

B-42 抗生物質による環境中硝化細菌に対する阻害

○太田 昇吾¹・浦瀬 太郎^{1*}

¹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

硝化細菌は、アンモニウムイオンや亜硝酸イオンを酸化することにより ATP を生産する化学合成独立栄養細菌であり、自然界では窒素循環の一部を担う細菌である。また、廃水処理施設においてもその性質を利用し、廃水中の窒素化合物を除去する生物学的窒素除去プロセスに利用されている重要な細菌である。しかし、硝化細菌は従属栄養細菌に比べて、エネルギー変換効率が悪いことから増殖が遅く、環境変化に対して感受性が強いこと、温度や pH 変化等の物理的要因や化学物質の流入等による化学的要因により硝化活性が低下しやすい。また、水環境中の医薬品に対する関心が高まっているが、医薬品の中でも抗生物質は、人の体内では一部しか代謝されない為、抗菌力を持ったままし尿から廃水処理施設に流入し、硝化プロセスを攪乱する恐れがある。

そこで、本研究では、硝化細菌に影響を及ぼす化合物として、抗生物質に着目し、処理施設中と河川中の硝化細菌にそれぞれ抗生物質を添加し、影響を調べた。また、硝化細菌の純菌を用いて、硝化細菌群集との間に抗生物質による影響の違いがあるのかについて調べた。

2. 実験方法

(1) 使用した抗生物質

本研究で使用した抗生物質を表-1 に示した。抗生物質は古くからある代表的な抗生物質であるアンピシリン、テトラサイクリン、及び、現在の医療用途での使用量の多い比較的新しい抗生物質であるレボフロキサシン、ゲンタマイシンの計 4 種の抗生物質を用いた。このうち、自然河川水中と純菌の硝化細菌を用いた硝化阻害試験では、抗菌力が強く、生物難分解性であるレボフロキサシンに絞り、硝化阻害試験を行った。抗生物質の添加濃度は、腸内細菌 MIC を最高濃度とし、6~8 段階の濃度を設定した。

表-1 本研究で用いた抗生物質 4 種

和名	略称	系列	腸内細菌 MIC
アンピシリン	ABPC	ペニシリン系 β ラクタム系	32 μ g/mL
テトラサイクリン	TC	テトラサイクリン系	16 μ g/mL
レボフロキサシン	LVFX	ニューキノロン系	8 μ g/mL
ゲンタマイシン	GM	アミノグリコシド系	8 μ g/mL

(2) 硝化細菌を含む試料の調整

(2-1) 活性汚泥からの調製

プラスチック瓶にリン酸緩衝液 (0.4M) 0.1 mL、水道水 100 mL を加え、更に基質となるアンモニア性窒素を 10 mg/L の濃度になるように添加し、水道水内の塩素を除去するため 1 日放置した。東京工科大学内にある下水処理施設から活性汚泥を採取し、1 日曝気し、翌日、その汚泥 (MLSS 約 5,000 mg/L) の 1 mL を硝化細菌試料として、基質等が調製された容器へ添加した。

(2-2) 環境中試料からの調製

本研究では、硝化細菌を含む試料として、多摩川上流水再生センターの排水が流入した直後の多摩川とその支流である谷地川 (小宮町付近)、排水等の流入がほとんどない高尾山琵琶滝、及び、畑地の影響の見られる片倉城址公園の湧水から表面水を採水し、研究室内で 1 日曝気を行った。翌日、試料水上澄み 100 mL の入ったプラスチック瓶内にリン酸緩衝液 (0.4M) 0.1 mL、基質となるアンモニア性窒素を 10 mg/L の濃度となるように添加した。

(2-3) 純菌

亜硝酸酸化細菌である *Nitrovacter winogradskyi* (NREC より分譲) を液体培地に植菌し、28℃のインキュベーター内で培養した。プラスチック瓶内に 1 日放置した水道水 90 mL、リン酸緩衝液 (0.4M) 0.1 mL、培養液 10 mL を混合し、

更に基質となる亜硝酸性窒素を10 mg/Lとなるように添加した。

(3) 硝化抑制試験

サンプルは、抗生物質未添加のブランクサンプルと抗生物質を段階的に添加したサンプルをそれぞれ用意し、20℃の恒温槽内で硝化反応を進行させた。抗生物質を入れないブランクサンプルと抗生物質を添加したサンプルの硝化率を比較する事で抗生物質による影響を21日間調べた。硝化率は、基質となるアンモニアまたは亜硝酸性窒素の減少と硝化作用による生じる硝酸性窒素の増加を測定し、下記の式より算出した。

$$\text{硝化率(\%)} = \frac{\text{生成窒素化合物}}{\text{生成窒素化合物} + \text{基質窒素化合物}} \times 100$$

(4) 分析方法

実験前後での pH、アンモニア性窒素、亜硝酸性窒素、硝酸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、pH の低下が確認された場合には、炭酸ナトリウムにより pH を7に調節した。それぞれの窒素化合物は、パックテスト（共立理化学研究所）にて発色させた後、分光光度計を用いて測定し、検量線法により濃度を算出した。

3. 結果と考察

(1) LVFXの活性汚泥から得られた硝化菌群集への影響

図-1 は活性汚泥中硝化細菌へ LVFX を添加した時の硝化率の推移を示した。LVFX による硝化阻害は、0.5 µg/mL の低濃度から生じ、高濃度では、より強い硝化活性が阻害された。しかし、8 µg/mL の LVFX 添加時でも測定日数が経過すると共に徐々に硝化が進んだ。このことから、活性汚泥のような混合培養条件では様々な種の硝化細菌が存在し、また、その存在場所がフロックの内部であるなど抗生物質に対する感受性が低いものが共存しているため、高濃度の LVFX に暴露してもゆっくり硝化が進んだと考えられる。

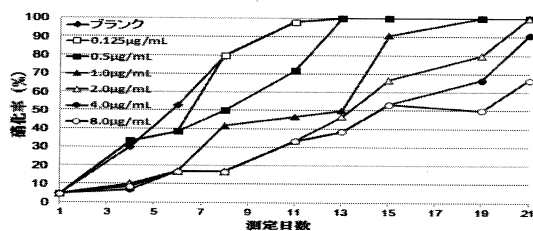


図-1 LVFXによる活性汚泥中硝化細菌の硝化阻害試験

(2) LVFXの純菌への影響

図-2 は亜硝酸酸化細菌の純菌である *Nitrovector winogradskyi* を用いて LVFX による硝化阻害試験を行っ

たものである。この純菌の場合は、4.0 µg/mL 以上の LVFX を添加すると、完全に硝化が抑制された。

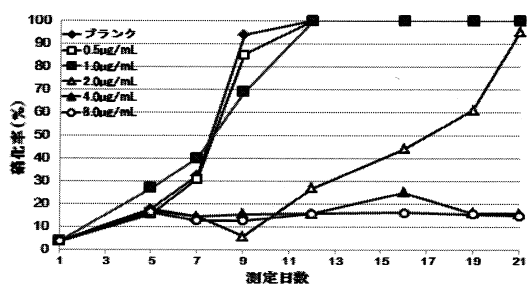


図-2 LVFXによる*Nitrovector winogradskyi*を用いた硝化阻害試験

(3) LVFXの自然河川から得られた硝化菌群集への影響

図-3は、採水を行った4つの自然河川の抗生物質を含まない試料の硝化率の推移を示した。それぞれの河川の硝化速度を比較すると、高尾山琵琶滝川で採取したサンプルの硝化が最も遅く、21日経過しても硝化率は100%とならなかった。これは、高尾山琵琶滝川は河川中の汚濁物質が少なく、もともと硝化活性が低いサンプルであったためと考えられる。その他の3つの河川はほぼ同程度の硝化推移を示し、13-15日で硝化率は90%以上となった。片倉城址公園湧水は、湧水の近くに大きな畑が存在する為、肥料などからアンモニア態窒素が溶け出し、比較的、硝化細菌が多く含まれた試料だったと考ええる。多摩川や片倉城址公園の湧水の試料では、すでに1日目の試料で3 mg/L程度の硝酸が含まれていた。

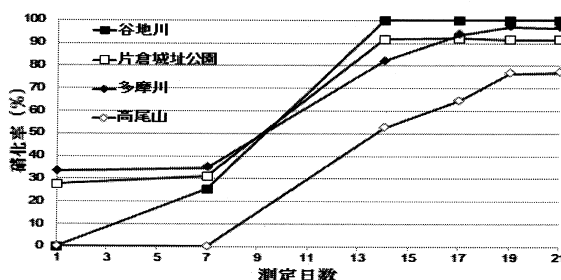


図-3 4つの自然河川水における硝化速度の比較

図-4は谷地川河川水へLVFXを添加し、硝化率の推移をグラフに示した。抗生物質を含まないサンプルの硝化率の推移と比較するとLVFX添加濃度0.25 µg/mLから阻害が確認されたが、活性汚泥中硝化細菌の場合と同様に、硝化活性は完全には抑制されず、測定日数の経過と共に硝化反応は徐々に進行した。なお、谷地川河川水中ではLVFXは分解しないことを確かめているため、LVFXの分解

により硝化が後から生じたとは考えられない。また、図-5は片倉城址公園湧水を用いた場合、1.0 $\mu\text{g/mL}$ から阻害が確認されたが、硝化活性は完全には抑制されず、測定日数の経過と共に硝化反応は徐々に進行した。しかし、図-6に示した今回の試料のうち、最も清浄だったと考えられる高尾山琵琶滝試料の場合には、0.125 $\mu\text{g/mL}$ から顕著な硝化阻害が確認され、また測定日数が経過しても、硝化は進行せず純菌の場合と同じ傾向が得られた。また図-7に示した多摩川河川水において0.25 $\mu\text{g/mL}$ 以上で硝化は完全に抑制され、試料によってLVFXへの感受性が大きく異なる結果となった。各河川の抗生物質未添加のサンプルの硝化速度に大きな差はないことから、各試料のもともとの硝化活性の差によるものではなく、下水処理施設の場合と同じく、汚染の進んだ場所から採取した硝化細菌群集は様々な種で構成され、抗生物質に対する感受性が低い種が含まれていることが示唆される。

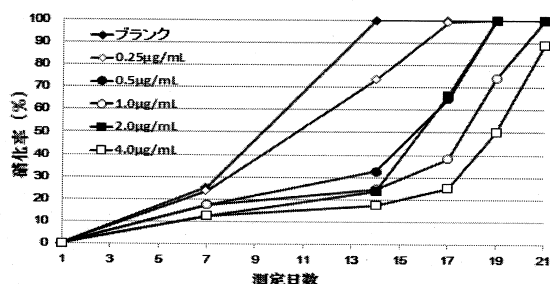


図-4 LVFXによる谷地川河川水を用いた硝化阻害試験

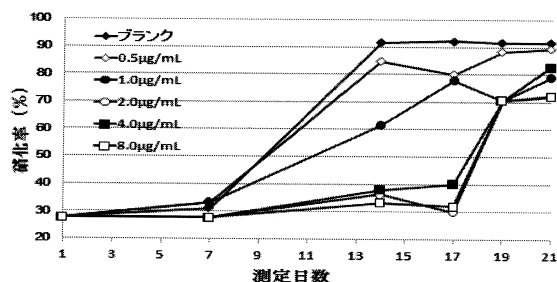


図-5 LVFXによる片倉城址公園を用いた硝化阻害試験

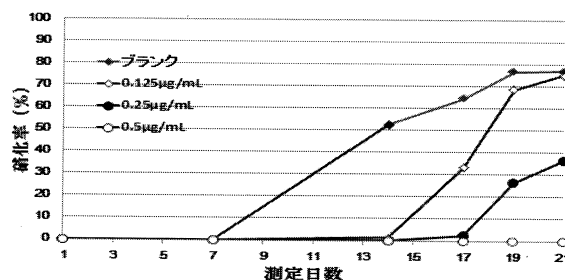


図-6 LVFXによる高尾山琵琶滝川を用いた硝化阻害試験

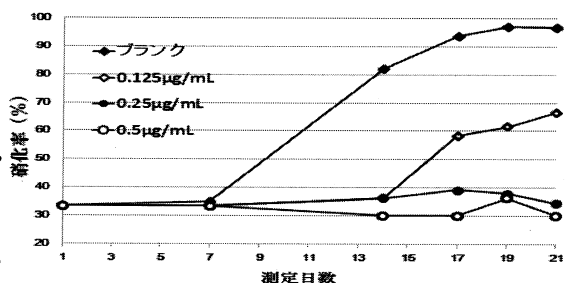


図-7 LVFXによる多摩川河川水を用いた硝化阻害試験

(4) 様々な抗生物質の活性汚泥から得られた硝化細菌群集への影響

図-8は活性汚泥中硝化細菌への各抗生物質による硝化阻害率をグラフに示した。硝化阻害率は抗生物質を添加していないブランクサンプルの硝化率が90%以上に達した9-11日後の硝化率より算出した。各抗生物質の硝化阻害率を比較すると、LVFXやGMでは2 $\mu\text{g/mL}$ の初期添加濃度以上で50%以上の硝化阻害率が確認され、顕著な硝化阻害が確認された。しかし、TCやABPCでは腸内細菌に対するMIC濃度を添加しても50%以下の硝化阻害率であった。活性汚泥のような混合培養系では、比較的古い抗生物質であるTCやABPCは生物分解されやすく、添加した抗生物質濃度が実験途中でかなり減少したことが、結果に影響した可能性がある。

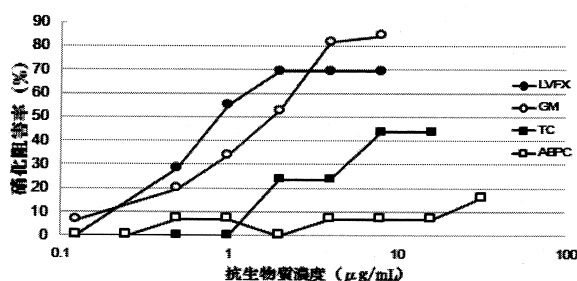


図-8 各抗生物質による硝化阻害率

4. まとめ

下水処理施設や谷地川、片倉城址公園の湧水から得られた硝化細菌群集では、8 $\mu\text{g/mL}$ のレボフロキサシンを添加しても、硝化が徐々に進行した。しかし単離株では4 $\mu\text{g/mL}$ 以上、多摩川、高尾山琵琶滝から得られた硝化細菌群集では、0.5 $\mu\text{g/mL}$ 以上の濃度では、完全に硝化が阻害された。このことから、下水処理施設や汚染の進んだ場所から採取した硝化細菌群集は様々な種で構成され、抗生物質に対する感受性の低い種が含まれていることが示唆される。