

下水処理 DHS システムを対象とした微生物群集が有する抗生物質耐性率の変化

木更津工業高等専門学校 学生会員 ○葛西 樹生 新潟薬科大学 正会員 井口 晃徳
 近畿工業高等専門学校 正会員 安井 宣仁
 木更津工業高等専門学校 正会員 上村 繁樹, 大久保 努

1 目的

新型コロナウイルスによるパンデミック以降, 初めて開催された G7 では新型コロナに加えて隠れたパンデミックへの備えとして薬剤耐性菌が挙げられた. 薬剤耐性菌 (以下 耐性菌) とは細菌の生育を阻害する効果を持つ抗生物質に対して耐性をもつ細菌のことであり, 水中などの自然界において水平伝播による薬剤耐性を獲得し, 下水又は汚染された河川などで人に感染する. 2013 年では耐性菌によって 70 万人が死亡しているが, 2050 年には 1000 万人にまで増加し現在の癌以上の脅威になると予想されているため下水処理過程における適切な処理が必要とされる¹⁾. 特に, 下水処理施設が不十分な発展途上国においてこれら水系感染症に関する課題を解決するため早急な対応が求められる.

一方, 発展途上国での実装が進められている下降流懸垂スポンジ (DHS) 法での先行研究では, 処理過程において微生物が有する耐性遺伝子の相互伝播がされることで, 最初沈澱池越流水と比べて処理水の方が多剤耐性菌の割合が高くなること, 処理過程で *Escherichia* 属が 36 株から 17 株と減る一方で *Shigella* 属は 49 株から 57 株, *Aeromonas* 属は 4 株から 9 株と増えたことが明らかになった²⁾.

そこで本研究では, 国内で稼働中の下水処理 DHS システムを対象とし, 処理前後における *Escherichia* 属, *Shigella* 属, *Aeromonas* 属が有する抗生物質耐性割合の変化を解析し, その特徴をを明らかにすることを目的とした.

2 実験方法

2.1 実験試料

実験に供した試料は, 国内で稼働中の下水処理 DHS リアクター (HRT3.2 時間) より採取した. DHS のスポンジ担体は 5 段に分かれて充填されており, 最初沈澱池越流水 (DHS 流入水) 及び 5 段目処理水 (DHS 処理水) の 2 種類を対象とした.

2.2 薬剤感受性試験手順

以下の手順に従って, 薬剤耐性菌を測定した. 1.採取した試料を 0.1%ペプトン水にて希釈し, クロモカルトコリフォーム寒天培地 (メルク株式会社) にて 35°C, 24 時間培養する. 2.生成したコロニー数をカウントした後, 白金耳にてコロニーを 1 個ずつ釣菌しトリプトソイブイオン液体培地 (日本製薬株式会社) に接種し 35°C, 4 時間培養する. 各試料にて形成された 96 株を釣菌した. 3.培養した培養液 80 μ L をミューランヒントン S 寒天培地 (栄研化学株式会社) に塗布し, 抗生物質を含有した KB ディスク (栄研化学株式会社) をミューランヒントン S 寒天培地上に貼付け, 35°C, 18 時間培養する. 本実験では, 6 種類の抗生物質 (セフジニル (CFDN), レボフロキサシン (LVFX), アンピシリン (ABPC), スルファメトキサゾールトリメトプリム (ST), テトラサイクリン (TC), カナマイシン (KM)) に対し耐性の有無を評価する. 4.発現した阻止円の直径 (mm) を判定基準³⁾ に従って判定し, 耐性の有無を判定する.

2.3 サンガーシーケンスによる微生物種の同定

薬剤感受性試験手順 3. のシングルコロニー由来の各培養液を 96 ウェルプレートに分注し, ダイレクト PCR 法により真正細菌の 16S rRNA 遺伝子を増幅させた. 増幅 DNA 断片をサンガー法により解読し, 500-600 bp を BLAST 解析により微生物種の同定 (属レベル) を行った.

キーワード 薬剤耐性菌, DHS 法, *Escherichia* 属, *Shigella* 属, *Aeromonas* 属

連絡先〒292-0041 千葉県木更津市清見台東 2-11-1 木更津高専 TEL:0438-30-4165 E-mail:okubo@c.kisarazu.ac.jp

3 実験結果及び考察

大腸菌濃度は DHS 流入水で 7.2×10^4 CFU/mL, DHS 処理水で 8.3×10^0 CFU/mL となり, DHS の処理を経ることで 4.0 log の減少が確認された. 図 1 に DHS 処理前後における各微生物の抗生物質耐性率の変化を示す. N 株検出された菌の内, X 株の抗生物質の耐性を持つ菌がどの程度存在するのかを百分率で表したものを耐性率と定義し, 耐性率 (%) = $(X/N) \times 100$ で算出した.

腸内細菌科 (*Enterobacteriaceae* 科) である *Escherichia* 属及び *Shigella* 属は処理を経ることで, CFN と KM 耐性の耐性率が上昇する傾向を示した (図 1(a), (b)). 一方で他の抗生物質に対する耐性率は反対の傾向を示しており, 同じ腸内細菌科に属する微生物においても耐性遺伝子の獲得・喪失機構は異なると考えられる. 腸内細菌科の微生物は KM に対して高い耐性率を示した報告⁴⁾もあり, 下水処理の運転条件 (HRT, SRT, MLSS 等) も影響因子として考えられるが, 特定の抗生物質に対してより強い影響を受ける可能性がある.

Aeromonas 属は, DHS 処理水において CFN, ST 耐性が大幅に上昇することが確認された (図 1(c)). DHS 流入水では *Escherichia* 属及び *Shigella* 属の 4 剤耐性菌が検出されたが, 処理水では唯一 *Aeromonas* 属の 4 剤耐性菌が検出²⁾されたことから, DHS リアクター内においてより *Aeromonas* 属が影響を受ける環境が形成されている可能性がある. ABP は流入水, 処理水どちらでも耐性率が 100%であったことから ABP は *Aeromonas* 属に対して効果をささない. つまり, *Aeromonas* 属は抗生物質による選択圧によって微生物の活動が抑制される環境下にあっても, 他の微生物と比べて ABP に対し特異的な特徴を有すると考えられる.

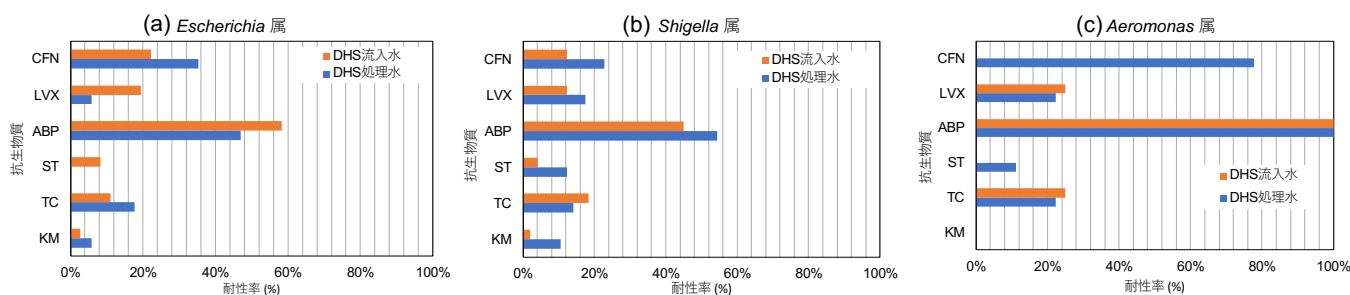


図 1 処理過程における(a) *Escherichia* 属, (b) *Shigella* 属及び(c) *Aeromonas* 属の抗生物質耐性率の変化

4 まとめ

DHS処理過程における, 薬剤感受性試験による耐性菌割合の変化やサンガーシーケンスを用いた多剤耐性菌になり得る微生物の属レベルでの特定を目的の下, 得られた結果を以下にまとめる.

- 腸内細菌科 (*Enterobacteriaceae*科) である *Escherichia*属及び *Shigella*属は, CFNと KMに対して耐性遺伝子獲得に優れていることが考えられる.
- *Aeromonas*属は, 流入水, 処理水どちらにおいても ABP耐性率 100%を示したことから, 他の微生物に比べて ABPに対し特異的な特徴を有すると考えられる.

今後は他の下水処理方法の処理水も対象に加え, *Escherichia*属, *Shigella*属及び *Aeromonas*属の消長に関して解析を進めるとともに, 各微生物の特性や下水処理場の運転因子との相互関係を明らかにする. また, 水環境中への耐性菌の放出を抑えるため, 耐性菌に効果的な処理水消毒手法を開発する予定である.

参考文献

- 1) United Nations, Global health agencies sound alarm on drug-resistant infections, <https://news.un.org/en/story/2019/04/1037471>, 閲覧日 2022/1/7.,
- 2) 葛西ら, 下水処理 DHS システムにおける薬剤耐性菌割合と微生物群集の変遷, 土木学会第 49 回関東支部技術研究発表会, 2022.
- 3) 栄研化学株式会社, KB ディスク栄研, https://www.info.pmda.go.jp/downloadfiles/ivd/PDF/170005_09A2X10001000010_A_01_07.pdf, 閲覧日 2022/1/7.
- 4) 三浦ら, 抗生物質に耐性を示す活性汚泥細菌の検索, 土木学会第 71 回年次学術講演会, 平成 28 年 9 月.