

抗菌薬に耐性を示す活性汚泥細菌の群集解析

山形大学大学院農学研究科 学生会員 ○三浦逸実
山形大学農学部 正会員 西山正晃，渡部徹
東洋大学情報連携学部 正会員 浦剣
カセサート大学工学部 非会員 Chiemchaisri Chart, Chiemchaisri Wilai

1 はじめに

都市下水や畜産排水を処理する活性汚泥システムでは、活性汚泥中の多種多様な微生物が曝気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、下廃水に含まれる有機物の同化や酸化分解を行っている。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く、薬剤耐性菌の発生が起こりやすい環境といえる。活性汚泥中の細菌群集は、その地域の気候や食生活、産業などによって異なることが予想され、処理プロセスの運転状況にも影響を受けるかもしれない。さらに、耐性菌の発生については、その地域で使用されている抗菌薬の種類によって決まるものと考えられる。本研究では、抗菌薬の添加に対する活性汚泥細菌の群集構成変化から、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し、タイと日本の下水処理施設の活性汚泥を採取し、そこに存在する耐性菌の群集解析を行った。

2 実験方法

活性汚泥はタイ・バンコク市内の都市下水処理場(JJ,BS,DD)，大学排水処理施設(KU)，病院排水処理施設(KL,PY,CP)から採取した。比較のために、山形県鶴岡市の下水処理場（TSU）においても採取した（表 1）。

表 1 対象とした下水処理場の概要

サンプリング地点	DD	JJ	BS	TSU	KU	CP	KL	PY
下水の種類	都市下水				大学排水	病院排水		
最大日処理量 (m3/day)	350000	750000	150000	56100	—	450	—	—

採取した汚泥混合液 1ml，抗菌薬を添加した液体培地 9ml を混合させ、24 時間 37℃で振とう培養する。液体培地は、できるだけ選択性の低い Luria-Bertani(LB)液体培地を用いた。抗菌薬は、シプロフロキサシン，アンピシリン，テトラサイクリン，セフェピム，ドリペネム，メロペネムのいずれかを添加した。高濃度の抗菌薬を添加した上で短時間の培養を行うことで、培養中における耐性菌の発生を最小限にしている。培養前後の汚泥から FastDNA SPIN Kit for Soil (MP Biomedicals)を用いて DNA を抽出した。抽出した DNA に対して PCR 法を用いて 16SrRNA 遺伝子の V4 領域を対象に増幅させた。増幅された遺伝子断片を精製し、次世代シーケンサー(イルミナ社 MiSeq)によってその配列を解析した。得られた配列情報は、菌叢解析ソフトウェア (Qiime ver 1.93)を使用して、97%以上の相同性で OTU にクラスタリングした。その後、既存のデータベース(Green genes)と照合して汚泥混合液に生息していた細菌種を明らかにした。

3 結果および考察

16S rRNA 遺伝子の配列情報に基づいて、各条件における細菌群集を門レベルで分類した（図 1）。バンコク市内の下水処理施設の存在する細菌の種類は類似しており、処理場ごとで処理量が異なっているが、その違いは細菌構成に大きな影響を与えなかった。JJ,BS,DD 地点において 3 回に渡って採取した汚泥で、細菌群集の比較を行った。

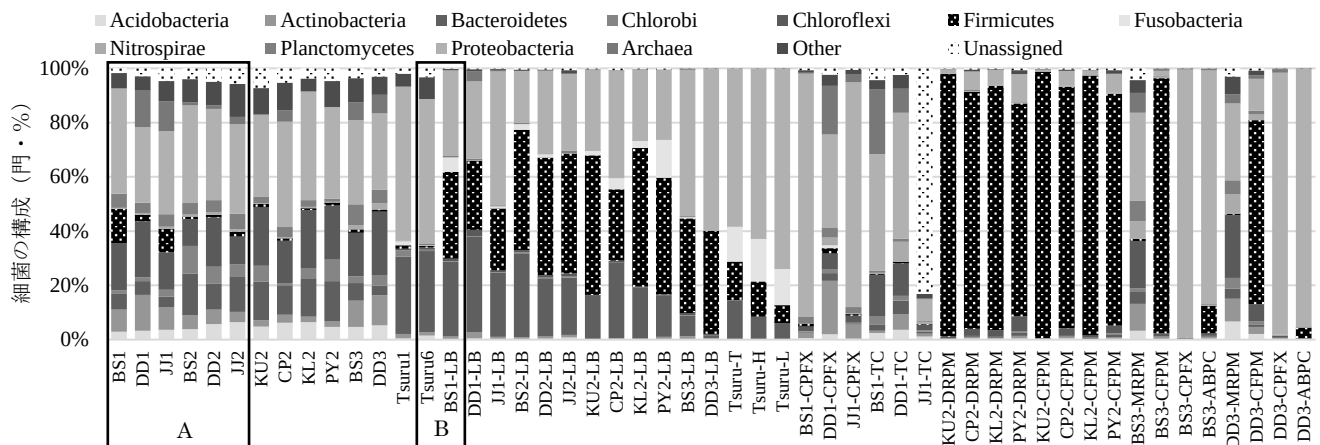


図1 門レベルの活性汚泥中の細菌構成。Otherには検出の割合が低いものを含む。サンプル名は地点名（表1参照）からはじまり、それに続く1~3の数字はサンプル採取日を示す。1は2016年3月、2は2017年3月、3は2017年8月に採取した。末尾のアルファベットの意味は次の通りである。（LB:抗菌薬を添加せず培養 CPFX:シプロフロキサシン TC:テトラサイクリン DRPM:ドリペネム CFPM:セフェピム MRPM:メロペネム ABPC:アンピシリン）

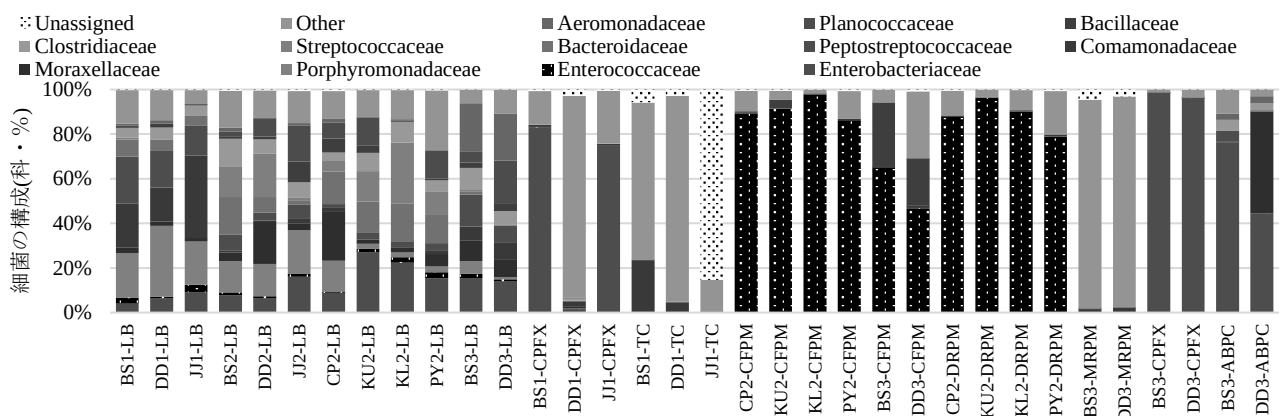


図2 科レベルの活性汚泥中の細菌構成。Otherには検出の割合が低いものを含む。サンプル名は図1と同様である。

図1のAを見ると、同じ3月に採取したにも関わらず、汚泥細菌の構成には相違が見られた。鶴岡市の処理場では（図1B）、同じ年の1月（Tsuru1）と6月（Tsuru6）で汚泥細菌の菌叢は類似していた。他の研究事例を調べる必要があるが、この結果は、汚泥細菌群集の（種構成）安定性は地域によって異なる可能性を示している。バンコクと鶴岡で汚泥の細菌の構成が異なっていた。

図2に、各条件における科レベルで分類した細菌群集を示す。抗菌薬を添加せずに栄養培地で培養した場合（XX-LB）、汚泥細菌群集はLB培地に適した細菌である Porphyromonadaceae, Comamonadaceae, Moraxellaceae, Enterobacteriaceae 科の細菌の割合が増加した。抗菌薬を添加して培養した場合の汚泥細菌群集の変化を見ると、テトラサイクリン、メロペネム存在下では、抗菌薬無添加で培養したときに優先していた細菌は見えなくなりバンコクの活性汚泥細菌はテトラサイクリン、メロペネムに感受性がある。アモキシシリン、アンピシリン、シプロフロキサシン存在下では、Enterobacteriaceae の細菌の割合が増加し、この科に属する細菌に耐性菌が多いことが示された。セフェピム、ドリペネム存在下では、Enterococcaceae の割合が大幅に増加し、この科に属する細菌に耐性菌が多いことが示された。ここに示した科に属する細菌は、他の細菌に耐性遺伝子を受け渡す可能性がある。

謝辞 本研究は、JSPS 科学研究費補助金（No. 16H01782, 15H05223）の支援を受けて行われた。また、本研究は、山形大学 YU-COE(C)の活動の一環で行われた。

参考文献 1) Kim, S., & Aga, D. S. (2007). Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B, 10(8), 559-573.