、著者らが知る限りでは本研究が初めてである。

試験したグリストラップの実容積は 300 l であり、ここに 250 mg/l の油脂分が蓄積していたと仮定すると、

図 4 *Aeromonas* sp. KHU による厨房排水中の油脂分解

—○— 曝気のみ, —●— 曝気+Aeromonas sp. KHU

厨房排水 1 l に本菌の新鮮培養液を 1 ml 接種し、30℃で通気培養した。

図5 *Aeromonas* sp. KHUの現場グリストラップにおける油脂分解効果

矢印は業者による清掃を示す。

最初の37日間は曝気処理のみとし、その後、本菌を毎晩21時に100 ml接種し、これを35日間続け、油脂分濃度およびpHを測定した。

本菌を夜間接種することにより、菌数は比増殖速度を0.63/hrとすると 10^6 CFU/mlから一晩(12時間)で 10^9 CFU/mlとなり、油脂分解速度を20 mg/l/hrとすると240 mg/lの分解となり、油脂分が規制値30 mg/l以下に低下し、グリストラップ全体では72 gの油脂分が分解されたと算定される。図5の結果はこの見積もりを裏付けるものである。一方、日中の場合、大量に厨房排水が出る。300 lのグリストラップに1日約8 m³の厨房排水が流入し、食堂稼働時間が12時間であるので、厨房排水のグリストラップ内滞留時間は約30分～数時間と見積もられた。本菌の平均世代時間は30℃で約1.1時間であるため、グリストラップの排水滞留時間が1時間未満となる場合、すなわち日中の繁忙時間帯には、本菌はwash-outされることになる。このため、現場では毎晩の菌接種が必要となる。また、グリストラップで油脂分を安定して微生物的に分解するためには、排水滞留時間を十分確保することが重要であり、グリストラップが現状より大きな容積をとることが望まれる。また、水量の多い時間帯には、曝気を停止してグリシ成分が下水に流出することを抑制するとともにトラップ内に蓄積させ、夜間に曝気処理することで分解を促進するという方法も実用化されている¹⁾。

井星ら¹⁾は、複合菌とリパーゼの併用により、150 mg/lのオリーブオイルが6時間で約90%分解し、厨房排水中の1,100および5,800 mg/lの油脂分が24時間で、それぞれ86%および91%分解したと報告している。これらの値から油脂分解速度は25～220 mg/l/hrと算定される。また、杉森ら³⁾は、油脂分解菌

(*Acinetobacter* sp.) が厨房排水中の114および260 mg/lの油脂分が24時間でそれぞれ96および90%分解し、3,000 mg/lのサラダオイルが24時間で83%分解したと報告している。これらは油脂分解速度として、それぞれ4.6、9.7および103 mg/l/hrと算定される。本菌の油脂分解能力はグリストラップ油脂分で20～46 mg/l/hr、サラダ油で32 mg/l/hrであった。すなわち本菌は、比較的低濃度の油脂分においては、上記の先行研究における油脂分解菌と同等かそれ以上の分解能力を有すると考えられるが、数千 mg/lを超える高濃度の油脂分においては、やや分解能力が低い傾向がある。一方、現場試験では優良な油脂分解を示しており(図5)、これは、油脂分の負荷が数百 mg/lと比較的低かったためと考えられる。

3. 結 論

本研究では、油脂分解能およびタンパク質分解能の強い細菌を厨房排水から新規に分離・選抜し、厨房排水の浄化に有効であるか実験室試験および現場グリストラップ試験により検証した。本研究で得られた知見は以下の通りである。

- 1) 11点の厨房排水から新規に油脂分解菌の分離を行い、311株の分離細菌株から油脂分解能、タンパク質分解能およびデンプン分解能の高い分離株 *Aeromonas* sp. KHUを選抜し、環境中で使用することを考慮し、非病原性であることを確認した。
- 2) 培養および保存性に適した培地として5倍希釈PY培地を選定し、同時に、CTC-SG I二重染色法を菌数測定に用いることで、製品管理に有効な迅速定量法を確立した。細菌を用いたグリストラップ中の厨房排水処理において、培養および保存性に適した培地の選択・検証が最も重要なステップであるといえる。
- 3) 油脂分解性を実験室および現場で測定した結果、厨房排水中の油脂分濃度の高低にかかわらず高い分解率を示した。しかし、本菌の増殖速度よりも滞留時間が短い時間帯もあるため、現場では毎晩の菌接種が必要であり、グリストラップで油脂分を安定して微生物的に分解するためには、排水滞留時間を十分確保することが重要である。

今後、検討すべき課題もあるが、本菌を用いた自動接種システムの使用により、グリストラップの清掃作業が大幅に軽減されることが期待される。

Corresponding author: 染谷 孝
E-mail: someyat@cc.saga-u.ac.jp

文 献

- 1) 井星郁夫, 中西康雄; 廃棄物処理・再資源化技術, 122-127 シーエムシー出版, 1999.
- 2) 加藤明徳, 岡庭良安, 奥田慎一; リパーゼ生産細菌を用いた油脂含有排水処理, 用水と廃水, **37**, 303-307, 1995.
- 3) 杉森大助, 中村正寿ら; 油脂分解微生物製剤による油脂含有排水処理, 生物工学会誌, **80**, 559-562, 2002.
- 4) Yoshiki Matsumiya, Daisuke Wakita et al.; Isolation and characterization of lipid-degrading bacteria and its application to lipid-containing wastewater treatment, J. Biosci. Bioeng., **103**, 325-330, 2007.
- 5) Shin-ichi Okuda, Kazutoshi Ito, Hiroko Ozawa and Kazuo Izaki; Treatment of lipid-containing wastewater using bacteria which assimilate lipid, J. Ferment. Bioeng., **71**, 424-429, 1991.
- 6) 染谷孝; 堆肥化促進微生物資材の動向と評価 ～蛍光染色法などによる評価, 肥料土づくり資材大辞典, 1031-1041, 農文教, 2007.
- 7) Sierra, G.; Simple method for the detection of lipolytic activity of microorganisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. Antonie van Leeuwenhoek, **23**, 15-22, 1956.
- 8) Martley, F.G., Jayashankar, S.R. and Lawrence, R.C.; An improved agar medium for the detection of proteolytic organisms in total bacterial counts. J. Appl. Bact., **33**, 363-370, 1970.
- 9) コーワン, S.T.; 医学細菌同定の手引き, 坂崎利一訳, 335, 近代出版, 1979.
- 10) Grace C.Y. Wang and Yue Wang; Frequency of Formation of Chimeric Molecules as a Consequence of PCR Coamplification of 16S rRNA Genes from Mixed Bacterial Genomes, Appl. Environ. Microbiol., **63**, 4645-4650, 1997.
- 11) Naoko Yoshida and Akira Hiraishi; An improved redox dye-staining method using 5-cyano-2,3-ditolyl tetrazolium chloride for detection of metabolically active bacteria in activated sludge, Microbes Environ., **19**, 61-70, 2004.
- 12) Izard, Gavini, Trinel and Leclerc; Validation of the publication of new names and new combinations previously effectively published outside the IJSB; List No. 7 In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Springer, Vol. II, Part B, Springer-Verlag, NY. 759-763, 2005.
- 13) 染谷 孝, 犬伏和之, 山本啓之, 加藤憲二; 土壌・水圏における Viable but nonculturable (VBNC) 微生物の解析手法の進歩と課題, 土と微生物, **53**, 45-51, 1999.

Application of a Lipolytic Bacterium to Wastewater Treatment of Cooking Grease Traps

Noriko RYUDA*, Kanari YOKOBORI*, Aya INOUE*, Kenji ANNOURA*, Isao TESHIMA**
Daisuke UENO*, Koichi INOUE*, Takashi SOMEYA*

* Division of Soil Environment, Faculty of Agriculture, Saga University

** Kyushu Chemical Clean Co. Ltd.

ABSTRACT

Lipolytic bacteria were isolated from restaurant grease traps, and the isolate KHU, which has strong lipolytic activity, was selected for kitchen wastewater treatment. The isolate KHU, which was identified as *Aeromonas* sp., also has proteolytic and amilolytic ability and no pathogenic characteristics. It consumed grease and oil in restaurant wastewater at a rate of 20-46 mg/ℓ/hr. An apparatus (the Oil Control System) which aerates a grease trap continuously and inoculates the culture of the bacterium once a day automatically into a grease trap was developed and tested. The system reduced grease and oil concentration in drainage water by 95% or greater and kept total grease quantity at 40 mg/ℓ or less during five weeks of the experiment.

Key Words : lipolytic bacteria, *Aeromonas*, grease trap, kitchen wastewater treatment