

## 抗生物質に耐性を示す活性汚泥細菌の検索

山形大学大学院農学研究科 学生会員 ○三浦逸実  
 山形大学農学部 正会員 渡部徹, 浦劍  
 東北大学 NICHe 正会員 風間しのぶ  
 東北大学 NICHe 非会員 今田義光

### 1 はじめに

世界中に広く普及される活性汚泥システムは、生分解性有機物の多い下廃水の処理に適しており、都市下水に限らず、畜産排水や工業排水の処理にも利用されている。活性汚泥システムにおける反応槽では、活性汚泥中の多種多様な微生物が曝気で供給される酸素と下廃水に由来する有機物を利用して盛んに増殖し、下廃水に含まれる有機物の同化や酸化分解を行っている。薬剤耐性菌は、突然変異と水平伝播の2つのメカニズムで発生・伝播する(三橋ら, 1985)。多種多様な微生物が共存し、盛んに増殖を繰り返している活性汚泥システムでは、突然変異も水平伝播も起こりやすい環境といえる。水環境における薬剤耐性菌の問題に取り組む上で、このシステムを採用した都市下水処理場や畜産排水処理施設には注意を払う必要がある。本研究では、抗生物質の添加に対する活性汚泥細菌の種構成変化から、どの種類の細菌が活性汚泥システムにおける薬剤耐性菌の発生・伝播に重要な役割を果たしているのか明らかにすることを目的とする。

### 2 実験方法

鶴岡市内の下水処理場において反応槽から汚泥混合液を採取し、テトラサイクリンまたはカナマイシンを添加したLB培地中で、24時間37°Cで振とう培養する。この培養液の組成は汚泥混合液を1ml、LB培地と抗生物質を合わせて9ml加え、抗生物質の終濃度をそれぞれ0.5mg/ml、1mg/mlとした。この濃度は、様々な細菌で知られているMICの最高値の約5~10倍に相当し、非耐性菌を速やかに死滅させ、培養中に新しい耐性菌が発生しにくい濃度として決めた。培養後の汚泥混合液からFastDNA SPIN Kit for Soil (MP Biomedicals)を用いてDNAを抽出する。抽出したDNAに対してPCRを行い、16SrRNAをコードする領域を増幅する。PCRに用いたプライマーセットおよび温度条件等は、先行研究(Huang *et al.*, 2014)を参考にする。増幅された遺伝子断片を精製し、次世代シーケンス(GS Junior Titanium emPCR Kitを使用)によってその配列を解読する。解読した配列を、Qiimeソフトウェアを用いてOTU (Operational Taxonomic Units: 操作的分類単位)としてまとめ、BLAST(Basic Local Alignment Search Tool)を用いた解析により、培養前後の汚泥混合液に生息していた細菌種を明らかにする。

### 3 結果および考察

培養前および培養後の汚泥細菌のOTU構成を科レベルで整理し、構成割合が多い5つの科名を表1に示す。いずれのサンプルについても、無作為に選んだ4000リードの解析結

表1 培養前および培養後の汚泥細菌の構成 (数が多い5科とその構成比%)

生汚泥		LB	
Comamonadaceae	21.5	Aeromonadaceae	41.2
Rhodocyclaceae	8.5	Enterobacteriaceae	25.3
Sphingobacteriales 目	4.8	Moraxellaceae	15.9
Xanthomonadaceae	3.4	Fusobacteriaceae	10.2
TM7-1 門	3.3	Porphyromonadaceae	1.1
TC1000		KM1000	
Comamonadaceae	30.2	Enterobacteriaceae	36.5
Rhodocyclaceae	5.1	Enterococcaceae	35.1
HOC36 目	3.5	Porphyromonadaceae	18.4
Sphingobacteriales 目	3.1	Sphingobacteriaceae	2.2
Sphingomonadaceae	3.0	Streptococcaceae	1.2

キーワード: 薬剤耐性菌, 活性汚泥細菌, 下水処理場, 次世代シーケンス

住所: 山形県鶴岡市若葉町1-23, Tel: 0235-28-2907, Email: to-ru@tds1.yamagata-u.ac.jp

果を掲載した。抗生物質を添加しないで培養した場合（サンプル名：LB），LB培地の栄養組成に適応したγプロテオバクテリア綱の細菌が活発に増殖し，培養前（サンプル名：生汚泥）の汚泥細菌の構成と大きく変化した。テトラサイクリンを添加して培養した条件（サンプル名：TC500，TC1000）では，培養前に多く存在していた Comamonadaceae 科が培養後も高い割合のまま存在していた。この科の細菌はテトラサイクリンに耐性がある可能性がある。

一方，カナマイシンを添加して培養した条件（サンプル名：KM500，KM1000）では，Enterobacteriaceae 科，Enterococcaceae 科の割合が高く，抗生物質を添加せずに培養した場合とよく似た細菌の構成となった。これらの科に属する細菌が，カナマイシンに対して耐性を有していることがうかがえる。

表 2 に，テトラサイクリンに対し耐性を持っていた Comamonadaceae 科，カナマイシンに耐性があつた

Enterobacteriaceae 科に存在していた属の細菌の検出数を示す。

Comamonadaceae 科は表に示していない種も多く，多様性があつたが，その中で Hydrogenophaga 属や属不明 A などの優占度の高い属の細菌は，テトラサイクリンを添加し培養しても OTU 数は減少せず，テトラサイクリンに耐性を持っていることが分かった。

表 2 Comamonadaceae 科，Enterobacteriaceae 科のうち存在数が多い細菌の属レベル以下の分類結果（表中の数値は，4000 個の OTU のうち，各種に分類された OTU 数を示す）

	生汚泥	LB	TC500	TC1000	KM500	KM1000
Comamonadaceae 科に属する細菌						
Acidovorax 属 delafieldii	0	1	30	78	0	2
Comamonas 属 種不明	1	13	0	0	0	0
Hydrogenophaga 属 種不明	389	0	356	790	2	11
Limnohabitans 属 種不明	95	0	70	75	0	5
属不明 A	361	1	153	266	4	10
Enterobacteriaceae 科に属する細菌						
Proteus 属 種不明	0	206	0	0	58	0
Providencia 属のすべての種	0	251	0	0	0	0
属不明 B	7	553	12	6	504	1437

Enterobacteriaceae 科では，属不明 B の細菌はカナマイシンに耐性を持っていたが，Providencia 属の細菌などは，カナマイシンを添加により死滅した。

#### 4 まとめ

活性汚泥細菌を抗生物質存在下で培養し，培養前後での細菌叢を解析した。抗生物質の種類によって生き残る細菌が異なり，テトラサイクリンには Comamonadaceae 科など活性汚泥にもともと多く存在する細菌が耐性をもっていた。カナマイシンには Enterobacteriaceae 科，Enterococcaceae 科などが耐性を持っていた。Enterococcaceae 科はグラム陽性菌であり，そもそもカナマイシンは機能的に効果を示さない（矢野，2010）。属レベル以下の解析からは，Enterobacteriaceae 科の属不明 B の細菌が耐性を持つことが分かった。以上より，抗生物質添加後も生存していた細菌はテトラサイクリン，カナマイシンに対する耐性遺伝子を有しており，他の細菌にその遺伝子を受け渡す可能性があるため，さらに詳細な解析が必要である。

謝辞:本研究は，JSPS 科研費 15H05223 の支援を受けた。

#### 参考文献

- Huang *et al.* (2014) International Journal of Molecular Sciences, 15, 10083-10100.  
 三橋ら編 (1985) 薬剤耐性菌による環境汚染，学会出版センター  
 矢野晴美著 (2010) ISBN978-4-7581-0686-3 羊土社