

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

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

抗生物質耐性菌（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、近年抗生物質の使用に伴い耐性菌も増加し、複数の種類の抗生物質の耐性をもつ多剤耐性菌も出現してきている。耐性菌が人に与える影響として 2013 年における耐性菌による死亡者数は 70 万人だが、何も対策を講じない場合 2050 年には 1000 万人にまで増加し現在の癌と同じような脅威となると予想されている¹⁾。特にアジア地域では、人口増加に伴い抗生物質使用量が増加し、下水処理施設の整備が不十分なため適切な処理がされないまま耐性菌が水環境へ排出されることに起因し、その死者の約半数を占めると予想される。

現在、主として活性汚泥法における下水処理過程での耐性菌の消長に関する研究が進められており、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という報告もある²⁾。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) 法では耐性菌に関する報告はなく、活性汚泥法より高濃度な汚泥を長時間保持するため、DHS 内でも耐性菌の伝播が行われる環境が形成されていると予想される。

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、その処理過程における耐性菌割合の変化や 16S rRNA 遺伝子解析により耐性菌の種類判別することで、DHS システムにおける耐性菌の消長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 コロニーを釣菌した。
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、表 1 に示した 6 種類の抗生物質 (カナマイシン (KM), セフジニル (CFDN), アンピシリン (ABPC), テトラサイクリン (TC), レボフロキサシン (LVFX), スルファメトキサゾールトリメトプリム (ST)) 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) を測り、表 1 の判定に従い耐性を判定する。本実験では、「耐性」のみを判定域として扱う。

表 1 薬剤耐性判定表³⁾

抗生物質	阻止円の直径 (mm)		
	耐性	中耐性	感性
カナマイシン (KM)	≤13	14-17	18≤
セフジニル (CFDN)	≤16	17-19	20≤
アンピシリン (ABPC)	≤13	14-16	17≤
テトラサイクリン (TC)	≤11	12-14	15≤
レボフロキサシン (LVFX)	≤13	14-16	17≤
スルファメトキサゾールトリメトプリム (ST)	≤11	11-15	16≤

2.3 サンガーシーケンスによる微生物種の同定

2.2 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, 多剤耐性菌, サンガーシーケンス, *Escherichia* 属, *Shigella* 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

3.1 多剤耐性菌の存在割合の変化

図1にDHS処理過程における多剤耐性菌の存在割合の変化を示す。また、N個釣菌した菌の内、X種類以上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本研究では存在割合と定義し、以下の式(1)で示す。

$$\text{存在割合(\%)} = (X/N) \times 100 \quad (1)$$

1~3剤耐性菌の存在率は、処理過程でそれぞれ13%、19%、5%上昇したことが確認された。活性汚泥法に関する既往研究においても2~3剤耐性菌割合は処理過程で5-10%上昇することが報告²⁾されており、DHS法でも同様な傾向が見られた。

4剤耐性菌とその微生物種に関しては、DHS流入水では*Shigella*属と*Escherichia*属が主な4剤耐性菌として検出されたが、処理水では*Escherichia*属は検出されず新たに*Aeromonas*属が検出された。

3.2 微生物構成の変化

図2にDHS処理過程における微生物群集の変化を示す。DHS流入水では大腸菌(*Escherichia coli*)が属する*Escherichia*属と赤痢の原因菌として知られる*Shigella*属が96コロニー中36コロニーの割合で占めていた。一方、DHS処理水では*Escherichia*属の割合が17コロニーと減る一方で*Shigella*属及び*Aeromonas*属はそれぞれ49コロニーから57コロニー、4コロニーから9コロニーとその割合が増えた。以上より、DHS汚泥内では*Shigella*属及び*Aeromonas*属にとって有利な増殖環境が形成されていることが示唆された。

三浦らによる下水処理場の活性汚泥槽では、TCとKMの耐性を持つ細菌として*Acidovorax*属や*Proteus*属が検出された⁴⁾。従って、DHS汚泥と活性汚泥は異なった微生物群で構成され、耐性遺伝子の伝播も多岐な微生物に影響していると考えられた。

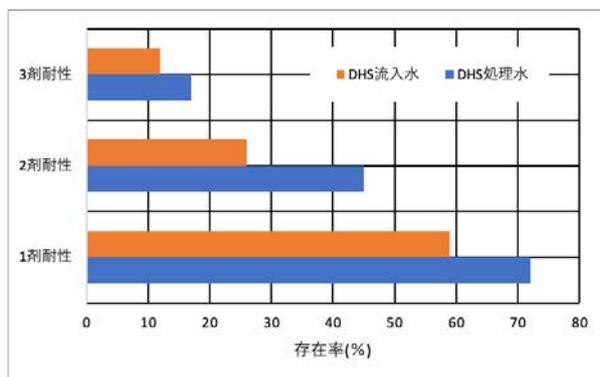


図1 処理過程における多剤耐性菌割合の変化

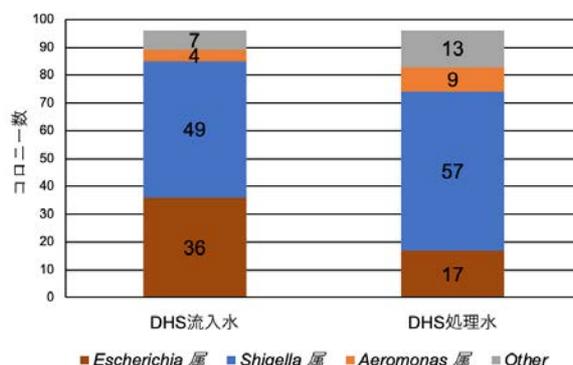


図2 処理過程における微生物群集の変化

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。

- 処理過程で多剤耐性菌割合は上昇した。
- 処理過程で*Escherichia*属の割合が減る一方で*Shigella*属及び*Aeromonas*属の割合が増えた。
- DHS汚泥内では*Shigella*属及び*Aeromonas*属にとって、増殖や薬剤耐性遺伝子の受け渡しに関して有利な環境が形成されていると示唆された。

以上の結果に加えて、大腸菌は処理過程で4.0 log程度減少し、*Escherichia*属は効果的に処理が進行し、処理水からも4剤耐性菌として*Escherichia*属は検出されなかった。今後は、解析サンプル数を増やし*Shigella*属及び*Aeromonas*属の消長に関して解析を進めるとともに、DHS保持汚泥にも対象を広げ、下水処理DHSリアクター内における耐性菌の動態を明らかにし、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) 尾崎ら, 水環境中における薬剤耐性菌の実態に関する研究, 平成16年度 下水道関係調査研究年次報告書集.
- 3) 栄研化学株式会社, KB ディスク栄研, https://www.info.pmda.go.jp/downfiles/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, vol.57, p113-114, 平成28年9月.