

異なる下水処理方式における多剤耐性大腸菌の存在割合の比較

木更津工業高等専門学校 学生会員 ○笹生慶希, 松岡郁美 正会員 上村繁樹, 大久保努
 近畿大学工業高等専門学校 正会員 安井宣仁, 香川高等専門学校 正会員 多川正

1. はじめに

近年, 抗生物質耐性菌の感染による健康被害が問題となっている. 耐性菌とは, 抗生物質の多量な使用や遺伝子変異により抗生物質に耐性を持つ細菌のことである. 耐性菌を保有するヒトや家畜の排泄物として環境中に排出され, 下水や公共用水域で検出されている. 現在も国内外での被害が報告されており, このまま耐性菌の出現・蔓延が続くと 2050 年には年間死者が 1,000 万人にも及ぶとされている¹⁾. 耐性菌の動態を明らかにし, 拡散を抑制するための方策が喫緊に求められている.

健康者の糞便試料の 80.5% に耐性菌が存在しており, そのうち 98% が抗生物質耐性大腸菌 (以下, 耐性大腸菌) と報告されている²⁾. 日本の下水道利用人口は約 9,500 万人 (普及率 78.8%³⁾) であるため, 高濃度の耐性大腸菌が日常的に下水処理場に流入している. 下水処理方式は 97% が活性汚泥法により処理され⁴⁾, その分類は標準活性汚泥法をはじめ, オキシデーションディッチ法や嫌気好気法, 循環式嫌気好気法などがある. 一方, 途上国では経済性や専門知識を有する人材不足の面から, 散水ろ床方式の下水処理が普及しつつある. その中でも下向流懸垂スポンジ (Down-flow Hanging Sponge : DHS) 法は曝気が不要な低コスト型で維持管理が容易な技術として我々は実用化に向け実証研究を続けてきた⁵⁾.

そこで本研究では, 異なる下水処理方式における大腸菌の消長を明らかにするため, 図 1 に示した, 同一の下水を処理する標準活性汚泥法と DHS 法を対象に, 下水処理過程における液試料に加え, 生物処理の中核を担う活性汚泥と DHS 保持汚泥中の多剤耐性大腸菌の存在割合を明らかにし, 運転条件や汚泥濃度等との関係性を評価することを目的とした.

2. 実験方法

2.1 対象試料

T 市終末処理場の液試料 (流入下水, 初沈下水, AS 処理水, DHS 処理水) と汚泥試料 (活性汚泥, DHS 汚泥) の計 6 種類を実験に供した. T 市終末処理場の標準活性汚泥は 1.2 時間の沈殿時間の最初沈殿池を設け, 反応槽+終沈の HRT は 16.4 時間となっている. DHS リアクターは, 直径 0.8m, 高さ 5.25m の円柱型でスポンジ担体層を 5 段積み重ねている. スポンジ担体層には汚泥保持担体として G3 担体 (直径 33mm×高さ 33mm) が充填されている. スポンジ総体積は 667L, スポンジ体積基準 HRT は 3 時間とした. DHS 汚泥はスポンジ担体層 3 段目より担体を採取し汚泥を搾取し耐性菌を測定した.

抗生物質は, カナマイシン (KM), セフジニル

(CFDN), アンピシリン (ABPC) の 3 種類とした. これら 3 種類の抗生物質は国内における出荷量・額及び尿排出率から推定した対外排出量よりヒト用抗生物質の上位にあり⁶⁾, 腸内細菌の大腸菌が属するグラム陰性菌に抗菌作用を有することから選定した.

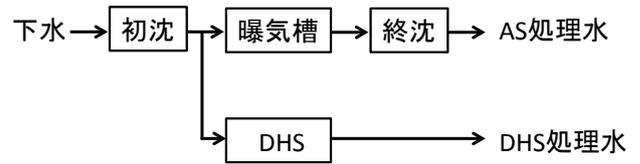


図 1. 対象とした下水処理フロー

2.2 耐性大腸菌の測定方法

各試料 (汚泥試料はホモジナイザーで粉碎処理) を 0.1% ペプトン水で希釈し, クロモカルトコリフォーム寒天培地 (Merck Millipore) で 35°C で 24 時間培養し, 形成された大腸菌コロニーを白金耳にて釣菌した. その後トリプトソイブイオン培地 (日水製薬 (株)) に接種し, 35°C で 3 時間培養 (30 分毎に攪拌) し菌液をミューランヒントン S 寒天培地 (栄研化学 (株)) にコンラージ棒を用いて 80 μL 塗布した後, 抗生物質成分を含有した 3 種類の KB ディスク (栄研化学 (株)) を平板上に貼りつけ 35°C で 18 時間培養した. 抗生物質に耐性がない大腸菌のディスク周囲には大腸菌が増殖しない阻止円を形成するため, 表 1 に準じて阻止円の直径より耐性の有無を判定した.

また, 釣菌コロニーが大腸菌かを判別するため TSI 寒天培地 (栄研化学 (株)) を用いて判定試験を実施した. トリプトソイブイオン培地にて培養した菌液を TSI 寒天培地の斜面部と高層部に画線し 35°C で 18 時間培養した. TSI 寒天培地は乳糖, 白糖, ブドウ糖を含んでおり, ①斜面部が乳糖・白糖あるいはその両方を分解に伴い赤色から黄色に変化, ②高層部がブドウ糖の分解に伴い赤色から黄色に変化, ③高層部がブドウ糖分解によりガスを産生し亀裂を生じる. この 3 つの反応がみられたものを大腸菌と判定し実験結果の議論に取り扱った.

表 1. 耐性の有無の判定 (栄研化学第 9 番)

抗生物質	阻止円の直径(mm)		
	耐性	中耐性	感性
KM	≤13	14-17	18≤
CFDN	≤16	17-19	20≤
ABPC	≤13	14-16	17≤

※ 中耐性までを耐性の判定域とした.

キーワード 下水処理 抗生物質耐性大腸菌 標準活性汚泥法 下向流懸垂スポンジ (DHS) 法

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

図2にT市終末処理場の標準活性汚泥法とDHS法における液試料（流入下水，初沈下水，AS処理水，DHS処理水），図3に両系の保持汚泥（活性汚泥，DHS汚泥）におけるそれぞれの抗生物質に対する耐性大腸菌の存在割合を示す．全釣菌大腸菌に占める耐性大腸菌は流入下水 11/12，初沈下水 12/12，AS処理水 14/14，DHS処理水 15/15，活性汚泥 21/23，DHS汚泥 24/24 となり 97%を耐性大腸菌が占めた．図中の左から3つまでのグループは抗生物質1剤（左から KM，CFDN，ABPC）に対する耐性大腸菌の割合を示し，2剤耐性菌（KM+CFDN，KM+ABPC，CFDN+ABPC）では1つの平板上で組合せの2種の耐性菌に同時に耐性を持つ大腸菌の割合を示した．右端に示した3剤耐性菌は2剤耐性菌で示した割合を含めず，同時に3剤（KM+CFDN+ABPC）に耐性を持つ大腸菌の割合を示した．

図2の1剤に耐性を持つ大腸菌について，KMに対する両系の最終処理水で比較すると，AS処理水で50%，DHS処理水で14%となり，AS処理水の方が3.5倍程度高い耐性割合を示した．また，CFDNにおいても同様の傾向を示し，AS処理水では86%であるのに対し，DHS処理水では40%となり，AS処理水にはDHS処理水よりも高い割合で耐性菌が存在していた．ABPCは全試料で90%を超える高い耐性の割合を示したことから，ABPC耐性大腸菌が広く我々体内に存在し，下水処理過程においても残存性が高いことが確認された．

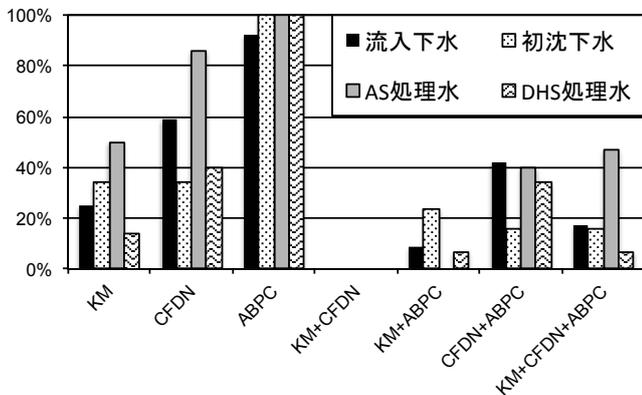


図2. 液試料中の耐性大腸菌存在割合

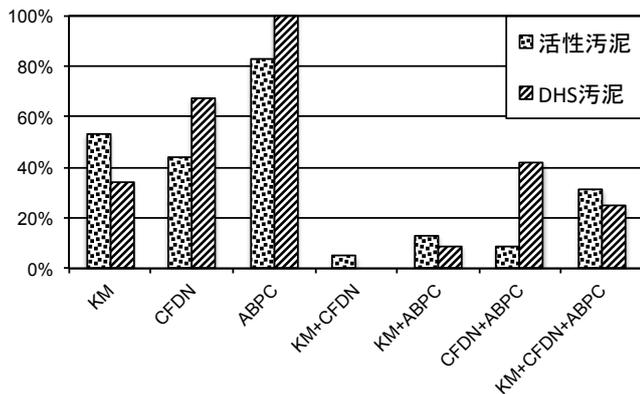


図3. 汚泥試料中の耐性大腸菌存在割合

2剤耐性の KM+CFDN は全ての試料から検出されなかった．CFDN+ABPC においては，AS 処理水で40%，DHS 処理水では34%となり，1剤耐性と比べて大きな差は確認されなかった．3剤耐性については，AS 処理水では47%だったのに対し，DHS 処理水では7%となり，AS 処理水が DHS 処理水の6.7倍程度高い耐性大腸菌の存在割合を示した．

一方，対象汚泥の濃度は活性汚泥が1.8 g-MLSS/L，DHS 汚泥が48.6 g-MLSS/L-sponge と濃度差が大きい特徴を持つ中，一部で液試料とは対称的な傾向を示した（図3）．1剤耐性について，CFDN に対する耐性大腸菌において活性汚泥では耐性の割合が44%，DHS 汚泥では67%と1.5倍程度 DHS 汚泥で高い耐性の割合を示し，2剤耐性の CFDN+ABPC では，活性汚泥で9%，DHS 汚泥で42%と DHS 汚泥が活性汚泥の4.5倍以上高い耐性大腸菌の割合を示した．

4. まとめ

T 市終末処理場の試料を対象に KM，CFDN，ABPC の3種類の抗生物質に対する耐性大腸菌を評価した．その結果，KM と CFDN に対する1剤耐性大腸菌の割合は，活性汚泥法では処理水中での耐性大腸菌の割合が汚泥中に比べ高いのに対し，DHS 法では汚泥中で高い割合を示した．ABPC の1剤は6種類全ての試料で高い存在割合を示した．更に，多剤耐性大腸菌の合計（2剤耐性と3剤耐性の割合の和）は，活性汚泥法では汚泥中で58%，処理水中で87%となり汚泥に比べて処理水の方が高い割合を示した．一方 DHS 法では，汚泥中で76%，処理水中で48%と汚泥の方が高い割合を示した．以上より，異なる下水処理方式における抗生物質別の耐性大腸菌の消長が示され，汚泥濃度が高い方により吸着・保持される可能性が示唆された．今後は，汚泥中での耐性遺伝子の伝搬や消長メカニズムを評価する予定である．

参考文献

- 1) AMR 臨床リファレンスセンター，かしこく治して，明日につながる～抗菌薬を上手に使う～ AMR 対策～，2017.
- 2) Korzeniewska, E., Emission of bacteria and fungi in the air from wastewater treatment plants-a review, Front Bioscience (Schol Ed), 3(2), 393-407, 2011.
- 3) 公益社団法人 日本下水道協会 都道府県別下水処理人口，<http://www.jswa.jp/sewage/qa/rate/>，閲覧日 2018 年 11 月 27 日
- 4) 国土交通省 国土技術政策総合研究所，第2章 技術の概要評価，<http://www.nilim.go.jp/lab/bcg/siryou/tnn/tnn0951p/df/ks095106.pdf>，閲覧日 2018 年 10 月 24 日
- 5) 野本ら，開発途上国における実機スケール DHS リアクターのスタートアップ，水環境学会誌，40(1)，11-19，2017.
- 6) 八十島ら，下水処理水中に含まれるレボフロキサシン，クラリスロマイシンの分析と藻類生長への影響，水環境学会誌，27(11)，707-714，2004.