

下水処理過程における耐性菌の動態と抗生物質が処理性能に与える影響

木更津工業高等専門学校 学生会員 ○水無咲妃, 大平夏生 正会員 上村繁樹, 大久保努

1. はじめに

抗生物質は、細菌感染症の予防と治療のために使用され、日本における年間使用量はヒト用として 517 トン、家畜医療用及び飼料添加物として 902 トンである¹⁾。通常、抗生物質は服用後、生体内で代謝し尿中に排出される。その後、下水処理場及び浄化槽で処理され、水環境中に放出される。しかし、未変化体として完全に処理されず、下水処理場における抗生物質の報告では、流入下水中に 17 $\mu\text{g/mL}$ 、処理下水中に 2 $\mu\text{g/mL}$ が検出されている²⁾。抗生物質の使用の増加に伴い、抗生物質に対して耐性を獲得した抗生物質耐性菌（以下、耐性菌）が増加している。健康なヒトの糞便や動物にも耐性菌の保有が広がり、下水処理場では耐性遺伝子の伝播や獲得する可能性が高い。耐性菌の広がりが懸念されている中、河川水を対象とした調査例が多いのに対し、下水処理場流入水や処理水を対象とした報告は少ない。下水処理過程における耐性菌の分布に関し未解明な領域が多く、基礎的情報が乏しい状況にある。

本研究では、下水処理過程における複数の抗生物質に耐性を持つ多剤耐性菌の割合変化の評価を目的とした。Activated Sludge Process (ASP, 活性汚泥法) と Down-flow Hanging Sponge (DHS, 下向流懸垂型スポンジ) 法の処理プロセスにおける流入下水、最初沈殿池下水、処理水中に含有する耐性菌動態を評価した。更に下水処理施設に流入した抗生物質は、生物処理を妨害する一因として考えられるため、硝化プロセスに及ぼす影響を調査した。

2. 実験方法

2. 1 対象試料, 供試薬剤

一般細菌及び耐性菌の検出では、T 市終末処理場における流入下水、最初沈殿池下水、最終処理水（以下、AS 処理水）、そして T 市終末処理場の最初沈殿池下水を処理している DHS リアクターの処理水（以下、DHS 処理水）の 4 種類の液サンプルを対象とした。硝化活性試験では、木更津高専浄化槽の活性汚泥を採取、洗浄処理したものを実験に供した。3 種類の抗生物質を使用し、1 つ目がアンピシリン (ABPC) でグラム陽性菌、陰性菌に対して抗菌作用を有する。2 つ目はカナマイシン (KM) でヒトの大腸菌や赤痢菌による感染症の治療等に用いられている。3 つ目はセフジニル (CFDN) で抗菌スペクトルを有し、少量投与で抗菌作用を発揮する。日本での尿排泄率や下水処理場への排出量から選定した³⁾。

2. 2 一般細菌, 多剤抗生物質耐性菌の検出

一般細菌数の測定にはメンブレンフィルター法を用いた。試料水を 0.1 % ペプトン水で適切な倍率に希釈しておき、45 μm 孔径のメンブレンフィルター

で濾過し、細菌を捕集する。m-TGE 培地を含ませた吸収パッド上にこのフィルターを乗せ、 $36 \pm 1^\circ\text{C}$ で 24 ± 2 時間培養させ、培養後形成されたコロニー数を計測した。得られた一般細菌数を全細菌数とした。耐性菌数の測定もメンブレンフィルター法を用いた。抗生物質を含有させた m-TGE 培地を用い、培養後形成されたコロニー数を計測した。培地の抗生物質濃度は MIC_{80} に準じて設定した (KM : 50 $\mu\text{g/mL}$, CFDN : 50 $\mu\text{g/mL}$, ABPC : 60 $\mu\text{g/mL}$)。 MIC_{80} とは全体の 80 % の菌株の発育を阻止する濃度である⁴⁾。KM : 50 $\mu\text{g/mL}$, ABPC : 60 $\mu\text{g/mL}$ 存在下で形成されたコロニー数を KM+ABPC 耐性菌数とし、CFDN : 50 $\mu\text{g/mL}$, ABPC : 60 $\mu\text{g/mL}$ 存在下で形成されたコロニー数を CFDN+ABPC 耐性菌数とし、KM : 50 $\mu\text{g/mL}$, CFDN : 50 $\mu\text{g/mL}$ 存在下で形成されたコロニー数を KM+CFDN 耐性菌数とし、KM : 50 $\mu\text{g/mL}$, CFDN : 50 $\mu\text{g/mL}$, ABPC : 60 $\mu\text{g/mL}$ 存在下で形成されたコロニー数を KM+CFDN+ABPC 耐性菌数とした。また、抗生物質無添加の培地上に発育した菌数 N_0 (全細菌数) と、添加培地上に発育した菌数 N_A (耐性菌数) の比率を耐性菌出現率 X (%) とし、式 (1) より算出した。

$$X = (N_A / N_0) \times 100 \quad (1)$$

2. 3 硝化活性試験

曝気操作を行った汚泥を 0.9% 生理食塩水で洗浄後、静置し濃縮汚泥を作製する。得られた濃縮汚泥に炭素源として NaHCO_3 : 420 mg/L、栄養塩として $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 33.75 mg/L, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 41.25 mg/L, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$: 0.0338 mg/L, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 0.035 mg/L, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$: 0.375 mg/L, CuSO_4 : 0.0021 mg/L, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 0.0012 mg/L, $\text{CoCl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$: 0.0002 mg/L, Na_2HPO_4 : 19.88 mg/L, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 32.76 mg/L を添加し⁵⁾、スターラーで攪拌曝気する。各抗生物質濃度を 1 $\mu\text{g/mL}$ と 10 $\mu\text{g/mL}$ の 2 実験系を用意し、アンモニア性窒素 ($\text{NH}_4^+\text{-N}$) が 50 mg/L となるよう NH_4Cl 溶液を夫々に添加する。汚泥濃度 1000 $\text{mg}^{-\text{MLVSS}}/\text{L}$ に設定、全量 400 mL とし、試験を開始する。開始後 30 秒後に汚泥 10 mL を採取し、速やかに遠心分離し、上澄みを水質分析試料とした。試料は 30 秒後、1 時間後、1~5 日後に採取した。得た試料をフィルターで濾過し、 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ を測定した。同時に MLSS 及び MLVSS も測定し、水質分析結果よりアンモニア酸化速度 $\text{mg}^{-\text{N}}/(\text{g}^{-\text{MLVSS}} \cdot \text{day})$ を算出した。

2. 4 水質分析等

MLSS 及び MLVSS 測定方法は、2012 年度版下水試験法⁶⁾に準拠した。 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ の測定は、サリチル酸法により HACH 社の携帯用多項目迅速水質分析計 (HACH DR/2400 型) を使用した。

キーワード 多剤耐性 抗生物質 標準活性汚泥法 下向流懸垂スポンジ (DHS) 法 硝化活性

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

3. 1 T市終末処理場の耐性菌

表1にT市終末処理場(n=2)の流入下水(Sewage), 最初沈殿池下水(PST eff.), AS処理水(ASP eff.), DHS処理水(DHS eff.)における各抗生物質に対する耐性菌数及び耐性菌出現率を示した. 表1よりほぼ全ての試料水において, CFDN+ABPC耐性菌が最も多く存在していた. CEDNとABPCは共にグラム陰性菌, 陽性菌に抗菌力を示すが, 陰性菌の一部である緑膿菌等には抗菌力を示さない. 従って, CFDN+ABPC存在下で生育を阻害されなかった耐性菌の多くが, 緑膿菌等の一部の陰性菌であると示唆された. 流入下水, 最初沈殿池下水, AS及びDHS処理水と処理が進行するに連れて耐性菌数が減少した. 一方, CFDN+ABPC耐性菌出現率は最初沈殿池下水で0.0017%, AS処理水で0.0318%, DHS処理水で0.0162%となり, 最初沈殿池下水よりも処理水で高い出現率を示したことから下水処理システム内で耐性遺伝子が伝播していることが示唆された. また, 各抗生物質に対する耐性菌はAS処理水に比べ, DHS処理水の方が多く検出される傾向が示された.

表1. 耐性菌数及び出現率

試料	N_0	KM+ ABPC	CFDN +ABPC	KM +CFDN	KM+CFDN +ABPC
Sewage	7.2×10^8	6133 (0.0009)	12433 (0.0017)	697 (0.0001)	450 (0.0001)
PST eff.	6.5×10^8	4733 (0.0007)	10533 (0.0016)	823 (0.0001)	430 (0.0001)
ASP eff.	3.8×10^5	28 (0.0075)	121 (0.0318)	1 (0.0004)	32 (0.0084)
DHS eff.	9.8×10^5	116 (0.0119)	158 (0.0162)	163 (0.0166)	99 (0.0101)

単位: CFU/mL (上段), % (下段)

3. 2 抗生物質が硝化活性に与える影響

図1, 2に硝化活性試験におけるKM添加系とABPC添加系のアンモニア性窒素($\text{NH}_4^+\text{-N}$)の時間変化を, 表2にアンモニア酸化速度を示した.

KM 10 $\mu\text{g/mL}$ 添加系では, 1 $\mu\text{g/mL}$ 添加系と比較してアンモニア酸化反応が1日遅れて出現し, 5日経過後においても, $\text{NH}_4^+\text{-N}$ が 10 mg/L 程度残存した.

ABPC 添加系では, 既報⁷⁾と同様に強い硝化抑制は確認されず, アンモニア酸化が速やかに進行していた. ABPC に対し, 耐性を持つ菌や分解する菌が存在した可能性がある.

全試料において, アンモニア酸化速度は抗生物質無添加系よりも, 添加系の方が低下する傾向が確認された. 水温やpHの変動, 他に阻害要因が無いことから, 抗生物質が主として影響を及ぼしたと示唆される. 抗生物質 1 $\mu\text{g/mL}$ 添加系に比べ 10 $\mu\text{g/mL}$ 添加系の方が, アンモニア酸化速度が低下し硝化反応が抑制される結果が示された.

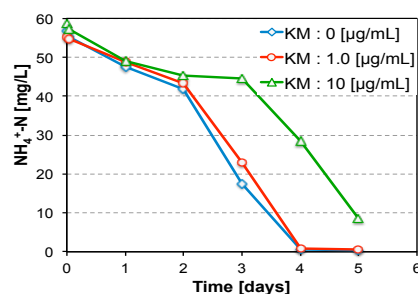


図1. $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 濃度の経時変化 (KM 添加系)

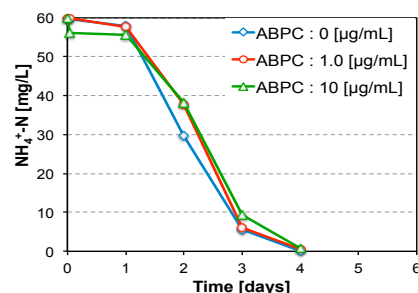


図2. $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 濃度の経時変化 (ABPC 添加系)

表2. 各系のアンモニア酸化速度

[$\mu\text{g/mL}$]	KM	ABPC	CFDN
0	24.04	27.70	25.38
1.0	22.97	25.96	25.00
10	20.91	25.44	23.30

単位: $\text{mg}^{-\text{NH}_4^+}/(\text{g}^{-\text{MLVSS}} \cdot \text{day})$

4. まとめ

KM, CFDN, ABPC の3種類の抗生物質を使用し, 下水処理過程における耐性菌の動態と硝化活性に与える影響を調査した. 流入下水に比べ, 処理水において耐性菌の出現率が高くなる傾向が示された. 更に, 抗生物質による硝化抑制が確認された.

参考文献

- 1) 深澤茂樹他, 抗生物質の汎用と抗生物質不使用食品の展望, 城西国際大学紀要, Vol.21(8), pp.17-28, 2013.
- 2) 鈴木俊也, 水環境中のヒト医薬品の存在実態及び環境中濃度の予測, 東京健康安研七報, Vol.63, pp.69-81, 2012.
- 3) 八十島誠他, 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, Vol.27, No.11, pp.707-714, 2004.
- 4) 石井良和, 薬剤感受性試験とブレイクポイント, その問題点と今後の展望, 日本化学療法学会雑誌, Vol.59, No.5, pp.454-459, 2011.
- 5) 橋本奨他, 活性汚泥の培養と主要元素の挙動に関する研究, 衛生工学研究討論会講演論文集, Vol.16, pp.57-64, 1980.
- 6) 日本下水道協会, 下水試験方法(上,下巻) 2012年版.
- 7) 山本崇奈生他, 単離硝化細菌および活性汚泥群集の硝化活性に対する抗生物質の影響, 第49回日本水環境学会年会講演集 2015, pp.63, 2015.