(1) Characterisation of microbial communities and quantification of antibiotic resistance genes in Italian wastewater treatment plants using 16S rRNA sequencing and digital PCR

Bonanno, G., Bonomo, C., Brandtner, D., Mancini, P., Veneri, C., Briancesco, R., Coccia, A. M., Lucentini, L., Suffredini, E., Bongiorno, D., Musso, N., Stefani, S. and La Rosa, G. *Science of The Total Environment*, **993**, 173217, 2024.

Reviewed by R. Kashima

下水処理場 (WWTP) は、公衆衛生を保全する重要な施設である。しかし、処理後の放流水中に薬剤耐性菌 (ARB) や薬剤耐性遺伝子 (ARGs) が生残することが明らかとなっており、WWTP 管理の課題となっている。本研究では、WWTP における ARB や ARGs を包括的に評価するために、処理方法の異なる 3 つの WWTP (WWTP1, 2, 3) において季節ごとにモニタリング調査を行った。各 WWTP から 3 か月ごとに流入水と放流水を採取した。夏期は処理プロセスが異なるため、夏期においては消毒前の処理水もサンプルとして採取した。各試料をフィルターで通水し、フィルターから DNA を抽出した後、16S rRNA の V3-V4 領域を対象に菌叢解析を行った。また、WHO が公表している Bacterial priority pathogens list をもとに、優先病原細菌を検出した。さらに、dPCR を用いて 6 種の ARGs (*sul 1*, *tet A*, *bla*_{TEM}, *bla*_{OXA48}, *bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{KPC}) とインテグロン (*int 1*) の定量を行った。

菌叢解析の結果、流入水と放流水から、それぞれ 43 属と 71 属の細菌属が検出され、流入水と比較して、消毒後の放流水の方が細菌の多様性の高いことが明らかとなった。また、同定された細菌のうち、流入水と放流水から、それぞれ 6 属と 7 属の優先病原細菌が検出され、それぞれ相対存在量の 21.8%と 15.5%を占めた。*Acinetobacter* 属は最も高い割合で検出され、流入水と放流水で、それぞれ 15.5%と 8.7%であった。dPCR の結果、すべての放流水から 6 種の ARGs が検出されており、環境中に拡散していることがわかった。処理方法の違いによって ARGs の処理性能は異なり、WWTP 1 における *tet A*, *bla*_{TEM}, *bla*_{OXA48}, ならびに WWTP3 における *bla*_{TEM}, *bla*_{OXA48}, *bla*_{CTX-M-1} の年平均存在量は、下水処理プロセスによって有意に減少した。しかし、*bla*_{KPC} の年平均存在量は、全ての WWTP において有意に増加した。ARGs の除去効果は季節ごとでも異なっており、WWTP 1 と 2 では、それぞれ夏期と冬期において全ての ARGs が増加した。一方の WWTP 3 では、夏期において *bla*_{KPC} を除く全ての ARGs が大きく減少した。以上のことから、処理方法の違いや季節によって ARGs の除去効果が異なっていることが示された。また、本研究によって、下水処理による ARGs の除去効果は限定的であることが示唆された。

(2) Insight into the phylogeny and antibiotic resistance of *Pseudomonas* spp. originating from soil of the Białowieża National Park in Northeastern Poland

Lewandowska, W., Mahillon, J., Drewnowska, J. M. and Swiecicka, I.

Frontiers in microbiology, **16**, 1454510, 2025.

Reviewed by K. Owada

抗菌薬の使用による薬剤耐性菌の増加は、国際的な問題となっている。特に、*Pseudomonas* 属細菌は抗菌薬に対する自然耐性を有し、さらに水平伝播によって薬剤耐性遺伝子を獲得することが報告されている。しかしながら、*Pseudomonas* 属細菌の薬剤耐性に関する研究は、病院内における報告が多く、自然環境由来の *Pseudomonas* 属細菌の薬剤耐性に関する知見は乏しい。そこで本研究では、人為的影響が少ない自然環境由来の *Pseudomonas* 属の薬剤耐性プロファイルを明らかにし、環境株と臨床株の関連性について解析した。試料は、ポーランドの国立公園において、40 地点から地表の深さ 10 cm の土壌サンプルを採取した。土試料 1 g を抗菌薬含有 LB 液体培地で培養し、培養液を抗菌薬（主に streptomycin）含有 Mueller-Hinton で培養することで薬剤耐性菌を選択した。生育したコロニーを単離後、基質特異性と遺伝子解析（16S rRNA, gyrB）によって菌種を同定した。そして、抗菌薬名に薬剤耐性を示した *Pseudomonas* 属細菌に対し、さらに 24 種類の抗菌薬に関する最小発育阻止濃度（MIC）試験を実施し、薬剤耐性プロファイルを取得した。また、PCR 法によって 3 種の薬剤耐性関連遺伝子（ampC, extrusion protein MATE family, RND efflux system, outer membrane lipoprotein）を検出した。

いくつかの土壌サンプルから *Pseudomonas* 属細菌が 41 株分離され、それらの菌種は *P. fluorescens* (25 株), *P. psychrophila* (1 株), *P. koreensis* (5 株), *P. putida* (10 株) の 4 系統に分類された。また、MIC 試験の結果から、全ての分離株が 13 種類の抗菌薬に対し、3 種類以上耐性を有する多剤耐性菌であることが確認された。これは、全ての分離株から抗菌薬排出タンパク質の生成に関わる遺伝子である extrusion protein MATE family が検出されたことに起因すると考えられる。また、*P. fluorescens* 系統では、全ての株から ampC が検出され、そのうちの 9 株から RND efflux system, outer membrane lipoprotein が検出された。さらに、臨床上極めて重要な抗菌薬であるイミペネムに耐性を示す細菌が 17% (7/41 株) 検出され、全てが *P. fluorescens* 系統に分類された。人為的影響がほとんどない環境においてもイミペネム耐性菌が検出されたことから、*P. fluorescens* 系統は、祖先や進化的経路を共有していることが示唆された。一部の環境由来株では、これらの結果から、土壌は、細菌や遺伝子が蓄積地として機能している可能性がある。