

下水処理過程における薬剤耐性細菌の挙動に対するオゾン処理の影響

Effect of ozonation on the behavior of antibiotic resistant bacteria in sewage treatment process

○越川博元

龍谷大学先端理工学部

論文要旨

近年、薬剤耐性細菌が環境中に見出されている報告が多い。薬剤耐性細菌はヒトの腸管から排出され、下水処理場を経て環境中に放出される。そこで【実験1】として、消毒処理における多剤耐性菌の挙動を比較した。【実験2】として、大腸菌の形質転換に対するオゾン処理の影響を実験的に示すことを目的とした。本実験の結果は、実処理場でのオゾン処理により、処理水中の細菌に対して形質転換が促進されることを示し、薬剤耐性細菌などが非意図的に生成される可能性を示唆している。

In this study, we compared the behavior of multidrug-resistant bacteria in disinfection treatment as experiment 1. In experiment 2, we tried to demonstrate the effects of ozone treatment on the transformation of *E. coli* experimentally. The results of these experiments indicate that ozone treatment in an actual treatment plant promotes the transformation of bacteria in the treated water, suggesting the possibility of unintentional generation of drug-resistant bacteria.

キーワード：下水処理水、抗生物質耐性細菌、オゾン消毒

1. はじめに

近年、薬剤耐性細菌が環境中に見出されている報告が多い。薬剤耐性細菌はヒトの排泄にもなつてその腸管から排出される経路が考えられる。このように排出された薬剤耐性細菌は下水とともに下水処理場において処理され、その処理水が河川に放流されることから、下水処理場の処理過程における薬剤耐性細菌の挙動は重要な知見である。当研究室では、下水処理過程における多剤耐性菌の挙動について調査してきており、オゾン消毒後の耐性菌比率の上昇に注目してきた。そこで【実験1】として、消毒処理における多剤耐性菌の挙動を比較した。すなわち、消毒処理操作の前前で採水して持ち帰り、実験室で処理場と同様の条件で消毒処理をおこない、多剤耐性細菌、および前菜菌数を計数し、比較検討した。選択した抗生物質は、イミペネム (IPM、 β -ラクタム系：細胞壁合成阻害)、シプロフロキサシン (CPFX、ニューキノロン系：核酸合成阻害)、およびアミカシン (AMK、アミドクリコシド系：タンパク合成阻害) とした。さらに、【実験2】として、抗生物質感受性である大腸菌 (*E. coli* JM109) と、アンピシリン耐性遺伝子をもつプラスミド (pUC19) をモデルとし、大腸菌の形質転換に対するオゾン処理の影響を実験的に示すことを目的とした。

2. 実験方法

【実験1】

公共下水道である2カ所の処理場にて、採水を複数回おこなった。対象とした下水処理場はいずれもステップ流入式多段硝化脱窒法、および酸素活性汚泥法を併用しており、初沈流出水は分流してそれぞれの反応タンクに流入する。終沈後の消毒にはオゾン処理、または塩素処理を用いており、それ

ぞれの反応タンクからの二次処理水が合流した後に消毒処理に供される。処理場では消毒処理の直前で採水し、試料水は滅菌したプラスチック容器に入れ氷冷した状態で実験室に持ち帰った。

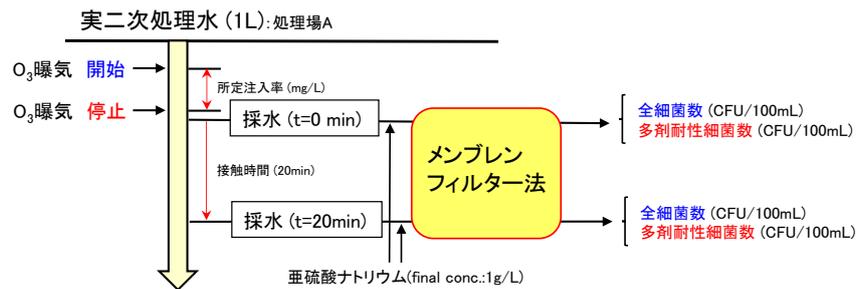


図1 【実験1】実験の流れ（室内実験，オゾン処理の場合）
 処理場で採水した二次処理水

に対して以下の手順で室内実験を行った。すなわち、予め残留塩素濃度を測定した次亜塩素酸ナトリウム水溶液を実処理場と同等レベルの注入率になるように、採水した二次処理水に添加した。また対照実験として、採水したままの二次処理水、注入率を変化させた場合の条件も設定し、全細菌数および多剤耐性細菌数を計測した。同様に消毒処理としてオゾンを用いている下水処理場から二次処理水を採水した場合には、これに対して実験室内でオゾン曝気をおこなった。オゾン注入率または残存オゾン濃度を実施レベルとなるよう複数設定し、オゾン曝気の前と曝気中止から20分後の全細菌数と多剤耐性細菌数とを測定し、比較した。

細菌数の計測には、メンブレンフィルター法を用いた。培地はミューラーヒントン培地とし、30°Cで20～24時間培養した時点で形成されたコロニー数をカウントした。試料水は滅菌生理食塩水で適宜希釈して、同法に適用した。IPM、CPF、およびAMKは、それぞれ最終濃度が16μg/mL、4μg/mL、および32μg/mLとなるように3剤を混合して添加し、抗生物質存在下で得られたコロニー数を多剤耐性細菌数とした。また、対照として抗生物質を添加していない培地に生育するコロニー数を、全細菌数とした。

【実験2】

下水処理場における、細菌の形質転換に対するオゾン消毒の影響について、次の仮説を提案した。すなわち、オゾン処理によって、細菌が破碎され菌体内の遺伝子が水中に放出される状態と細胞に傷を受けた細菌が水中に存在する遺伝子を取り込む状態が起こる、という仮説を設定した。

そこで本研究では、まず滅菌生理食塩水にプラスミド供与大腸菌(アンピシリン耐性)を懸濁し、一部を採水(プラスミド供与菌①)した。この菌懸濁液1Lに対してオゾン添加量が2mg-O₃/Lとなるようオゾン曝気をおこない、曝気終了から20分間攪拌して採水(オゾン曝気後②)をした。引き続き孔径0.2μmのメンブレンフィルターでろ過し、残存したプラスミド供与大腸菌などを除去した。ろ液にプラスミド受容菌(アンピシリン感受性=非耐性)として*E. coli* JM109株を懸濁して一部を採水(プラスミド受容菌添加③)したのち、二分した。一方には、先と同様にオゾン添加量が2mg-O₃/Lとなるようオゾン曝気をおこない、曝気終了から20分間攪拌して採水(オゾン曝気④)をした。他方には、対照実験として酸素ガスを同量曝気したのち、採水(酸素曝気⑤)した。

採水した試料それぞれについて、アンピシリン耐性菌のみ、アンピシリン耐性菌および感受性菌数をメンブレンフィルター法で計測した。

3. 結果と考察

【実験1】

図1 (1)は2014年7月22日に採水し、塩素処理を実験室内で行った結果を、(2)は実験室でのオゾン処理の結果を示した。塩素処理の場合も処理をおこなうことで全細菌数は減少し、多剤耐性細菌数

も減少するものの、多剤耐性細菌率は増加する傾向が見られた。消毒処理によって多剤耐性細菌は比較的減少しにくい、あるいは感受性細菌が多剤耐性化する可能性が考えられ、「非意図的な」細菌の発生が示唆された。

【実験 2】

滅菌生理食塩水にプラスミド供与菌(*E. coli* JM109/pUC19)を懸濁した時点では、全細菌 3.4×10^6 CFU/100mL に対して 83.9% がアンピシリン耐性菌であった。オゾン曝気後、ほぼ全てが耐性菌のみとなったが、全細菌数は当初の 0.6%までに減少した。0.2 μ m のメンブレンフィルターでろ過した後、プラスミド受容菌(アンピシリン感受性)を添加したことにより、全細菌数に対する耐性菌の比率は 2.0%になった(プラスミド受容菌添加③)。続くオゾン曝気後には、全細菌数が 28%に減少する一方で、その全細菌数に対する耐性菌の比率は平均 63%になった(オゾン曝気④)。対照実験である酸素曝気では、全細菌数は 57%に減少したが、そのうち耐性菌は平均 12%を占めていた。

耐性菌率について有意水準 5%の両側検定の *t* 検定をおこなったところ、 $t(2)=6.23$ 、 $p<0.05$ で有意差が認められた。すなわち、オゾン処理によって形質転換が促進されたことがわかった。

4. 結論 本実験の結果は、実処理場でのオゾン処理により、処理水中の細菌に対して形質転換が促進されることを示しており、薬剤耐性細菌などが非意図的に生成される可能性を示唆している。

5. 謝辞 本研究は、龍谷大学卒業生である

森本吏さんと長澤和希さんを中心に、当研究室卒業生の多くの協力を得ました。謝して記します。

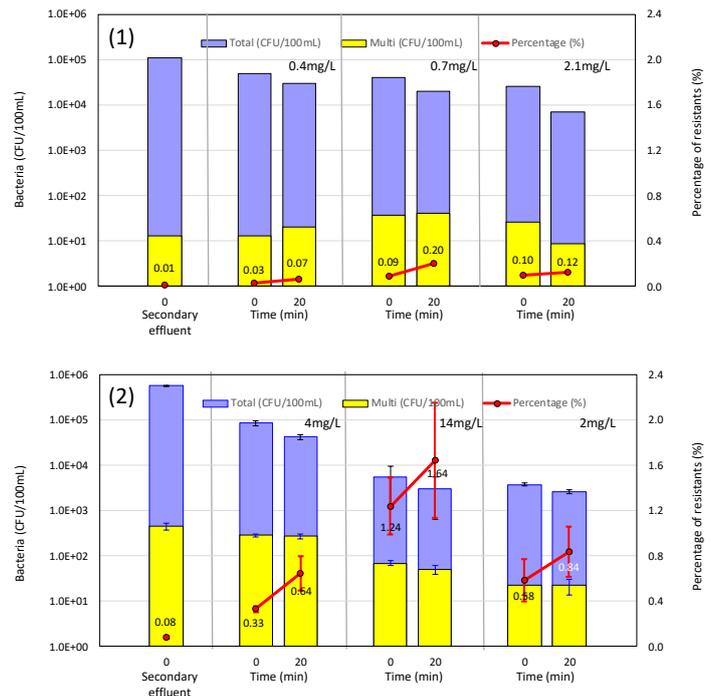


図 2 消毒処理の細菌数に対する影響 (室内実験)
【実験 1】 (1) 塩素処理 (2) オゾン処理

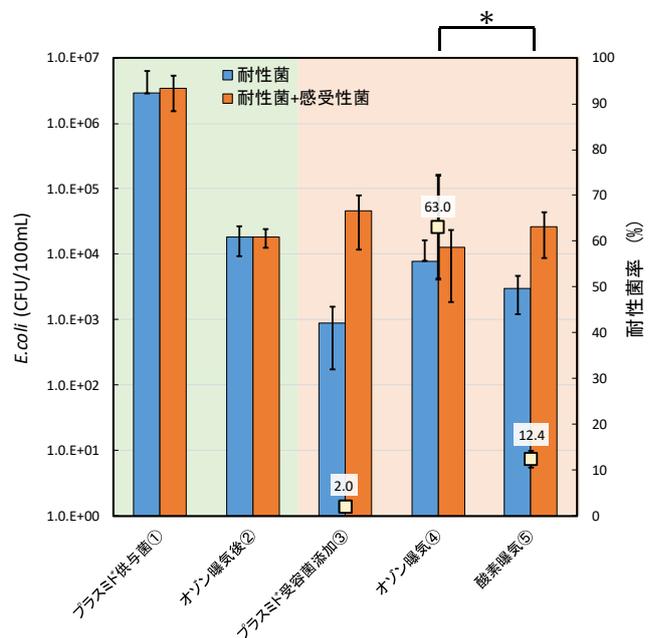


図 3 大腸菌の形質転換に対するオゾン処理の影響
【実験 2】 プラスミド存在下におけるオゾン処理