

# 抗生物質添加による活性汚泥細菌に対する影響

山形大学農学部 ○三浦逸実, 伊藤紘晃, 渡部 徹  
東北大学未来科学技術共同研究センター 風間しのぶ, 今田義光

## 1 はじめに

活性汚泥システムは下水処理における最も一般的な生物学的処理方法であり、世界中に広く普及されている。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（特に好気性細菌）がエアレーション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ている。一方で、下廃水に含まれる有機物は活性汚泥に吸着し、活性汚泥細菌によって同化や酸化分解が行われる。都市下水や畜産排水にはその地域で使用されずに廃棄された抗生物質や、人間や家畜の体内で代謝されずに排出された抗生物質が含まれており、活性汚泥システムの中で耐性菌の選択が起こる可能性も否定できない（三橋ら, 1985）。この観点から、実際に下水処理場で薬剤耐性菌を調査された例は多い。例えば、我々の研究グループの調査では、バンコクの下水処理場における抗生物質耐性大腸菌の割合が、流入水や処理水よりも下水汚泥で高いことが明らかにした（Patchanee *et al.*, 2011）。

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。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。将来的には、その重要な菌種の働きを抑えることで薬剤耐性菌の発生・伝播の可能性が低い活性汚泥システムを提案することを目指している。

## 2 実験方法

表1. 汚泥細菌の培養条件（培養液 10mL の構成）

サンプル名	汚泥混合液	LB培地	テトラサイクリン塩酸塩(10mg/ml)	カナマイシン硫酸塩(10mg/ml)
生汚泥	10			
LB	1	9		
TC500	1	8.5	0.5	
TC1000	1	8	1	
KM500	1	8.5		0.5
KM1000	1	8		1

(1) 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（表 1）。

(2) 培養後の汚泥混合液から DNA を抽出する。DNA 抽出には FastDNA SPIN Kit for Soil (MP Biomedicals) を用いる。

(3) 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。

(4) 増幅された遺伝子断片を精製し、次世代シーケンズ（GS Junior Titanium emPCR Kit を使用）によってその配列を解読する。

(5) Qiime ソフトウェアを用いて解読した配列を OTU（Operational Taxonomic Units：操作的分類単位）としてまとめ、Blast を用いた解析により、(1) の培養後の汚泥混合液に生息していた細菌種を明らかにする。

キーワード：薬剤耐性菌, 活性汚泥細菌, 下水処理場, 次世代シーケンズ

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

### 3 結果および考察

培養によって汚泥細菌が増えていることを確認するために、培養前（サンプル名：生汚泥）および培養後の汚泥混合液の DNA 濃度を計測した（図 2）。抗生物質を添加しない条件で培養した場合（サンプル名：LB），DNA 濃度は約 200 倍になった。一方、抗生物質を添加した条件で培養した場合には、汚泥細菌の増殖が抑制されていることがわかる。

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 2 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  $\gamma$  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する条件（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を持っているのであろう。

一方、カナマイシンを添加して培養する条件（サンプル名：KM500，KM1000）では、Aeromonadaceae 科、Enterobacteriaceae 科、

および、Porphyromonadaceae 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。

### 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科レベルで解析した。テトラサイクリンには Comamonadaceae 科が、カナマイシンには Enterobacteriaceae 科などが耐性を持ち、耐性遺伝子を他の細菌に伝播させる可能性が示された。今後は、得られたデータをより細かい分類（属や種）で整理し、耐性菌の発生・伝播に貢献する細菌を明らかにしていきたい。

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.

Patchanee *et al.* (2011) The 16th International Symposium on Health-Related Water Microbiology, (Rotorua, New Zealand), L8, September 2011

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

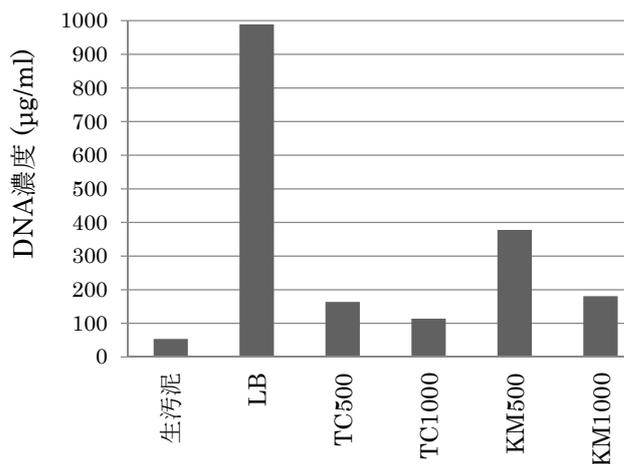


図 2. 培養前後の汚泥混合液中の DNA 濃度

表 2. 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		TC500	
Comamonadaceae	21.5	Aeromonadaceae	41.2	Comamonadaceae	15.3
Rhodocyclaceae	8.5	Enterobacteriaceae	25.3	Chitinophagaceae	7.2
Sphingobacteriales 目	4.8	Moraxellaceae	15.9	Sphingobacteriales 目	6.0
Xanthomonadaceae	3.4	Fusobacteriaceae	10.2	Porphyromonadaceae	5.4
TM7-1 門	3.3	Porphyromonadaceae	1.1	Intrasporangiaceae	5.0
TC1000		KM500		KM1000	
Comamonadaceae	30.2	Aeromonadaceae	57.8	Enterobacteriaceae	36.5
Rhodocyclaceae	5.1	Porphyromonadaceae	14.9	Enterococcaceae	35.1
HOC36 目	3.5	Enterobacteriaceae	14.1	Porphyromonadaceae	18.4
Sphingobacteriales 目	3.1	Enterococcaceae	10.3	Sphingobacteriaceae	2.2
Sphingomonadaceae	3.0	Bacteroidaceae	0.7	Streptococcaceae	1.2