

## B-35 活性汚泥の硝化反応に対する抗生物質の影響

○井澤 大<sup>1</sup>・浦瀬 太郎<sup>1\*</sup><sup>1</sup>東京工科大学大学院バイオ情報メディア研究科バイオニクス専攻  
(〒192-0982 東京都八王子市片倉町1404-1)

\* E-mail: urase@bs.teu.ac.jp

## 1. はじめに

水環境中の医薬品については、その存在、処理プロセスでの挙動など、さまざまな観点から研究が進められているが、特に抗生物質については、抗生物質耐性とのかわりや、微生物生態系の攪乱が懸念されている。微生物への影響という点では、水処理プロセスの生物処理機能が抗生物質によって影響を受けることが考えられる<sup>1)</sup>。特に、硝化に関わる細菌群集は構成種が限られていると考えられることから、抗生物質の流入による影響を受け易いと考えられる<sup>2)</sup>。本研究では、第一世代の抗生物質であるアンピシリンなど3種、および、現在も医療用途でヒトに投与されている比較的新しい抗生物質であるレボフロキサシンなど3種の抗生物質を活性汚泥に対して作用させ、硝化反応の阻害の程度を調べた。

## 2. 実験方法

## (1) 試薬の準備

硝化阻害実験で用いたリン酸緩衝液は、リン酸二水素カリウム 2.72g とリン酸水素二カリウム 3.48g とを 200mL の純水に溶かして作成した。また、アンモニア性窒素原液は、硫酸アンモニウム 47.2g を 1L の純水に溶かして 10 g/L の濃度で作成した。また、抗生物質原液は、表-1 のものを別々に滅菌水で希釈して 0.5g/L ~ 10g/L の濃度で作成した。また、表-1 では、今回用いた抗生物質の薬剤の系列と腸内細菌に対する MIC(最小発育阻止濃度)を示す。

## (2) 活性汚泥試料の準備

学内の排水処理施設から活性汚泥を採取して、1日曝気した汚泥(以下、下水汚泥と表記)、および、実験室でアンモニア性窒素を 100mg/L 含む無機塩培地で約半年、硝化細菌を卓越させるように培養した汚泥(以下、培養硝化汚泥と表記)の汚泥 2 種類を用いた。培養硝化汚泥に対して ABPC, TC, ST, GM の試験を、下水汚泥に対して、GM, LVX, MPM の試験を行った。つまり、GM は双方の汚泥に対して試験を行った。

表-1 本研究で用いた抗生物質と腸内細菌の耐性を判断するためのMIC(最小発育阻止濃度)

和名	略称	系列	腸内細菌 MIC <sup>3)</sup>
アンピシリン	ABPC	ペニシリン系βラクタム系	32μg/mL
テトラサイクリン	TC	テトラサイクリン系	16μg/mL
スルファメトキサゾール	ST	サルファ剤	152μg/mL
ゲンタマイシン	GM	アミノグリコシド系	8μg/mL
レボフロキサシン	LVX	ニューキノロン系	8μg/mL
メロペネム	MPM	カルバペネム系	16μg/mL

## (3) 硝化率の測定による阻害試験の方法

リン酸緩衝液 0.1mL, アンモニア性窒素原液 0.1mL, 水道水 90mL をプラスチック容器に入れて、蓋をして 20°C で設定した恒温槽で 1 日放置し、翌日、活性汚泥を MLSS で 5mg を添加し、決められた濃度になるように抗生物質原液の適量を加え、2~3 日に 1 度開栓攪拌をしながら、14 日間の硝化反応を 20°C で設定した恒温槽の中で調べ、抗生物質をいれないブランクを対照として硝化率を比較した。抗生物質の添加濃度は、腸内細菌の MIC 濃度を基準に、6~8 段階程度の濃度を設定した。

## (4) 分析方法

実験前後での pH, 亜硝酸性窒素, 硝酸性窒素, アンモニア性窒素濃度の測定を行った。pH の測定には pH 試験紙を用いた。硝酸性窒素 (NO<sub>3</sub>-N), 亜硝酸性窒素 (NO<sub>2</sub>-N), アンモニア性窒素 (NH<sub>3</sub>-N) の測定には、簡易水質検査試験紙(シーメンスメディカルソリューションズ・ダイアグノスティクス株式会社)を用いた。硝化率は、NO<sub>2</sub>-N がほとんど検出されなかったため、NO<sub>3</sub>-N/(NH<sub>3</sub>-N + NO<sub>3</sub>-N) で求めた。

### 3. 結果と考察

#### (1) 硝化に要する時間

図-1は培養硝化汚泥を用いた場合の、図-2は下水汚泥を用いた場合の14日間の硝化率の推移を示す。測定に簡易測定を用いていることから、測定値が不連続的に変化するが、下水汚泥では10日、培養硝化汚泥では14日でほぼ100%硝化が完了した。培養硝化汚泥の方は、下水汚泥に比較して、硝化活性が低く、硝化完了まで時間がかかったと考えられる。また、図-1、図-2は抗生物質としてGMを用いた場合であるが、濃度の高い抗生物質が含まれている場合で、硝化率がより低くなったことから、硝化に抗生物質が阻害をおよぼしていることが観察された。すなわち、10日～14日の培養を行うことによって、硝化への阻害の有無が評価できると考えられる。また、培養硝化汚泥に対しては、0.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で抗生物質を添加しない場合の約半分の硝化率となったが、下水汚泥では0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で硝化率が約半分になっており、活性の高い汚泥に対しての方が、高濃度の抗生物質が硝化の抑制に必要であることがわかった。

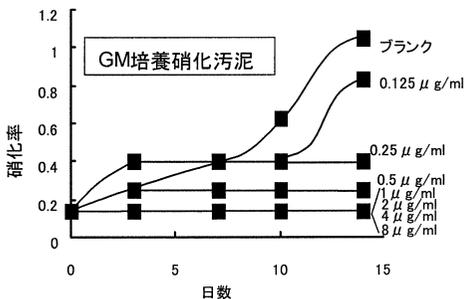


図-1 培養硝化汚泥の硝化活性へのゲンタマイシン(GM)の阻害

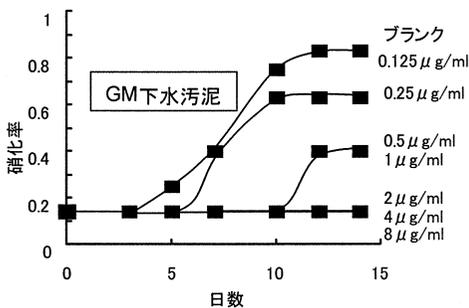


図-2 下水汚泥の硝化活性へのゲンタマイシン(GM)の阻害

#### (2) 10日目と14日目の硝化阻害率の比較

抗生物質を入れない試料に対して、抗生物質の添加により硝化がどの程度阻害されたかを、図-3に実験10日目の、図-4に実験14日目の、それぞれの測定結果で示す。硝化阻害率が0とは抗生物質を入れない試料と同じ硝化

率が得られた場合を、硝化率が1とは全く硝化が起らなかったことを意味している。それぞれの薬剤について、10日目で判断しても、14日目で判断しても、濃度の高い抗生物質を加えるほど、硝化の阻害は大きくなった。GM, LVXIは、特に低濃度で硝化への影響が見られ、一方、ST, ABPCは比較的高濃度で硝化の阻害が見られた。グラフの形状は、多くの場合に、ある濃度で急激に阻害が生じる形状であり、硝化阻害を生じる濃度の判定はし易かったが、MPM, STは、中間的な阻害を生じる濃度範囲が広い傾向があった。硝化阻害率0.5に相当する抗生物質濃度を硝化阻害濃度と定義すると、ABPC, ST, LVXIは14日目で評価する方が高い硝化阻害濃度となり、顕著ではないものの、長時間で評価すると、より高濃度の抗生物質が硝化抑制のために必要になる傾向が見られた。

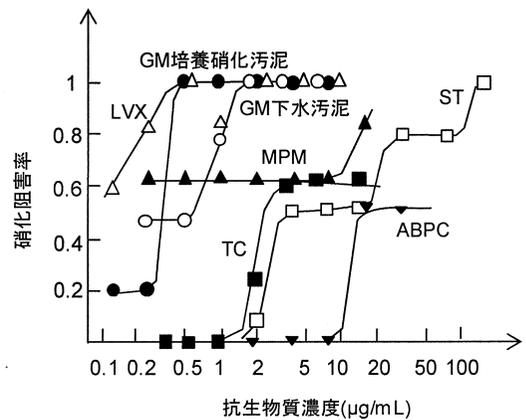


図-3 10日目の硝化阻害率の抗生物質濃度依存性

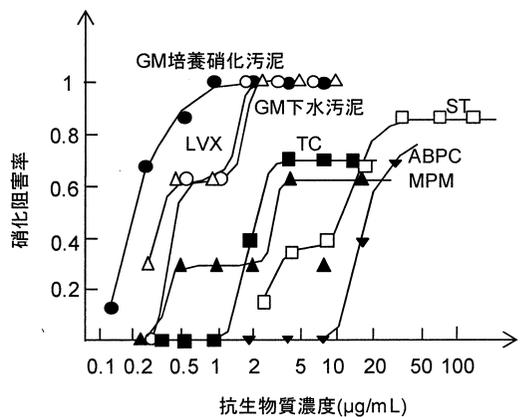


図-4 14日の硝化阻害率の抗生物質濃度依存性

#### (3) 腸内細菌阻害濃度と実験結果の比較

図-5に腸内細菌MICと本研究の14日目のデータから得られた50%硝化を抑制する抗生物質濃度との比較を示した。すべての抗生物質について、腸内細菌MICよりも50%硝化を阻害する濃度の方が小さかった。MICは耐性菌を

判断するための基準であり、50%の硝化を抑制する濃度とは考え方が異なるので単純には比較できないが、硝化細菌の方が腸内細菌よりも抗生物質に対して敏感である可能性が高いと考えられる。

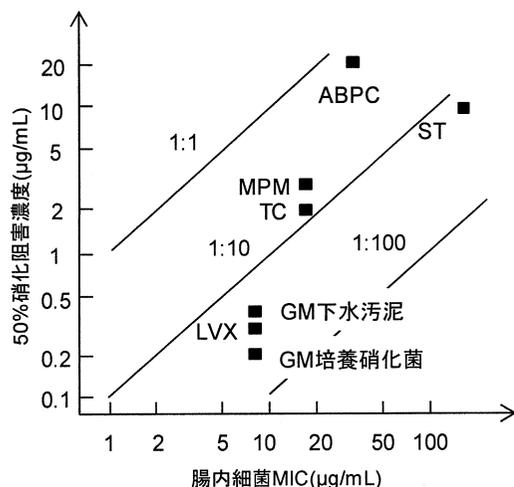


図-5 腸内細菌MICと本研究で得られた50%硝化抑制濃度

#### (4) 排水中濃度と実験結果の比較

ここでは、抗生物質服用者がいる家庭を想定し、浄化槽流入抗生物質濃度を推定し、実際の小規模排水処理プロセスで硝化阻害が抗生物質によって生じる可能性があるかどうかを検討する。各抗生物質の使用説明書<sup>4)</sup>から標準的な1日あたりの投与量を求め、排泄率から排水に含まれる抗生物質量を計算した。1人1日平均使用水量は、平成18年における有効水量ベースで305 L/(人・日)<sup>5)</sup>とから、1日の1人当たりの排水量で排せつ量が希釈されるとした場合の抗生物質濃度を求めた。また、現在は、単独処理浄化槽の新規設置はないが、雑排水をほとんど使用しない場合を想定して、水洗トイレ排水のみ85 L/(人・日)の場合も計算した。

標準投与量<sup>4)</sup>は、ABPCが肺炎、肺膿瘍、腹膜炎などの場合の静脈注射を想定し1日6 g(力価)、TCが咽頭・喉頭炎、扁桃炎、急性気管支炎、肺炎、肺膿瘍などの場合の経口投与を想定し1日1 g(力価)、GMが敗血症、外傷・熱傷及び手術創等の二次感染、肺炎などの場合の筋肉内注射を想定し1日1 g(力価)、STが肺炎、感染性腸炎などの場合の経口投与を想定し、スルファメトキサゾール換算で1日1.6g、LVXが咽頭・喉頭炎、扁桃炎などの場合の経口投与を想定し1日300mg、MPMが肺炎、肺膿瘍などの点滴投与を想定し1日1gとした。

表-2に本研究で求めた50%硝化阻害濃度と抗生物質服用者の水洗トイレ排水、あるいは、排水中濃度の比較を示した。トイレ排水濃度の計算値はTCを除いて本研究の50%硝化阻害濃度を上回っており、生活者1名が抗生物質

を服用し、その水洗トイレ排水のみが浄化槽に流入するような場合を想定すると、硝化阻害を引き起こす可能性がある。一方、排水中濃度では、硝化阻害濃度と排水中濃度はほぼ同じ程度である。さらに当該抗生物質の服用者以外の排水の混合がある大規模下水処理施設では、硝化阻害を示す濃度にはならないことが示唆される。

表-2 抗生物質服用者からの排水中濃度の推定値と実験で得られた硝化阻害濃度の比較

	ABPC	TC	GM	ST	LVX	MPM
硝化阻害濃度 ( $\mu\text{g/mL}$ )	20	2	0.2	10	←培養硝化汚泥	
	下水汚泥→			0.4	0.3	3
排泄率(% <sup>4)</sup> )	80	14	83	85	79.6	61
トイレ排水中抗生物質濃度( $\mu\text{g/mL}$ )	56.4	1.5	1.1	15	2	7
排水中抗生物質濃度( $\mu\text{g/mL}$ )	15.7	0.4	0.3	4	0.7	2

#### 4. まとめ

活性汚泥の硝化活性に対する抗生物質の阻害を調べたところ、以下のことが明らかになった。

- 1) 試料瓶に活性汚泥とアンモニア性窒素を添加し、10日～14日培養することによって、抗生物質の硝化阻害の程度を調べることが可能であった。
- 2) 実験で求められた50%硝化阻害抗生物質濃度は、腸内細菌MICの1～1/100程度であった。
- 3) 服用者のみが水洗トイレのみを使用し、その排水を処理する極端な場合を考えると、硝化は抗生物質により阻害される可能性が高く、服用者の雑排水を含めて処理する浄化槽でも想定排水中濃度と50%硝化阻害濃度は同じオーダーであった。非服用者の排水が大量に混合する大規模下水処理場では、抗生物質が硝化を阻害する可能性は低いと考えられた。

#### 参考文献

- 1) Kümmerer K.: Antibiotics in the aquatic environment – A review – Part I Review Article, *Chemosphere*, vol. 75, 4, pp. 417-434, 2009.
- 2) Dokianakis, S.N., M.E. Komarosand, M.E., Lyberatos, G.: On the effect of pharmaceuticals on bacterial nitrite oxidation, *Water Science & Technology*, Vol. 50, 5, pp. 341–346, 2004.
- 3) 栄研化学株式会社: KBディスクカタログ30版(2008年4月), 2008.
- 4) 財団法人日本医薬情報センター: 医薬品情報データベース <http://database.japic.or.jp/nw/index>
- 5) 国土交通省 水資源部: 平成21年版日本の水資源, <http://www.mlit.go.jp/tochimizushigen/mizsei/index.html>