

## B-47 日光照射による下水二次処理水の消毒効果 ならびに細菌の生残性と薬剤耐性との関係

○西山 正晃<sup>1</sup>・村田 匡俊<sup>2</sup>・宇野 瑞穂<sup>2</sup>・鈴木 祥広<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>宮崎大学大学院工学研究科土木環境工学専攻 (〒889-2192 宮崎市学園木花台西1-1)

<sup>2</sup>宮崎大学工学部土木環境工学科 (〒889-2192 宮崎市学園木花台西1-1)

<sup>3</sup>宮崎大学工学部社会環境システム工学科 (〒889-2192 宮崎市学園木花台西1-1)

\* E-mail:suzuki@civil.miyazaki-u.ac.jp

### 1. はじめに

2011年3月11日に発生した東日本大震災によって関東・東北地方では、120箇所の下水処理施設が被害を受け、そのうち48箇所が稼働停止し、63箇所が一部停止した<sup>1)</sup>。特に、東北沿岸域の下水処理施設は壊滅状態となり、懸命の応急復旧がなされたが、従前の放流水の水質は悪く、放流先の海域への水質悪化が懸念された<sup>2)</sup>。下水処理の機能が失われた場合、最も問題と考えられるのが病原微生物による汚染である。病原微生物は、下水に含まれるその他の有機物、窒素およびリン等と比較して、希釈されても潜在的な感染リスクはそれほど低減されない。したがって、震災等で被災した下水処理施設が本復旧するまでの間に暫定的な消毒技術が必要である。そこで、日光照射に着目した。

日光照射は、病原微生物や化学物質による汚染がある試料水を太陽光の下で暴露することによって、除去することができる消毒方法である<sup>3)</sup>。日光照射は、電力を必要とせず、他の消毒法と比較して安価であり、かつ化学物質の副生物質発生を抑制することができる。光による消毒法の主流は紫外線照射であり、多数の情報と知見が集積され、技術も確立されている。一方、自然光である日光の照射を利用した病原微生物の不活化に関する情報は一部に限られている<sup>3,4)</sup>。さらに、抗菌薬に耐性を獲得した薬剤耐性菌が我が国の水環境から検出されており<sup>5,6)</sup>、日光照射によって不活化、あるいは生残する細菌の特性を評価することは公衆衛生の安全を図る上で重要である。

本研究では、消毒前の二次処理水を採取し、日光照射によってふん便指標細菌である大腸菌群、大腸菌、および腸球菌の消毒効果について調査した。また、日光照射によって生残する腸球菌種と薬剤感受性について試験を行い、細菌の生残性と薬剤耐性の関連性を検討した。

### 2. 実験方法

#### (1) 試料採取と実験材料

試料は2013年1月25日にA下水処理場から未消毒の二次処理水を採取した。採取した試料は実験室に持ち帰った後、直ちに日光照射実験を開始した。なお、用いた二次処理水の水質は以下の通りである：pH 7.4、濁度49度、電気伝導度1.2 mS/cm。

#### (2) 日光照射実験および採水条件

5 Lの透明ポリスチレン製容器の底部に照度計(アレック電子, MDS-MKV/L)を固定し、二次処理水を貯留した後、太陽光下に静置した。静置後、日光による照射時間が1時間経過するごとに容器内を攪拌して採水した。また、日光照射による細菌の減衰を比較するため、対照試料として日光を完全に遮断した試料(Dark)を太陽光下に静置し、実験終了後に採水した。日光照射は水中の照度計により光量子束密度( $\mu\text{mol/s/m}^2$ )を測定し、Thimijanらの変換公式を用いて、放射照度( $\text{W/m}^2$ )に変換し、細菌の不活化率を評価した<sup>7)</sup>。なお、日光照射時間は5時間とした。

#### (3) 細菌の計数

##### a) 大腸菌群と大腸菌

大腸菌群と大腸菌の計数は、特定酵素基質法であるColilert-18 (IDEXX)で実施した。試料水は蒸留水で所定倍率希釈し、希釈した検水 100 mL に試薬を加え、専用のトレーに注いだ後、37 °C で 18 時間培養した。培養後、黄色に変化したウェルを大腸菌群陽性、UV365 nm を照射して青白く発光したウェルを大腸菌陽性と判定した。陽性を示したウェル数から、大腸菌群と大腸菌を最確数(MPN/100 mL)で求めた。

## b) 腸球菌

腸球菌の計数は、メンブランフィルター法によって実施した。試料水は、メンブランフィルター（孔径 0.45  $\mu\text{m}$ , Advantec）で吸引ろ過した。そのフィルターを腸球菌選択培地である membrane-Enterococcus Indoxy- $\beta$ -D-Glucoside 寒天培地 (mEI 培地) 上に置き、 $41 \pm 0.5$   $^{\circ}\text{C}$  で 24 時間培養した。培養後にフィルター上で生育した青色コロニーを腸球菌として計数した。試料水の腸球菌数は、3 連のものを平均し、その平均値を腸球菌数 (CFU/100 mL) とした。計数後、フィルター上に形成した青色コロニーを、Todd Hewitt 寒天培地 (寒天 1.5%, Difco) に画線塗沫し、 $37$   $^{\circ}\text{C}$  で 24 時間培養した。腸球菌は、各照射時間の試料からランダムに最大で 50 株、50 株に満たない場合は任意の株数を単離した。培養後、生育した単一コロニーを以下の試験に用いた。

## (4) 腸球菌株の菌種同定法

腸球菌株の同定は、腸球菌の中でも特にヒトの腸管内から単離される *Enterococcus faecalis* と *Enterococcus faecium* をターゲットとして実施した。*E. faecalis* と *E. faecium* の同定には 16S rRNA を対象とした各プライマー Efs-F (5'-GCCACTATTTCTCGACAGC-3'), Efs-R (5'-GTCGTCCCTTTGGCAAATAA-3'), Efm-F (5'-GAAAAACAATAG AAGAATTAT-3'), Efm-R (5'-TGCTTTTTTGAATTCTTCTTTA-3') を用いて、PCR 反応を行った<sup>8,9)</sup>。反応液には、12.4  $\mu\text{L}$  の滅菌蒸留水、4.0  $\mu\text{L}$  の 5 $\times$ HF Buffer (FINNZYMES), 0.4  $\mu\text{L}$  の dNTP Mix (各 0.3 mM, FINNZYMES), 各 1.0  $\mu\text{L}$  のプライマー (0.5  $\mu\text{M}$ ), 0.2  $\mu\text{L}$  の DNA ポリメラーゼ (1.25U, FINNZYMES), 1.0  $\mu\text{L}$  のテンプレート DNA を加え、全量を 20  $\mu\text{L}$  とした。反応条件は変性処理を  $98$   $^{\circ}\text{C}$  で 4 分間の変性処理後、変性処理を  $98$   $^{\circ}\text{C}$  で 5 秒間、アニーリングを  $62$   $^{\circ}\text{C}$  (*E. faecalis*) あるいは  $54$   $^{\circ}\text{C}$  (*E. faecium*) で 5 秒間、および伸長反応を  $72$   $^{\circ}\text{C}$  で 30 秒間とし、35 サイクル行った。その後、最終伸長反応を  $72$   $^{\circ}\text{C}$  で 5 分間行った。PCR 反応後、1.5% アガロースゲルで電気泳動を行い、エチジウムブロマイドで染色して PCR 産物 (*E. faecalis* : 518 bp, *E. faecium* : 215 bp) を確認した。

## (5) 最小発育阻止濃度 (MIC) 試験

MIC 試験は、日本化学療法学会が定めた寒天平板希釈法に従って行った<sup>10)</sup>。各対象薬剤は、アンピシリン (ABPC)、ピペラシリン (PIPC)、ペンシジルペニシリン (PCG)、テトラサイクリン (TC)、イミペナム (IPM)、エリスロマイシン (EM)、およびバンコマイシン (VCM) とした (和光純薬)。MIC 測定範囲は、ABPC, PIPC, PCG, IPM, EM は  $0.25$ - $128$   $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、TC と VCM は  $0.25$ - $256$   $\mu\text{g}/\text{mL}$  とした。なお、各抗生物質の判定は Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) に従った<sup>11)</sup>。

## 3. 結果と考察

### (1) 日光照射によるふん便指標細菌の生残性

図 1 に、日光照射による各ふん便指標細菌の減衰曲線を示す。大腸菌群、大腸菌、および腸球菌は、放射照度が増大するに伴って減衰した。日光照射前と日光照射 5 時間後を比較すると、日光照射によって大腸菌群、大腸菌、および腸球菌の菌数は、それぞれ 2 オーダー減少した。そこで、各ふん便指標細菌を 99% 不活化するために必要な放射照度をそれぞれ推定した結果、大腸菌群は  $16.4$   $\text{MW}/\text{m}^2$ 、大腸菌は  $9.1$   $\text{MW}/\text{m}^2$ 、腸球菌は  $8.2$   $\text{MW}/\text{m}^2$  となった。大腸菌と腸球菌は通常の晴天時において、4 時間の日光照射により 99% の不活化が期待できることが分かった。一方の大腸菌群は、大腸菌や腸球菌と比較して不活化し難く、99% 不活化するために必要な放射照度は約 2 倍となった。なお、日光を遮断した試料 (Dark) は、5 時間後においても各ふん便指標細菌数は変化しなかった。

### (2) 日光照射による腸球菌種の存在割合の変化

日光照射後に生残した腸球菌について、ヒト腸管内から主に単離される腸球菌種である *E. faecalis* と *E. faecium* の存在割合の変化を調べた。表 1 に、日光照射時間ごと

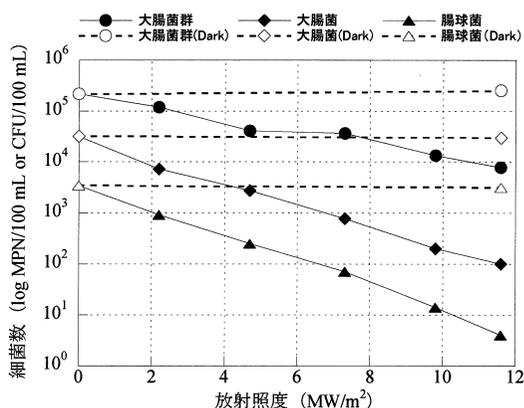


図1 日光照射による各ふん指標細菌の減衰曲線

表1 各日光照射時間に採取した試料における *E. faecalis* と *E. faecium* の存在割合の変化

照射時間	放射照度	腸球菌株の同定	
		単離菌株数	<i>E. faecalis</i> <i>E. faecium</i>
(hour)	(MW/m²)	(株)	単離株数 (% , 割合)
0	0	50	18 (36%) 27 (54%)
1	2.2	50	0 41 (82%)
2	4.7	30	0 24 (80%)
3	7.3	30	0 22 (73%)
4	9.8	30	0 28 (93%)
5	12	20	0 17 (85%)
Dark	0	30	4 (13%) 16 (53%)

に採取した試料における *E. faecalis* と *E. faecium* の存在割合の変化を示す。日光照射前の試料における腸球菌種は *E. faecium* (54%) と *E. faecalis* (36%) であり、*E. faecalis* と *E. faecium* が混在し、主要種は *E. faecium* であった。しかしながら、日光を照射した 1 時間後 (放射照度: 2.2 MW/m<sup>2</sup>) の試料から *E. faecalis* は検出されず、*E. faecium* (82%) が検出された。さらに、放射照度を増加させた場合においても、*E. faecium* のみ 70%以上の割合で検出された。一方、日光を遮断した試料には *E. faecalis* (13%) が存在していたことから、*E. faecium* と比較して、*E. faecalis* は日光によって不活化され易いことが示唆された。逆に、*E. faecium* は放射照度を増加させても、高い割合で生残していたことから、日光照射による消毒効果が低いと考えられる。

### (3) 日光照射による薬剤耐性腸球菌の変化

表 2 に日光照射前と 5 時間後の試料、ならびに日光を遮断した試料 (Dark) から単離した腸球菌株の MIC 試験の結果を示す。試験に供した 82 株の腸球菌は、PIPC (95%)、EM (93%)、および TC (16%) の抗菌薬に対して耐性を示した。また、日光照射前と日光を遮断した試料には、3 つの抗菌薬に耐性を示す多剤耐性腸球菌が存在した。

図 2 に各条件の試料における薬剤耐性腸球菌の割合を示す。日光照射 5 時間後の試料における耐性菌の割合は、2 剤耐性が 80%、1 剤耐性が 20%であり、抗菌薬に耐性を有する *E. faecium* の生残が確認された。日光照射前の試料から検出された 3 剤耐性の *E. faecalis* は、照射 5 時間後には検出されなかったことから、日光照射によって多剤耐性菌に対する消毒効果が認められた。日光照射の前後において、各抗菌薬に対する感受性が変化したことから、菌数の不活化率ならびに薬剤耐性菌の生残性の両面から日光照射の消毒効果を評価する必要がある。

## 4. まとめ

- (1) 日光照射によって下水処理水 (未消毒) の大腸菌群、大腸菌、および腸球菌は不活化される。
- (2) 各ふん便指標細菌を 99%不活化するために必要な放射照度は、大腸菌群は 16.4 MW/m<sup>2</sup>、大腸菌は 9.1 MW/m<sup>2</sup>、腸球菌は 8.2 MW/m<sup>2</sup>であった。
- (3) *E. faecalis* は放射照度が 2.1 MW/m<sup>2</sup>以上では検出されなかったのに対し、*E. faecium* は 12 MW/m<sup>2</sup>においても検出され、*E. faecium* の日光照射への生残性は高い。
- (4) 下水二次処理水中には、薬剤耐性腸球菌が存在し、日光照射 5 時間後においても、2 剤耐性を示す *E. faecium* が 80%存在した。

表2 各日光照射時間における試料から単離した腸球菌のMIC試験結果

照射時間 (hour)	種	単離総株数 (割合, %)	菌株数 (株)	ABPC	PIPC	PCG	TC	IMP	EM	VCM
0	<i>E. faecalis</i>	18 (40%)	1							
			5							
			7							
			5							
	<i>E. faecium</i>	27 (60%)	1							
			22							
			4							
5	<i>E. faecium</i>	17 (100%)	2							
			4							
			11							
Dark	<i>E. faecalis</i>	4 (20%)	2							
			2							
	<i>E. faecium</i>	16 (80%)	1							
			9							
			1							
			2							
			3							

□ …感受性 □ …中度耐性 □ …耐性

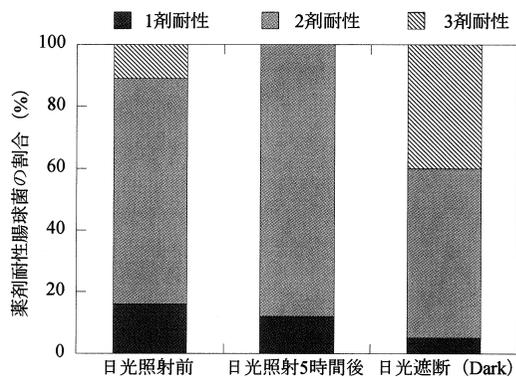


図2 日光照射による薬剤耐性腸球菌の変化

## 参考文献

- 1) 国土交通省, 「下水道地震・津波対策技術検討委員会報告書」のとりまとめについて, <http://www.nilim.go.jp/lab/bcg/kisyajournal/kisyajournal20120518>.
- 2) 田中宏明, 片山浩之, 山下尚之 (2012) 東日本大震災後の下水中病原微生物管理に向けた取り組み, 環境技術, 41 (8), 466-471.
- 3) Caslake, L. F., et al. (2004) Disinfection of contaminated water by using solar irradiation, *Appl Environ Microbiol*, 70 (2), 1145-1150.
- 4) Davies-Colley, R. J., et al. (1994) Sunlight inactivation of enterococci and fecal coliforms in sewage effluent diluted in seawater, *Appl Environ Microbiol*, 60 (6), 2049-2058.
- 5) Suzuki, Y., et al. (2013) Susceptibility of pseudomonas aeruginosa isolates collected from river water in Japan to antipseudomonal agents, *Sci Total Environ*, 450-451, 148-154.
- 6) 寺田翔, 三宅英美, 浦瀬太郎 (2012) 異なる水環境から単離した大腸菌の抗生物質耐性プロファイル, 水環境学会誌, 35 (5), 73-80.
- 7) Thimijan, R. W., et al. (1983) Photometric, radiometric, and quantum light units of measure: a review of procedures for interconversion, *Hort. Sci*, 18 (6), 818-822.
- 8) Liu, D., et al. (2005) PCR amplification of species-specific putative transcriptional regulator gene reveals the identity of *Enterococcus faecalis*, *Res. Microbiol*, 156, 944-948.
- 9) Jackson, C. R., et al. (2004) Use of a genus- and species-specific multiplex PCR for identification of enterococci, *J. Clin. Microbiol*, 42, 3558-3565.
- 10) 抗菌薬感受性測定法検討委員会最終報告 (2007) 日本化学療法学会誌, 56, 49-56.
- 11) Clinical Laboratory Standards Institute (2007) 27 (1), M100-S17.