

第 218 回雑誌会

(Jun. 9, 2015)

(1) Occurrence, genetic diversity, and persistence of enterococci in a Lake Superior watershed.

Ran, Q., Badqley, B. D., Dillon, N., Dunny, G. M. and Sadowsky, M. J.

Applied and Environmental Microbiology, **79**, 3067-3075 (2013).

Reviewed by M. Nishiyama

アメリカ五大湖周辺のレクリエーション水域では、ふん便汚染が深刻な問題となっている。米国環境保護庁では、水域のふん便汚染を評価する指標細菌として、大腸菌と腸球菌を採用しているが、腸球菌の環境中における生残性と存在実態に関する情報は一部に限られている。そこで本研究では、ミシガン州に位置するSuperior湖流域を対象として、腸球菌の実態調査を実施した。調査は、2010年と2011年の5月から9月にかけて、Duluth Boat Club (DBC) とKingsbury Creek (KC) で実施した。各調査地点について、以下の地点から試料を採取した：DBC, 水位線から湖側へ5 m離れた水 (W) と直下の底質 (S5) ; 水位線上の湿潤砂 (SL) ; 水位線から陸側へ1 mと8 m離れた湿潤砂 (NS) と乾燥砂 (US) ; KS, 水位線から陸側へ5 mと14 m離れた土壌 (KS5とKS14)。全159試料について、腸球菌を最確数法によって計数するとともに、各試料から菌株を単離した。単離菌株について、主要な腸球菌種 (*Enterococcus faecalis*, *E. faecium*, *E. casseliflavus*, *E. hirae*, *E. mundtii*, *E. gallinarum*, *E. durans*, *E. avium*) を対象としたMultiplex PCR法によって、菌種を同定した。そして、*E. faecalis*と同定された菌株について、horizontal, fluorophore-enhanced repetitive PCR (HFERP) 法によって、DNAの遺伝子型を取得し、腸球菌株の多様性、ならびに生残性を評価した。

全調査地点から採取した159試料のうち、149試料 (93.7%) から腸球菌が検出された。DBCにおける腸球菌は、Wと比較して、湿潤砂であるSLとS5から高濃度で検出された (5~87倍)。DBCとKSの腸球菌数は、温度の高い夏季で増加する傾向を示し、温度との間に相関が認められた (DBC, $r=0.57$; KS, $r=0.51$)。また、菌種を同定した結果、単離した2,441株のうちの97.8%が8つの腸球菌種のいずれかに同定された。各調査地点における腸球菌の主要種は、DBCでは*E. hirae* (36.4%) であったのに対し、KSでは*E. faecalis* (48.8%) であり、地点によって全く異なった。そこで、DBCとKSから単離した309株と227株の*E. faecalis*について、DNAの遺伝子型を調べると、それぞれ108個と46個の遺伝子型が同定され、腸球菌の遺伝子型は極めて多様であった。その一方で、調査期間内で複数回 (2回以上) 同一の遺伝子型が両地点で検出され、KS5とKS14から単離した菌株の23% (52株/227株) は、類似度が97%以上であった。以上のことから、Superior湖流域における腸球菌は、夏季に増加し、一部は長期間砂や土壌中で生残、または増殖している可能性がある。

(2) Impacts of local and global stressors in intertidal habitats: Influence of altered nutrient, sediment and temperature levels on the early life history of three habitat-forming macroalgae

Alestra, T. and Schiel, D.R.

Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, **468**, 29-36 (2015).

Reviewed by S. Hirayama

沿岸域における栄養塩濃度や堆積負荷の増大に起因して、藻場の消失が世界中で報告されている。その一方で、水温上昇などの地球規模での環境変化による藻場への影響は明らかになっていない。特に、栄養塩や堆積物などの局所的な変化と地球規模での変化の複合的な影響を調査した研究例は見当たらない。そこで本研究では、大型藻類の初期段階に及ぼす栄養塩、堆積物、および水温の複合的な影響を調査した。供試生物は、ニュージーランドに広く分布するヒバマタ属の *Hormosira banksii*, *Cystophora torulosa*, および *Durvillaea antarctica* とした。栄養塩の影響は、通常の海水および窒素・リンを補強した海水の2条件について、堆積物の影響は、細砂の有無によって検討した。また、水温の影響は、実環境の温度と実環境の温度から3°C高い温度の2条件に設定した。影響の判定指標は、48時間後に生残する発芽体の個体数、ならびに8週間後の発芽体の生残率と長さとした。さらに、*H. banksii* の試験では、光合成能の指標である最大量子収量を測定した。統計解析は、多元配置分散分析を用いて実施し、各要因の単独の影響を示す主効果と各要因の影響が他の要因によって変化することを示す交互作用について検討した。

堆積物の影響を調査した結果、細砂を添加した場合の *H. banksii* と *C. torulosa* の48時間後の生残個体数は、無添加の場合と比較して、それぞれ70%と15%低下し、堆積物の主効果が認められた ($P < 0.001$)。さらに、細砂を添加した場合、すべての供試生物の8週間後の生残率は、1~4%の低い値で算出され、堆積物の主効果が確認された ($P < 0.001$)。堆積物の被覆によって生残率が著しく低下した要因として、光の供給が妨げられて発芽体の光合成を阻害したことが考えられた。また、*H. banksii* と *C. torulosa* の発芽体の生残率について、堆積物と水温の間に交互作用が認められた ($P < 0.05$)、水温の影響は細砂の有無に依存していた。窒素とリンを補強した海水は、通常の海水と比較して最大量子収量値が25%高く算出され、*H. banksii* の光合成能に対して高栄養塩濃度の影響が認められた。以上の結果から、沿岸域における堆積負荷は、大型藻類の初期段階を支配する卓越した因子であることが示唆された。

第 219 回雑誌会

(Jun. 16, 2015)

(1) Sediment and nutrient dynamics during storm events in the Enxoé temporary river , southern Portugal

Tiago, B. R., Maria, C. G., Maria, A. B., David, B., Sara, R., José-Miguel, S., Sabine, S., Ângela, P., José, C. M., Manuel, L. F., Fernando, P. P.

Catena, **127**, 177-190 (2015).

Reviewed by K. Kihara

地中海性気候に位置するポルトガル南部の Enxoé 川流域では、干ばつ後の降雨イベントによって、農業地からの土砂や栄養塩輸送に起因する貯水池内の富栄養化が問題となっている。しかしながら、汚染物質の輸送と降雨イベントの直接的な関係は、水文・地形学、土地利用や管理、土砂や汚染物質の再運搬などの問題によって複雑化している。特に、降雨に起因して断続的に発生する河川を対象とした、嵐イベント時の土砂や栄養塩の動態に関する研究例は見当たらない。そこで本研究では、農業流域の断続的に形成する河川において、嵐イベントと土砂や栄養塩の輸送の関係について調査した。調査は、2010年9月～2013年10月において、Enxoé 流域の富栄養化が顕在する貯水池の上流地点を対象とし、15分間隔で河川の水位および濁度のモニタリングを実施した。さらに水質測定のため、嵐イベント時と平水時において、合計176の試料を採水した。水質測定項目は、濁度、浮遊懸濁物質濃度 (SSC)、全リン (TP)、粒子状リン (PP)、溶存反応性リン (SRP)、および硝酸性窒素 (NO_3^-) の濃度とした。各成分の輸送量は、マニングの式を用いて水位データから見積った流量に、土砂や栄養塩の濃度を乗じて輸送量を見積った。

調査期間における SSC, TP, PP, SRP, および NO_3^- の濃度は、以下のように推移した: SSC, 1.6~3790.1 mg/L ; TP, 0.05~11.4 mg/L ; PP, 0~7.6 mg/L ; SRP, 0~0.67 mg/L ; NO_3^- , 0~27.84 mg/L。SSC, TP, および PP 濃度は、長期的な干ばつ後の最初の嵐イベントにおいて最大値を示した。流量から年間の総水量を見積ったところ、嵐イベントにおける割合は、年間の16~43%程度と低かった。しかしながら、嵐イベントにおける SS と TP の輸送量は、年間の60~92%を占めており、多くが嵐イベント時に輸送されていると見積られた。これに対して、 NO_3^- の輸送量は、干ばつ後の嵐イベント時に最大値を示したものの、年間の総輸送量に占める割合は17~20%と小さく、平水時に高い傾向を示した。以上の結果から、SS と TP は、干ばつの期間、あるいは平水時において河床に蓄積され、嵐イベントによって、貯水池へと輸送されることが考えられた。その一方で、 NO_3^- の輸送に対する嵐イベントの影響は小さく、総水量の多い平水時に輸送されることが考えられた。

(2) Diurnal variation in *Enterococcus* species composition in polluted ocean water and a potential role for the enterococcal carotenoid in protection against photoinactivation

Maraccini, P. A., Ferguson, D. M., Boehm, A. B.

Applied and Environmental Microbiology, **78**, 305-310 (2012).

Reviewed by M. Uno

腸球菌は、沿岸域のふん便汚染を評価する指標細菌として、広く用いられている。しかしながら、海水中の腸球菌は、日光照射に伴って生成する活性酸素種、または日光中の UV-B (280~320 nm) による DNA の損傷に起因して不活化する。現在までに、活性酸素種消去能を有する、カロテノイド色素を保有した腸球菌株が報告されているが、カロテノイド色素と光不活化の関係性は明らかとなっていない。そこで本研究では、アメリカのカリフォルニア州に位置するビーチの海水を対象として、カロテノイド色素保有した腸球菌の存在ならびに日中・夜間の菌種構成を調査した。試料水は、2008年8月の3日間、毎時1回採取し、mEI培地を使用して菌株(690株)を単離した。その後、菌種はAPI 20Sで同定し、TSA培地を使用して可視的に着色しているコロニーをカロテノイド色素保有菌とした。菌種構成の評価は、類似度行列分析(ANOSIM)によって実施した。さらに、海水環境の模擬実験を行い、腸球菌が保有するカロテノイド色素と、光不活化の関係性を評価した。なお、供試菌株は、*E. faecalis* (カロテノイド色素無)、*E. faecalis* AB (カロテノイド色素有)、*E. casseliflavus* (カロテノイド色素有)とした。

単離した690株のうち、563株(82%)が腸球菌と同定された。*E. faecalis*と*E. faecium*は、日中と比較して、夜間に多く検出された。その一方で、*Enterococcus* spp. (*E. casseliflavus*, *E. durans*, *E. cecorum*, *E. mundtii*)は夜間と比較して、日中に多く検出された。菌種構成について、日中・夜間の間に有意差($P=0.002$)が認められた。このことから、日光照射は、海水中での菌種構成に影響を与える因子であることが示唆された。また、腸球菌563株のうち、88株(16%)がカロテノイド色素を保有していた。カロテノイド色素を保有する腸球菌は、日中・夜間の間に有意差($P<0.0001$)が認められ、日中に多く検出された。さらに、海水環境の模擬実験を行った結果、*E. faecalis*, *E. faecalis* AB, および*E. casseliflavus*の不活化率はそれぞれ、 -0.1 ± 0.005 /min, -0.08 ± 0.006 /min, および -0.06 ± 0.007 /minであり、カロテノイド色素を保有した腸球菌は、日光照射による不活化率が有意に低下した($P<0.05$)。

以上の結果から、カロテノイド色素は、日光照射による腸球菌の不活化に影響を与える因子であることが示唆された。

(3) Characterization of different food-isolated *Enterococcus* strains by MALDI-TOF mass fingerprinting

Qulntela-Baluja, M., Böhme, K., Fernández-No, I. C., Morandi, S., Alnakip, M. E., Caamaño-Antelo, S., Barros-Velázquez, J. and Calo-Mata, P.

Electrophoresis **34**, 240-2250 (2013).

Reviewed by K. Niina

腸球菌 (*Enterococcus*) は、ヒトを含むほ乳類の腸管内に存在する常在菌であり、臨床、河川、および食品などの分野で検出される。中でも、*Enterococcus faecalis* と *Enterococcus faecium* は、院内感染の原因菌として挙げられる。腸球菌の菌種同定試験は、16S rRNA 遺伝子を対象としたシーケンシング解析をはじめとする分子生物学的手法が用いられているが、操作が煩雑であり時間と労力も必要である。そこで本研究では、たんぱく質やペプチドといった生体高分子を測定するイオン化飛行型質量分析計 (MALDI-TOF MS) を用いて、腸球菌の菌種同定試験を行った。菌株は、異なる食品から単離した腸球菌 (*E. faecium*, 12 株 ; *E. faecalis*, 13 株 ; *E. gilvus*, 2 株 ; *E. mundtii*, 2 株 ; *E. sanguinicola*, 2 株 ; *E. malodoratus*, 1 株 ; *E. gallinarum*, 1 株 ; *E. casseliflavus*, 1 株 ; *E. durans*, 1 株 ; *E. hirae*, 1 株) とその他の菌株 8 株とし、合計 44 株を試験に供した。また、腸球菌の 16S rRNA 遺伝子を標的とした塩基配列のシーケンシング解析を行った。マススペクトルとシーケンシング解析から得られた結果は、クラスター分析によって腸球菌種の識別精度を比較した。

全ての腸球菌株は、質量電荷比 4426 ± 1 にピークが検出された。その一方で、その他の種菌株からは検出されなかった。また、菌種別にみても *E. faecalis* と *E. faecium* は、それぞれ質量電荷比 7330 ± 3 と 5946 ± 5 にピークが検出された。これらのピークは、他の腸球菌種から検出されず、種レベルにおける特異的なバイオマーカーであることが示唆された。さらに、*E. mundtii*, *E. sanguinicola*, *E. gilvus*, *E. durans*, *E. casseliflavus*, *E. gallinarum*, および *E. malodoratus* は、それぞれ質量電荷比 3896, 2706, 6632, 5751, 8187, 7592, および 2957 に特異的なピークが検出された。これらの菌種は、供試菌株数が少なかったため、菌株数をさらに増やして特異的なピークの妥当性を評価する必要がある。16s rRNA 遺伝子解析におけるクラスター分析の結果、*E. faecalis* は、単独のクラスターを形成した。しかし、その他の腸球菌種は塩基配列における類似度が高く、区別されなかった。その一方で、マススペクトルによるクラスター分析では、菌種ごとにクラスターを形成した。以上のことから、MALDI-TOF MS は、迅速かつ正確に腸球菌を同定することが可能であり、菌種ごとに特異的なマススペクトルを有していることが示唆された。

第 220 回雑誌会

(Jun. 23, 2015)

(1) Species sorting and seasonal dynamics primarily shape bacterial communities in the Upper Mississippi River

Staley, C., Gould, T. J., Wang, P., Phillips, J., Cotner, J. B. and Sadowsky, M. J.

Science of the Total Environment, **505**, 435-445 (2015).

Reviewed by K. Teranishi

近年、一度に多種の細菌を同定することのできる次世代シーケンサーが開発され、環境中（土壌、下水）の細菌叢解析が実施されている。しかしながら、河川中の細菌叢を分析した研究例は存在しておらず、季節変化に伴う細菌叢の動態も不明である。そこで本研究では、次世代シーケンサーを用いた菌叢解析を実施し、時間、空間（源流からの距離）、および環境要因の変化によって、河川水中の菌叢に及ぼす影響を評価した。調査は、ミネソタ州に位置するミシシッピ川の上流から下流に至る 11 地点を対象として、2010 年から 2012 年（5 月～8 月）にかけて実施した。各調査地点について、河川水と堆積土をそれぞれ採取し、合計 65 試料とした。採取した試料から細菌の DNA を抽出し、次世代シーケンサー（Illumina）を用いて遺伝子解析を実施した。得られた細菌遺伝子は既存のデータベースを基に分類し、Operational Taxonomic Unit (OTU) で表した。なお、環境要因の項目として、降雨量、水温、pH、全炭素、硝酸性窒素、全リン、および不純物総溶解度（TDS）を測定した。

11 地点の河川水から得られた細菌遺伝子は、平均して 1481 ± 252 OTUs であった。その一方で、堆積土から得られた細菌遺伝子は、平均して 4728 ± 523 OTUs であり、堆積土中の細菌遺伝子数は、河川水中の細菌遺伝子数と比較して約 3 倍高かった。2010 年と 2012 年における河川水中の菌叢の優占種は *Burkholderiales* であったのに対し、2011 年では *Pseudomonadales* が優占種となった。次に、各地点の細菌叢の割合を比較してみると、2011 年では上流、2012 年では中流域において、*Pseudomonadales* の割合が高かった（20%～45%）。これらのことから、河川水中の細菌叢の割合は、時間経過、および地点間によって変化することが示唆された。また、河川水中の細菌叢を各月で比較すると、7 月から 8 月に採取した試料の群集構造は、2011 年から 2012 年に渡って同一であった。細菌叢の変動と環境要因の各測定項目との関係を調査した結果、細菌種の 88.4%（*Betaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Alphaproteobacteria*, *Verrucomicrobia*, および *Cyanobacteria*）は、降雨量と水温による影響を強く受けた。以上のことから、河川水中の細菌叢は時間、空間、および環境要因の影響によって、変動することが明らかとなった。

(2) Long-term performance of liter-scale microbial fuel cells treating primary effluent installed in a municipal wastewater treatment facility

Zhang, F., Zheng, G., Grimaud, J., Hurst, J and He, Z.

Environmental Science and Technology, **47**(9), 4941-4948 (2013).

Reviewed by T. Hirai

現在、微生物燃料電池（Microbial fuel cells, MFCs）における研究は、小規模で回分式のものが多い。そのため、実用化段階へと発展させるには、連続式の大規模 MFCs で長期運転を行なう必要がある。そこで本研究では、ミルウォーキーに位置する都市排水処理施設において、カソードに白金（10%）が含有している MFC-Pt（platinum）と含有していない MFC-AC（activated carbon）を 400 日間以上運転させ、処理性能、発電量、および処理に必要な消費電力量を調べた。MFC-Pt と MFC-AC には、カソード、陽イオン交換膜、およびアノードの順に重ねた筒状の電極（容量 2 L）を 2 つずつ搭載した U 字型の管状 MFC を用いた。水理学的滞留時間は 11 時間とし、MFC-Pt と MFC-AC の外部抵抗は、それぞれ 0-57 日目に 5 Ω、58-104 日目に 10 Ω と設定した。MFC の処理性能を評価するため、以下の箇所からサンプルを採取した：陽極溶液、下水が管状 MFC を通過した流出水：陰極溶液、陽極溶液の一部をカソードに通水した流出水。測定項目は、発電量、化学的酸素要求量（Chemical oxygen demand, COD）、アンモニア態窒素、亜硝酸態窒素、リン酸態リン、硝酸態窒素、全懸濁物質、有機性懸濁物質、大腸菌群、ケルダール窒素、濁度、および溶存酸素とした。

MFC-Pt と MFC-AC における陰極溶液は、下水と比較して、それぞれ COD 濃度が 90%以上減少した。また、陽極溶液の全窒素は減少しなかったが、陰極溶液では、全窒素の減少が確認された。さらに、陰極溶液に残存している全窒素についてみると、硝酸態窒素が大部分を占めた。そこで、MFC-AC に陰イオン交換膜を用いた MFC（アノード容量、0.86 L；カソード容量、1.4 L）を接続し、全窒素の変化を調べた。その結果、硝酸態窒素は減少し、全窒素の除去率は 76.2%となった。MFC-Pt と MFC-AC の発電量は、それぞれ 0.0255 kWh/m³ と 0.0239 kWh/m³、電力消費量は、それぞれ 0.0238 kWh/m³ と 0.0147 kWh/m³ であり、MFC を稼働させるための電力消費量を上回った。しかしながら、MFC-Pt において、電子供与体である炭素から最終電子受容体である硫酸塩および電極へ移動した電子の割合は、それぞれ 37.2% と 13.2% であった。このことから、炭素から移動した電子は、主に硫酸塩の還元で使用されていることが示唆された。

第 221 回雑誌会

(Jun. 30, 2015)

(1)スリランカの異なる気候条件下におけるチャーノッカイトの風化変質過程

スターリン フェルナンド, 北川 隆司, 地下 まゆみ

粘土科学 **40**(3), 185-196 (2000).

レビュー：板清 智也

紫蘇輝石花崗岩（チャーノッカイト）が広く分布するスリランカは、地質構造的に安定していることから、熱水作用や地質構造的な岩石破壊をほとんど受けない。したがって、スリランカの表層付近における岩石の分解は、気温や降水などの気候変動による化学的風化作用に限られる。しかしながら、スリランカにおける岩石の風化メカニズムについての報告は非常に少ない。そこで本研究では、スリランカの年平均雨量が異なる3つの地域（Wet zone, 3000 mm 以上；Intermediate zone, 2000～3000 mm；Dry zone, 2000 mm 以下）を対象として、気候条件の違いによる岩石の変質過程への影響について評価した。試料は、各地点の表層を除く露頭からそれぞれ採取し、計39試料とした。全試料は、粉末X線回折（XRD）分析によって含有鉱物を同定した。また、化学分析（XRF）を実施し、風化によって生成された鉱物とそれらの鉱物学的特徴について検討した。さらに、XRF分析による鉱物組成から風化度指数（Chemical Index of Alteration, C.I.A）を算出し、地域ごとの風化の程度について評価した。なお、C.I.Aの評価基準は以下のように定義した：未風化岩石, 50以下；スメクタイト, 70～80；カオリナイトおよびハロイサイト, 100。

XRD分析によって3つの地域における含有鉱物を同定した結果、主要な含有鉱物は以下のように同定された：Wet zone, カオリナイト；Intermediate zone, ハロイサイト；Dry zone, スメクタイトとバーミキュライト。一般的に、ハロイサイトは風化の進行に伴って、カオリナイトに変化することが知られている。このことから、Wet zoneとIntermediate zoneにおける粘土鉱物は一般的な風化過程を辿ると考えられた。一方、Dry zoneにおける含有鉱物をみると、スメクタイトの減少に伴って、カオリナイトが増加する傾向を示した。このことから、降水量の少ない地域では、風化過程初期にスメクタイト等のアルカリ金属を含む粘土鉱物が形成した後に、カオリナイトが形成されたと考えられた。XRF分析による各地域の最も風化が進行した地点について、C.I.Aを算出したところ、Dry zoneからIntermediate zone, Wet zoneの順にC.I.Aが高い傾向を示した。最も風化が進行したWet zoneでは、多くの地点においてC.I.A値が100に近い値を示した。このことから、降水量の多い地域ほど岩石に接する水のpHが低く、アルカリ金属の溶脱が促進されることによって、風化が進行していることが明らかとなった。以上のことから、スリランカに広く分布する花崗岩は、気候条件の違いによる風化の影響によって明確に異なることが明らかとなった。

(2) 淀川水系における抗生物質、溶存態 DNA の挙動と抗生物質耐性菌の特性

越川 博元, 滝 さやか, 井口 彩, 小幡 倫大, 田中 宏明

水環境学会誌 **31**(11), 651-657 (2008).

レビュー：今福 夕貴

菌体外 DNA とは菌体細胞外に単独で存在している DNA のことである。近年、水環境中において、抗生物質の使用量増加に伴う薬剤耐性菌の増加、および薬剤耐性遺伝子を保有する菌体外 DNA の存在が問題となっている。そこで本研究では、河川流下過程における抗生物質、細菌、および溶存態 DNA の挙動について調査した。さらに、複数の抗生物質に対する薬剤耐性菌の多剤耐性化を評価した。なお、本研究では孔径 0.2 μm のフィルターを通過した菌体外 DNA を溶存態 DNA と定義した。調査は、2006 年 9 月 6 日に桂川、宇治川、木津川、および三川合流地点以降の淀川における計 40 地点（うち下水処理水放流水は 8 地点）を対象とした。各地点における河川水について、レボフロキサシン (LVFX) とクラリスロマイシン (CAM) の定量を行った。加えて、細菌（大腸菌群、ふん便性大腸菌群）の計数、溶存態 DNA、および溶存態 DNA に由来するアンピシリン (ABPC) 耐性遺伝子の定量を行った。また、2007 年 12 月 6 日に、宮前橋、下水処理場放流水（5 ヶ所）、宇治川御幸橋、および南郷洗堰の計 8 地点を対象に、薬剤耐性菌（一般細菌）の計数を行った。多剤耐性化の評価には、ABPC, LVFX, カナマイシン (KM), クロラムフェニコール (CP), およびバンコマイシン (VCM) の 6 種の抗生物質を使用した。

各地点における川水と下水処理場放流水中の大腸菌群数の平均値は、それぞれ 4.4 cfu/mL, 4.5 cfu/mL であり、大きな違いみられなかった。その一方で、河川水におけるふん便性大腸菌群の平均値は、下水処理場放流水と比較して 2.9 倍多かった。下水処理場放流水中の LVFX と CAM の濃度を測定した結果、それぞれ 353 ng/mL, 107 ng/mL であり、河川水と比較して高かった。しかし最小発育阻止濃度よりも低い濃度であるため、河川水中の細菌が LVFX によって死滅する可能性は低いと考えられた。また、宇治川と淀川の溶存態 DNA 量は一定であったが、ABPC 耐性遺伝子を有する溶存態 DNA 量は流下に伴い減少していた。このことから、遺伝子としては流下過程において分断・分解されていることが示唆された。さらに、河川水と下水処理場放流水中から単離した薬剤耐性菌の多剤耐性化について評価した結果、LVFX に耐性を示した細菌は、他の抗生物質に対しても高い耐性を示した。このことから、LVFX 耐性菌の挙動を考慮することが必要であると考えられた。以上のことから、淀川水系中の溶存態 DNA が細菌の薬剤耐性化をひき起こす可能性は極めて低いものの、複数の抗生物質に耐性を持つ細菌の存在が認められた。

(3) 食品検体の腸管出血性大腸菌 O157・O26 汚染一次スクリーニング用 Multiplex PCR 法の開発

徳永 暁彦, 大澤 朗, 伊豫田 淳, 寺嶋 淳, 渡辺 治雄

日本食品微生物学会誌 26(1), 7-15 (2009).

レビュー: 上田 卓矢

我が国における腸管出血性大腸菌 (enterohemorrhagic *Escherichia coli*, EHEC) による食中毒発生事例のうち, 約 9 割は EHEC O157 と O26 によるものである。現在, 食品からの EHEC O157 と O26 の検査法は, 志賀毒素遺伝子 (*stx*) 検査法によるスクリーニング実施後, 陽性菌株について, 分離培養法による EHEC O157 および O26 の判別を行う。そのため, EHEC O157 および O26 以外の志賀毒素産生性大腸菌 (Shiga toxin-producing *E.coli*; STEC) が多く検出され, 検査効率の低下が考えられる。そこで本研究では, EHEC O157 および O26 の, 特異的遺伝子である *toxB* に着目して, EHEC O157 および O26 を識別する Multiplex PCR 法の開発を試みた。供試菌株は, EHEC 60 株 (O157; 39 株, O26; 7 株, O103; 4 株, O111; 6 株, O121; 4 株), STEC 4 株, および腸管病原性大腸菌 (enteropathogenic *E.coli*; EPEC) O55 6 株の合計 70 株とした。各菌株に対して, PCR 法による *toxB* 遺伝子異同解析を行い, シークエンス解析によって EHEC O157 と EHEC O26 が保有する *toxB* の塩基配列を比較した。その後, 設計したプライマーを用いた Multiplex PCR 法を用いて, 人為的に EHEC 株を接種した食品検体 (牛ミンチ, 牛レバー, 貝割れ大根) からの EHEC O157 と O26 の感度試験および検出試験を行った。

PCR 法による異同解析によって, *toxB* が EHEC O157 と O26 に特異的な遺伝子であることが確認された。EHEC O157 と EHEC O26 が保有する *toxB* の塩基配列は, 相同性が高いものの, 塩基置換レベルの差異が認められた。また, Multiplex PCR 法の特異性検証では, EHEC O157 と O26 はそれぞれ, 369 bp, 621 bp において特異な増幅バンドが確認され, EHEC O157 と O26 の検出率は 100%であった。このことから, EHEC O157 と O26 は増幅バンドの大きさの違いによって, 識別できることがわかった。次に, 食品検体からの EHEC O157 と O26 の感度試験を行ったところ, Multiplex PCR 法による各食品培養液の検出限界濃度は, EHEC O157 と O26 のいずれも 10^5 CFU/mL であった。さらに, 検出試験では, 接種した検体からは PCR 産物が検出されたが, 未接種の検体からは検出されなかった。

以上のことから, 今回開発した Multiplex PCR 法は, 食品検体における O157 および O26 を検出する一次スクリーニング法として, 有用であることが示唆された。

第 222 回雑誌会

(Jul. 7, 2015)

(1) 下水処理施設への新たな衛生学的指標導入に関する検討

山下 洋正, 重村 浩之, 藤井 都弥子, 小越 眞佐司

平成 25 年度下水道関係調査研究年次報告書集 **823**, 31-37 (2015).

レビュー: 太田 優治

現在, 我が国における水環境中の環境基準や下水道の排水基準として, 大腸菌群が用いられている。しかしながら, 大腸菌群は土壌などの自然由来の細菌も含まれることから, ふん便汚染の指標としての妥当性の低さが懸念されている。このことから, 大腸菌を大腸菌群の代替指標とするために水環境中における実態調査や新たな基準値の検討が進められている。そこで本研究では, 消毒前の下水処理水中と下水放流水中における, 大腸菌の存在実態, 季節・時間変動, および異なる計数方法を用いて細菌数への影響を調査した。また, 同一のサンプルを複数の測定機関と測定者の違いによって大腸菌数と大腸菌群数への影響を調査した。調査は, 平成 23 年度から平成 25 年度に関東地方の下水処理場を対象とし, 最確数法, 平板培養法, および疎水性格子付メンブレンフィルター (HGMP) 法を用いて大腸菌と大腸菌群を計数した。

消毒前の下水処理水中の大腸菌数と大腸菌群数は, 調査期間を通じてほぼ一定であり, 異なる計数方法による各細菌数の違いは認められなかった。その一方で, 下水放流水中の大腸菌数と大腸菌群数は, 夏季と比較して冬季において減少傾向を示したが, 異なる計数方法によって各細菌数に違いが認められた。また, 試料中の各細菌数が 10^3 (CFU/100mL, MPN/100mL) 以下であった場合, 最確数法と HGMP 法と比較して, 平板培養法では検出下限値以下となる結果が多かった。このことから, 試料中の細菌濃度が低濃度の場合, 細菌の計数方法に最確数法と HGMP 法が適していることが示唆された。測定機関および測定者の違いによる影響を調査した結果, 消毒前の下水処理水中の大腸菌数は平板培養法と HGMP 法を用いた場合, 各測定機関の測定値のオーダーは同程度であった。その一方で, 最確数法を用いた場合, ばらつきは大きい傾向を示した。このことから, 計数方法についても考慮する必要があることが示唆された。下水放流水中における大腸菌数の測定機関, 測定者による計数結果は, いずれも 10 (CFU/100 mL, MPN/100 mL) 以下であった。また, 大腸菌群数に対する大腸菌数の割合は, 下水流入水中, 下水処理水中, および下水放流水中において, それぞれ 30~40%, 20~30%, 10%以下であった。このことから, 下水の処理過程が進むにつれて, 大腸菌群数に占める大腸菌数の割合は, 低下する傾向を示した。以上の結果から, 消毒前処理水と消毒後放流水における大腸菌の存在実態, 季節・時間変動, および測定機関, 測定者のばらつきの傾向が明らかとなった。

(2)下水処理施設放流水中の残留塩素に着目した毒性同定評価

山本 裕史, 矢野 陽子, 森田 隼平, 西家 早紀, 安田 侑右, 田村 生弥
鑑迫 典久

土木学会論文集 G (環境), 69, 375-384(2013).

レビュー：中田 光紀

現在、各施設から排出される放流水の評価・管理には、化学物質の複合的な影響が考えられていない。そのため環境省では、現行の水質環境基準や排水基準を補完するために「生物応答試験を用いた排水管理手法」の導入を検討している。しかしながら、生物応答試験を実排水に適用した例は少なく、特に短期慢性毒性試験の適用は数例に限られる。そこで本研究では、未処理の排水と前処理を施した排水について、全排水毒性 (WET) 試験法に基づいた水生生物 3 種の短期慢性毒性試験を実施した。試料は、徳島県内の公共下水道の終末処理場 (施設 A) と住宅団地の排水処理場 (施設 B, C) の 3 カ所から放流水を採水した (施設 A のみ 2 回実施)。採取した試料は、ろ過、チオ硫酸ナトリウム ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) 添加、および固相抽出カラム Oasis HLB 通水の 3 条件で前処理を実施し、それぞれを試験に用いた。供試生物は、ゼブラフィッシュ、ニセネコゼミジンコ、およびムレミカヅキモとした。生物応答試験は、実施当時に環境省で検討中であった試験法に従って実施した。毒性値は、Dunnett 多重比較検定を用いて、最大無影響濃度 (NOEC) を算出した。

ゼブラフィッシュを用いた試験では、9 日間後の孵化率と仔魚致死率を算出した結果、施設 B と C の排水には毒性が認められなかった。これに対して、施設 A の排水は 1 回目と 2 回目で、仔魚致死率に対するろ過のみの試料の NOEC がそれぞれ排水濃度 5% 未満と 40% と算出され、毒性が認められた。しかしながら、2 回目の試料に $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ を添加した場合、仔魚致死率の NOEC は 80% より高いと算出され、毒性が低下した。さらに、8 日後のミジンコの致死率と産仔数を調査したミジンコ繁殖試験においても、施設 C の排水で $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 添加による毒性低下の傾向が認められた。このことから、施設 A と C から放流される排水の毒性は、残留塩素に依存しており、 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ を添加することによって残留塩素が還元処理され、無害化したと考えられた。ムレミカヅキモを用いた試験において、72 時間後の生長阻害率を求めた結果、施設 C の排水は、排水濃度 20% において、藻類の生長阻害率が 100% であった。このときの生長阻害率に対する NOEC は、20% 未満と算出された。その一方で、 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ を添加した試料では、毒性が低減し、NOEC は 80% より高いと算出された。以上の結果から、本研究で対象とした排水の毒性原因は残留塩素であり、 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ を添加することによって、その毒性を低減させることが可能となる。

(3)マトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析法による火落ち菌の迅速同定

孫 麗偉, 寺本 華奈江, 鳥村 政基, 佐藤 浩昭, 田尾 博明

分析化学 **56**(3), 1071-1079 (2007).

レビュー：松脇 知典

「火落ち菌」は、*Lactobacillus* 属の乳酸菌として定義されており、清酒の貯蔵において増殖し、風味を損なう原因菌とされている。火落ち菌の同定には、16S rRNA や 23S rRNA 遺伝子の塩基配列に基づいた相同性解析を用いているが、煩雑な前処理や数日程度の解析時間が必要である。このことから、清酒の品質管理および汚染源の特定のためには、細菌を迅速かつ簡便に同定する手法の開発が望まれている。そこで本研究では、微生物菌体中に存在するリボソームタンパク質を測定するマトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析法 (MALDI-MS) を用いて、火落ち菌の迅速同定を行った。菌株は、代表的な火落ち菌として知られる *Lactobacillus* 属の乳酸菌 5 種 (*L. fructivorans*, *L. hilgardii*, *L. paracasei* subsp. *paracasei*, *L. paracasei* subsp. *tolerans*, *L. rhamnosus*) を理化学研究所から購入し、標準株としてデータベースを作成した。また実試料は、国内酒造メーカーから提供された火落ち菌とし、作成したデータベースと比較して菌種同定を行った。なお、測定範囲は、質量電荷比 6000~12000 とした。

醸造所の火落ち菌のマススペクトルとデータベースを比較すると、*L. fructivorans*, *L. hilgardii*, *L. paracasei* subsp. *paracasei*, *L. paracasei* subsp. *tolerans*, および *L. rhamnosus* において、それぞれ 1 本, 0 本, 17 本, 14 本, および 7 本の共通した質量電荷比でピークが確認された。このことから、醸造所の火落ち菌は、*L. fructivorans* および *L. hilgardii* ではないと考えられる。また、標準株として用いた、*L. paracasei* subsp. *paracasei*, *L. paracasei* subsp. *tolerans*, および *L. rhamnosus* は、質量電荷比 11100~11700 の範囲において、それぞれ質量電荷比 11231, 11321, および 11533 の異なる位置にピークを検出した。これらのバイオマーカーに着目して、醸造所から提供された火落ち菌と比較してみると、*L. paracasei* subsp. *paracasei* のバイオマーカーのみとピークが一致した。このことから、醸造所の火落ち菌は、*L. paracasei* subsp. *paracasei* であると推察された。さらに、この火落ち菌について、16S rRNA 遺伝子の塩基配列 (552bp) を解読すると、*L. paracasei* subsp. *paracasei* と *L. paracasei* subsp. *tolerans* が 100%の相同性を示し、MALDI-MS の同定結果とほぼ一致した。以上のことから、MALDI-MS による解析法は、従来の遺伝子解析法と比較して迅速であり、清酒の品質管理や汚染源の特定に有効な手段であると考えられた。

第 223 回雑誌会

(Jul. 14, 2015)

(1) Effect of in-feed administration and withdrawal of tylosin phosphate on antibiotic resistance in enterococci isolated from feedlot steers.

Beukers, A. G., Zaheer, R., Cook, S. R., Stanford, K., Chaves, A. V., Ward, M. P. and McAllister, T. A.

Frontiers in Microbiology, **6**, doi:10.3389/fmicb.2015.00483 (2015).

Reviewed by M. Nishiyama

マクロライド系抗生物質であるリン酸タイロシンは、畜牛の肝膿瘍発症を抑えるため飼料中に投与される。現在、家畜飼料への継続的な抗生物質の使用は、薬剤耐性菌の発生に寄与すると考えられている。そこで本研究では、ほ乳類の腸管内に常在する腸球菌を対象として、リン酸タイロシンの投与による腸球菌のマクロライド耐性化を調査した。調査は、カナダの肥育場における去勢雄牛を対象として、リン酸タイロシンの混合飼料を与えた雄牛 (T11, 試料中のリン酸タイロシン濃度: 11 ppm) と、未混合飼料を与えた雄牛 (CON) について実施した。各条件の雄牛について、以下の経過日数にふん便試料を採取した; 0, 14, 49, 84, 113, 141, 169, 197, および225日。なお、197日以降はT11への抗生物質の使用を中止した。経過日数ごとに、採取したふん便試料について腸球菌を計数した。通常の選択培地に加えて、エリスロマイシンとタイロシンの濃度がそれぞれ、8, 32 µg/mLに調節した選択培地 (BEA^E, BEA^T) を使用して、エリスロマイシン耐性 (ery^R) とタイロシン耐性 (tyl^R) 腸球菌を併せて計数した。各選択培地から菌株を単離し、*groES-EL* 領域の配列情報から、腸球菌種を同定した。同定した腸球菌株について、薬剤感受性試験とマクロライド耐性遺伝子 (*ermB*) の有無を判定し、PFGE法によって遺伝子型の類似性を評価した。

調査期間におけるT11とCONのふん便中の腸球菌数は、 $10^3 \sim 10^5$ CFU/gの範囲で推移した。T11におけるふん便中のery^Rとtyl^R腸球菌の割合は増加し、113, 141, 169, および197日では、CONと比較して有意に高かった ($P < 0.001$)。その一方で、使用を中止した28日後 (225日) のery^Rとtyl^R腸球菌の割合は、197日と比較して減少し、CONと有意差は認められなかった ($P > 0.05$)。各選択培地から単離した519株の菌種を同定したところ、83.0% (431株) が *Enterococcus hirae* であった。BEA^EとBEA^Tから単離した98株の *E. hirae* について薬剤感受性試験を実施した結果、エリスロマイシンとタイロシンに対して耐性を示した菌株はそれぞれ、42株と69株であった。このうち、*ermB* 遺伝子を保有した *E. hirae* 69株の遺伝子型を取得したところ、投与開始前 (0日) と開始後の遺伝子型は極めて類似した。以上のことから、リン酸タイロシン投与の有無によって、マクロライド耐性腸球菌は増減するものの、一部の耐性菌は既に腸管内に定着していることが明らかとなった。

(2) Inter-population comparisons of copper resistance and accumulation in the red seaweed, *Gracilariopsis longissima*

Brown, M. T., Newman, J.E. and Han, T.

Ecotoxicology, **21**(2), 591-600 (2012).

Reviewed by S. Hirayama

水生生物の中には、同一種の個体であっても生息地点の金属汚染度の変化によって金属に対する耐性に違いを生じる生物が存在する。現在までに、沿岸域の主要な一次生産者である海藻について、同一種の個体間での金属に対する耐性の変化を調査した研究例は見当たらない。そこで本研究では、銅濃度の異なる地点から採取した紅藻 *Gracilariopsis longissima* の銅に対する耐性と銅の蓄積・放出能力を室内実験ならびに現地実験によって調査した。供試生物の *G. longissima* は、イギリス南西の Mylor, St. just, Flushing, Helford, および Chesil の 5 地点から採取した。7 日間で 15 日間で室内実験を実施した。7 日間の室内実験は、4 月と 10 月の 2 回実施し、5 地点から採取した個体を対照区と 5 濃度区の銅試験液に暴露して相対生長率を算出した。さらに、相対生長率から NOEC, LOEC, EC₅₀, および EC₂₀ を算出した。15 日間の室内実験では、最初の 7 日間、Mylor と Helford から採取した個体を銅濃度 100 µg/L の試験液に暴露し、7 日目に銅の蓄積量を測定した。その後の 8 日間は、銅無添加の培地で培養し、0, 1, 5, および 8 日目に培地中の銅濃度を測定した。一方、現地実験では、Mylor と St. Just から採取した個体を Mylor と St. Just の 2 地点に、それぞれ移植して 30 日間培養し、実験終了後に銅の蓄積量を測定した。

10 月に実施した 7 日間の室内実験では、すべての濃度区において、5 つの個体間で相対生長率に違いは認められなかった。影響濃度を算出した結果、EC₅₀ と EC₂₀ は、4 月の実験でそれぞれ 31.1 と 12.6 µg/L, 10 月の実験でそれぞれ 25.8 と 11.3 µg/L と算出され、実験の実施期間で有意な違いは認められなかった。15 日間の室内実験において、銅濃度の高い Mylor と銅濃度の低い Helford で採取した各個体の 7 日目の銅蓄積量は、それぞれ 231 と 216 µg/g と見積もられ、両者に有意な違いは認められなかった。その後、銅無添加の培地で 8 日間培養したところ、培地中の銅濃度は、どちらも 8 日目に約 6 µg/L に上昇した。現地実験において、Mylor と St. Just から採取した個体の 30 日間での銅蓄積量は、Mylor で培養した場合、それぞれ 16.3 と 16.5 µg/g, St. Just で培養した場合、それぞれ 6.2 と 4.7 µg/g であった。このことから、同一種の個体間に違いは認められず、銅濃度の高い Mylor で培養した場合に蓄積量が高くなる傾向を示した。以上の結果から、*G. longissima* の銅に対する耐性と銅の蓄積・放出能力は、同一種の個体間で変化しないことがわかった。

第 224 回雑誌会

(Jul. 21, 2015)

(1) Field and laboratory studies of *Escherichia coli* decay rate in subtropical coastal water

Chan, Y. M., Thoe, W., Lee, J. H. W.

Journal of Hydro-environment Research, **9**, 1-14 (2015).

Reviewed by M. Uno

大腸菌は、水環境中におけるふん便汚染の指標として広く用いられている。しかしながら、水環境中における大腸菌の生存は、複雑な環境要因の影響を受ける。したがって、沿岸水中における大腸菌の動態の把握は、沿岸域の水質管理をする上で極めて重要である。そこで本研究では、室内実験において光強度、水温、および塩分濃度に対する大腸菌の不活化率の関係を調査し、沿岸水中における大腸菌の減衰速度を推定するモデル式を作成した。試料は、香港の Big Wave Bay Beach の海水に下水処理場放流水が全体の 2% (v/v) となる滅菌済み混合水に、大腸菌を接種し、試料中の大腸菌濃度を $10^4 \sim 10^5$ cfu/100 mL に調整した。実験槽に貯留した試料は、擬似日光を照射後、一定時間ごとに大腸菌数を測定した。得られた測定結果から、4 つの変数（水温、塩分濃度、光吸収係数、放射強度）を用いて、沿岸水中における大腸菌の減衰速度を推定するモデル式を作成した。また、香港の Big Wave Bay Beach を対象として、降雨イベント前 (d_{-1})、降雨イベント時 (d_0)、および降雨イベント後 (d_1) において大腸菌のモニタリング調査を実施した。なお、Big Wave Bay Beach への主要なふん便汚染源は、降雨時に流入する河川水である。

日光を遮断した場合、塩分濃度 13 ppt または 33 ppt とした試料中の大腸菌の減衰速度はそれぞれ、0.85/day と 1.50/day であった。その一方で、日光照射を行った場合、塩分濃度 13 ppt または 33 ppt とした試料中における大腸菌の減衰速度はそれぞれ、14.7/day と 107/day であった。このことから、沿岸水中の大腸菌の不活化には、日光照射が大きく寄与していることが明らかとなった。さらに、Big Wave Bay Beach において大腸菌のモニタリング調査を行った結果、 d_{-1} 、 d_0 、および d_1 における大腸菌数（塩分濃度）はそれぞれ、970 cfu/100 mL (27.9)、2100 cfu/100 mL (8.1)、280 cfu/100 mL (27.0) であった。このことから、降雨イベント時の Big Wave Bay Beach における大腸菌数は、流入した河川水によって、1 オーダー増加するが、降雨イベント後には日光照射を受けて大腸菌数が減少した。また、得られた実測値とモデル式を用いて大腸菌の減衰速度を算出した結果、2.85/day であった。

以上のことから、沿岸域における大腸菌の生存は、日光照射による影響が大きいことが示唆された。

(2) Temporal variability of suspended Sediment transport and rating curves in a Mediterranean river basin: The Celone (SE Italy)

De Girolamo, A. M., Pappagallo, G. and Lo Porto, A.
Catena, **128**, 135-143 (2015).

Reviewed by K. Kihara

地中海地方に位置する半乾燥気候の河川では、乾季に渇水・干ばつが頻繁に観測される一方で、雨季には突発性の降雨や洪水等の影響から、浮遊懸濁物質の動態は時間的に著しく変動する。そのため、半乾燥気候の河川における浮遊懸濁物質の動態の把握は困難であり、情報は一部に限られている。そこで本研究では、地中海性地方の河川において異なる時間スケールでの浮遊懸濁物質輸送の変動性について調査した。また、流量から浮遊懸濁物質の濃度を推定するための回帰式について検討した。調査は、2010年7月～2011年7月において、イタリア南東部に位置する Celone 川流域の Masseria Pirro を対象とし、15分間隔で河川水位と流速のモニタリングを実施した。また、洪水イベント時、平水時、および低流量時から高頻度で水試料を採取し、計 210 試料とした。全試料について浮遊懸濁物質濃度 (SSC) を測定し、SSC 実測値とした。輸送量は、水位－流量曲線を用いて水位データから算出した流量に、SSC 実測値を乗じて見積った。また、全 210 試料を 3つの流況データ (high flow, normal flow, low flow) に分類し、SSC と流量データから異なる 3種類の回帰式 (累乗関数, 対数変換の線形関数, 対数変換の多項式関数) をそれぞれ算出した。その後、回帰式を用いて流量データから算出した SSC の推定値と実測値との誤差 (%) を求めることによって、回帰式の有用性について評価した。

調査期間における異なる 3つの流況データについて、それぞれ 3種類の回帰式を算出し、SSC の推定値と実測値を比較した結果、high flow データから算出した回帰式は実測値との誤差が小さい傾向を示し、中でも対数変換の多項式関数を用いた場合において平均誤差が最小であった (誤差: 34%)。その一方で、normal flow と low flow データは、いずれの回帰式を用いた場合においても平均誤差が高い傾向を示した (誤差: 104~156%)。SSC の実測値から浮遊物質の輸送量を算出したところ、年間の輸送量は 250~384 t/km²/y の範囲で見積られ、年間の約 94%が high flow の期間において輸送されていた。これに対して、low flow における浮遊物質の輸送量は、全体の 0.1%未満であり、年間の全輸送量に対する low flow 期間の影響は小さいと考えられた。以上のことから、半乾燥地域における河川を対象とした SSC の回帰式の算出には、年間の浮遊物質輸送量の大部分に寄与する high flow データを用いることが有効であると考えられた。

(3) Response of populations in streambed sediment and water column to changes in nutrient concentrations in water

Shelton, M. R., Pachepsky, Y. A., Kiefer, L. A., Blaustein, R. A., McCarty, G. W. and Dao, R. A.

Water Research, **59**, 316-324 (2014).

Reviewed by K. Niina

堆積物は、水環境においてふん便指標細菌や病原性微生物を蓄積し、生残させることが認識され始めている。既往の研究では、堆積物が排水に含まれる栄養塩を取り込むことによって、大腸菌の生残・再増殖に寄与しているとの報告もある。しかしながら、堆積物における栄養塩濃度の変化が大腸菌の再増殖に及ぼす影響に関する知見は、極めて少ない。そこで本研究では、チャンバー内に水柱と堆積物を用いた模擬河川を造り、栄養塩濃度の変化に伴う大腸菌群の生残・再増殖について調査した。模擬実験として、砂質の堆積物と貫流する8つのチャンバー（長さ40 cm, 深さ20 cm, 高さ12 cm）を用いた。また、チャンバーの下には、人工河川水を流し込んだ貯水槽を設置し、貯水槽からホースとポンプを用いてチャンバー内に人工河川水を供給し、河川水を循環させた。栄養源として牛ふん尿を採取し、蒸留水で10%希釈と滅菌を行った後、異なる3つの濃度区（10倍, 20倍, 100倍）に希釈してチャンバー内の堆積物中に添加した。また、コントロールとして純水のみを堆積物中に添加した。実験を開始して16日後には、各チャンバーの貯水槽に同じ希釈倍率の牛ふん尿懸濁液および純水を添加して循環させた。対象細菌は、水柱と堆積物中における大腸菌群、大腸菌、および好気性従属栄養細菌とし、0, 2, 8, 16, 18, 21, 24, および32日目にそれぞれの細菌を計数した。細菌数と測定日数の回帰直線を作成し、直線の傾きを不活化速度係数 K (day^{-1}) として対象細菌の不活化を評価した。

水柱と堆積物中の大腸菌群、大腸菌、および好気性従属栄養細菌の濃度は、栄養源添加直後に増加する傾向を示した。水柱における細菌の濃度は非線形型を示し、10倍希釈の濃度区だけに顕著な変化が認められた。栄養源添加後における堆積物中の大腸菌群濃度は、水柱と比較して最大で3倍高かった。このことから、堆積物は水柱と比較して、大腸菌群および大腸菌を高濃度で蓄積することが明らかとなった。大腸菌群の不活化速度は、水柱と堆積物中ともに栄養源添加前後において大幅な変化が見られなかった。また、堆積物中における大腸菌の不活化速度は、栄養源添加前後においてそれぞれ $K=0.052$ (day^{-1})、 $K=0.040$ (day^{-1}) であり、大腸菌群と同様に、大腸菌の大幅な変化は確認されなかった。以上のことから、今回の模擬河川において、水柱の中に栄養源を添加することによって、細菌の非線形型の変化を引き起こした。また、栄養源添加後における堆積物中の大腸菌は、一時的な増加を示すものの、時間が経過するとともに添加前と同様の速度で減衰していくことが明らかとなった。

第 225 回雑誌会

(Jul. 28, 2015)

(1) The seasonal structure of microbial communities in the Western English Channel

Gillbert, J. A., Field, D., Swift, P., Newbold, L., Oliver, A., Smyth, T., Somerfield, P. J., Huse, S. and Joint, I.

Environmental Microbiology, **11**(12), 3132-3139 (2009).

Reviewed by K. Teranishi

海水中には、膨大な数の微生物が存在している。しかしながら、海水中の微生物群集構造を分析した報告例はほとんどなく、季節的な微生物群集構造の変動を分析した調査は見当たらない。そこで本研究では、パイロシーケンシング技術を用いた微生物群集解析を実施し、季節、ならびに環境要因の変化が、海水中の微生物群集構造に及ぼす影響を評価した。試料は、イギリス海峡を対象として、2007年の2月～10月と12月に採取し、合計12試料を分析に供した。採取した試料から微生物のRNA遺伝子を抽出し、パイロシーケンシング技術を原理としたGS FLX Titanium XLR70 (Roche) を用いて遺伝子解析を実施した。得られた微生物遺伝子は、類似した遺伝子配列を基に分類し、分類単位としてOperational Taxonomic Units (OTUs) で表した。また、環境要因の測定項目は、水温、塩分濃度、硝酸性窒素、アンモニウム、溶存反応性リン (SRP)、ケイ酸塩、全有機窒素、全有機炭素、およびクロロフィルとした。

全12試料から合計182,560の遺伝子配列が読まれ、17,673 OTUsに分類できた。得られた全OTUsのうち、全ての試料から検出されたOTUsの数は、わずかに93 OTUs (0.5%)のみであった。また、この93 OTUsは取得した遺伝子配列全体の54%を占めていた。さらに、分類した全OTUsを既知のデータベースと照合した結果、合計35種の細菌門が同定された。同定された細菌門のうち、高い割合で存在していた上位10種(優占種)の細菌門遺伝子は、全遺伝子配列の99.4%を占めた。このことから、微生物群集構造は、優占種の変動に強く影響を受けることが考えられた。次に、各月の細菌網の割合を比較した結果、8月と9月以外に採取した試料においては、*Alphaproteobacteria* 網が優占種であった。これに対して、8月と9月に採取した試料では、*Bacteroidetes* 網が優占種となった。一方、微生物群集構造と環境要因の各測定項目との関係を調査した結果、主要な細菌種 (*Gammaproteobacteria*, *Alphaproteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Cyanobacteria*) は、水温とSRPの変化による影響を強く受けた。以上のことから、海水中の微生物群集構造は、季節変化に伴う水温とSRPの影響によって変動することが示唆された。

(2) Floating boards improve electricity generation from wastewater in cassette-electrode microbial fuel cells

Miyahara, M., Yoshizawa, T., Kouzuma, A., and Watanabe, K.

Journal of Water and Environment Technology, **13**(3), 221-230 (2015).

Reviewed by T. Hirai

微生物燃料電池 (Microbial fuel cells, MFCs) は、嫌気性微生物の異化作用によって、有機性廃棄物や排水から発電を行う嫌気性処理技術である。その中でも、カセット電極 (Cassette-electrode, CE) MFC は、規模、形状、および個数を容易に変更することが可能な利点がある。しかしながら、CE-MFC をラージスケールで応用した研究では、水面からの酸素混入によって、CE-MFC の発電量が低下するのではないかと予測された。そこで本研究では、水面からの CE-MFC への酸素混入を防止するために、ポリスチレン製フローティングボード (FB) を用いた FB-MFC を作製し、FB を用いていない OA (OA; open to the atmosphere) -MFC との処理性能、発電量、および微生物群集構造を比較した。各条件の MFC は、内容積 1 L で行い、CE をそれぞれ 6 基ずつ、宮原ら (2013) の研究で用いられたスラローム型流路になるよう挿入した。排水には、人工排水 (pH : 7.0, COD 濃度 : 0.5 g/L) を使用し、各 MFC の運転は連続式で行った。また、COD 濃度は、実験期間中に 0.5 mg/L, 0.4 mg/L, 0.2 mg/L, 0.5 mg/L, および 0.2 mg/L の順に変更した。なお、各 MFC の接種源には、水田の土壌を使用した。アノードバイオフィーム上に形成された微生物群集構造は、PCR-DGGE 法によって得られた塩基配列をもとに、FLX システムによって決定し、種を同定した。

運転開始から 20 日目における、FB-MFC の COD 除去効率は、OA-MFC と比較して 10~20% 低い値を示した。しかしながら、30~160 日目では、FB-MFC と OA-MFC の COD 除去効率は、大きな差が認められなかった。運転期間中における FB-MFC の発電量は、OA-MFC と比較して高く、クーロン効率は 5~15% 高かった。また、人工排水の COD 濃度を 0.5 g/L から 0.2 g/L に減少させても、各 MFC の COD 除去効率は変化しなかった。その一方で、OA-MFC の発電量とクーロン効率は、COD 濃度の低下によって、FB-MFC よりも著しく減少した。アノードバイオフィームの微生物群集構造解析を行った結果、各 MFC から鉄還元菌の一種である *Geobacter bemidjiensis* が検出され、FB-MFC のみ偏性嫌気性微生物である *Geothrix fermentans* が検出された。このことから、FB-MFC と OA-MFC における発電量の差は、*Geothrix fermentans* の有無によって生じていると考えられた。以上の結果から、CE-MFC への FB の使用は、安定した嫌気状態を保つことが可能となり、発電量の増加に貢献できると考えられた。

第 226 回雑誌会

(Aug. 4, 2015)

(1) 霞ヶ浦流入河川及び霞ヶ浦の懸濁物質の化学組成と発生のメカニズム

田切 美智雄, 納谷 知規, 長島 万梨映, 根岸 正美

陸水学雑誌 **70**, 87-98 (2009).

レビュー：板清 智也

近年、霞ヶ浦では、懸濁物質の河川からの流入や湖内における流出に起因した白濁現象の発生が問題となっている。しかしながら、懸濁物質の化学組成データが不足しており、収支や運搬についての研究は未だに乏しい。また、流下過程において懸濁物質の化学組成が変化するため、河川ならびに湖内における定期的な調査が求められる。そこで本研究では、霞ヶ浦全域とその流入河川における懸濁物質を高頻度で採取し、懸濁物質の発生、季節変化、ならびに流下過程における化学組成の変化のメカニズムを調査した。調査は、懸濁物質を地点ごとに1年間採取した。調査期間は2005年6月～2007年12月の間とし、計1643試料を採取した。全試料は、蛍光X線(XRF)分析によって、酸化物としての懸濁物質総量(SS_{xrf})と化学元素組成(主成分10元素)を解析した。その後、解析した化学元素組成について、3成分図(SiO₂, Al₂O₃, その他: FeO, MgO, CaO, K₂O, Na₂O, TiO₂, MnO)を作成し、想定される代表的な風化生成物(クロライト, 雲母, 雲母粘土鉱物, カオリン, イライト, モンモリロナイト)の成分組成と比較して、懸濁物質の鉱物を同定した。

懸濁物質の化学元素組成と風化生成物の成分組成を比較した結果、湖水懸濁物質は雲母粘土鉱物と珪藻殻に非常に類似する傾向を示し、季節による成分組成の明瞭な違いは確認されなかった。このことから、湖水懸濁物質は雲母粘土鉱物と珪藻殻に起因していることがわかった。これに対して、湖内に流入する河川懸濁物質についてみると、湖水と同様に雲母粘土鉱物と類似した成分組成を示したが、FeOやCaOなどのその他の酸化物についても高い割合で確認された。また、夏期に河川から採取した懸濁物質において、特に雲母粘土鉱物の組成と類似する傾向を示した。霞ヶ浦流域では、夏期において農業活動が活発であり、田畑からの雲母粘土鉱物の流入が多い。このことから、河川懸濁物質は農業活動による田畑からの雲母粘土鉱物の流入に起因していると考えられた。また、河川から湖内に流入する過程において、懸濁態として浮遊するFeOやCaOはpHが8.2～9.2の湖内においていずれも不溶性沈殿物となる。そのため、湖内において浮遊し続けたまま懸濁物質として存在するFeOやCaOの割合は低くなることがわかった。以上のことから、霞ヶ浦の懸濁物質は、河川からの流入過程における田畑からの雲母粘土鉱物の流入、ならびにpHの変化による沈殿に起因する雲母粘土鉱物と珪藻殻の混合物となることが明らかとなった。

(2) 利根川感潮域における出水期および平水期の細流底質動態と微生物群集特性

坂上 伸生, 郭 永, 箕浦 晴久, 太田 寛行, 佐藤 嘉則, 渡邊 眞紀子, 石川 忠晴
環境科学会誌 **26**(2), 128-139 (2013).

レビュー：今福 夕貴

出水時と平水時で環境が変化する河川感潮域では、底質状態も変化する。底質の細粒画分には無機・有機コロイド粒子が含まれ、水中の物質循環に深く関わっている。しかしながら、河川底質について理化学的ならびに生化学的評価を実施した研究例は少ない。そこで本研究では、底質の有機・無機成分に着目し、出水・平水時の比較を通して有機物量、活性鉄、および無機元素組成について調査した。さらに、微生物分析を実施し、底質の生化学的反応の知見を得た。調査は、利根川河口から河口堰までの汽水区間で実施した。理化学的分析に用いた試料は、河口 2 ~18 km 地点にかけて、2 km 間隔の計 9 地点で採取した。採取時期は、出水直後の 2008 年 9 月と 10 月（移行期）ならびに平水状態の 2009 年 2 月とした。なお底質試料は、下層が黒色化している場合、表層と次表層で区分して採取した。分析項目は、全炭素、全窒素、活性鉄、および全元素（Si, Fe, Al, Ca, K, Ti, Cl, S, Mg, Br）とした。微生物分析に用いた試料は、河口 27 km 地点、河口堰直上部、および河口 4 km 地点から、2010 年 6 月に採取した。採取した細粒底質試料を対象に、細菌 16S rRNA 遺伝子を標的としたクローンライブラリー解析を行った。

2008 年 8 月における利根川の最大流量は 3,800 m³/s 程度であり、出水直後の試料では 2~6 km 地点および 18 km 地点でシルト成分の分布がみられた。移行期以降は、全地点でシルト成分の著しい増加がみられ、平水期には、ほとんどの地点でシルトの割合が 100%となった。また、平水期には、易分解性有機物や活性鉄が 2~6 km 地点および 16 km 地点で増加する傾向が認められた。これは、塩水楔に伴う沈殿、あるいはエスチュアリ循環によって下流から輸送された細粒分が底質に沈殿したためと考えられた。また、微生物分析の結果、計 119 属の細菌が同定された。全 3 地点で共通して検出された微生物は、119 属のうち 8 属のみであり、それぞれの地点で特徴的な微生物群集が形成されていた。全地点で共通する主要細菌網は、*Deltaproteobacteria* であった（約 20~30%）。3 地点とも硫酸還元細菌を含むグループが多く、それらは海側に近づくほど多くなる傾向が認められた。全元素分析の結果、平水時において鉄と硫黄の間に、正の相関が認められたことから、これらの細菌によって発生する硫化水素が、還元的環境下で遊離した 2 価鉄イオンと反応し、硫化鉄を生成すると考えられた。以上のことから、利根川感潮域における底質は、河川流動の影響を強く受けており、各地点で特徴的な微生物群集の形成が明らかとなった。

(3) 酵素基質培地 CHROMagar STEC における志賀毒素産生性大腸菌 (STEC) の発

育性および亜テルル酸カリウム感受性の検討

青木 日出美, 茂谷 美和, 山崎 貢, 祖父江 進, 三輪 良雄, 澁谷 いづみ,
子安 春樹

日本臨床微生物学雑誌 **25**(2), 37-44 (2015).

レビュー: 上田 卓矢

志賀毒素産生性大腸菌 (Shiga toxin-producing *E.coli* ; STEC) O157 の分離培地として, セフィキシムと亜テルル酸カリウムを添加した, CT-SMAC 培地が広く用いられている。しかしながら, 国内外において CT-SMAC 培地に発育しない STEC O157 が報告されている。近年, STEC の分離選択培地として酵素基質培地 (CHROMagar STEC) が開発された。そこで本研究では, CHROMagar STEC を用いて, STEC 株の発育性と亜テルル酸カリウム感受性を調査した。供試菌株は, STEC 123 株 (O157 ; 73 株, O26 ; 21 株, O111 ; 11 株, O103 ; 8 株, O121 ; 6 株, O145 ; 1 株, O165 ; 1 株, その他 ; 2 株), 毒素原生大腸菌 (ETEC) 3 株, およびその他の大腸菌 6 株の合計 132 株とした。亜テルル酸カリウム感受性試験においては, STEC 85 株を含む合計 88 株の最小発育阻止濃度 (MIC) を測定した。さらに, CHROMagar STEC と CT-SMAC の培地上における STEC の発育支持能の比較を行った。

STEC 123 株中, 119 株 (96.7%) が CHROMagar STEC 培地に発育し, このうち 115 株 (93.5%) は, STEC の指標となる藤色集落の形成が確認された。非発育株は, O157 1 株, O165 1 株およびその他の大腸菌 2 株の合計 4 株であった。このことから, STEC O157 検査に CHROMagar STEC を用いた場合, 一部の O157 を検出できない可能性があることがわかった。また, STEC 85 株を用いて, 亜テルル酸カリウム感受性を調査した結果, 7 株 (8.3%) が感受性 (MIC ; $\leq 3.13 \mu\text{g/mL}$) を示し, このうち 1 株は CHROMagar STEC に発育しなかった O157 株であった。さらに, STEC の発育支持能を CHROMagar STEC と CT-SMAC を用いて比較した結果, CHROMagar STEC の発育支持能は, CT-SMAC よりも低い傾向にあることが示唆された。

以上の結果から, STEC 検査には, 目的に応じた培地選択や培地の併用, また, 亜テルル酸カリウム感受性 STEC も分離可能な培地の開発が望まれる。

第 227 回雑誌会

(Sep. 1, 2015)

(1) 多摩川の大腸菌群の遺伝子解析

和波 一夫, 石井 真理奈, 木瀬 晴美

東京都環境科学研究所年報 **39**, 20-30 (2010).

レビュー：太田 優治

現在, 環境基本法における水質汚濁の環境基準項目は, 大腸菌群であり, BGLB 最確数法 (BGLB 法) によって測定している。しかし, BGLB 法はふん便指標細菌の他に, 自然由来の菌種も測定している可能性が指摘されている。また, 公共用水域における大腸菌群の菌種は, 十分に把握されていないのが現状である。そこで本研究では, 分子生物学的手法を用いて大腸菌群の菌種の推定を行った。調査は, 下水処理場放流水が流入していない和田橋 (青梅市和田 2 丁目), 日野用水堰 (八王子市平町) および H 下水処理場放流水路 (八王子市小宮町) の計 3 地点を対象とし, 2009 年 9 月から 11 月の間に月 1 回実施した。測定は BGLB 法と特定酵素基質培地法 (ONPG-MUG 法) で行い, 陽性反応を示した培養液を PCR-DGGE 法の試料として用いた。また, PCR-DGGE 法によって得られた増幅産物について塩基配列の解読を行い, 菌種の同定を行った。

和田橋と日野用水堰の大腸菌群数は, それぞれ $4.6 \times 10^2 \sim 7.9 \times 10^3$ (MPN/100ml) と $2.4 \times 10^3 \sim 1.3 \times 10^4$ (MPN/100ml) であり, 環境基準 (50MPN/100ml 以下) と比較して, それぞれ 9~98 倍と 0.7~2.6 倍の高い値を示した。また, BGLB 法と ONPG-MUG 法から検出された細菌について菌種同定を行った結果, 合計 40 種の菌種が同定された。その内, ふん便性の菌種である *Citrobacter braaki* は, 全地点において検出された。非ふん便性の菌種と推定された菌種は 9 種 (*Aeromonas hydrophila*, *Erwinia carotovora*, *Kluyvera intermedia*, *Pectobacterium carotovorum*, *Pectobacterium cypripedii*, *Pseudomonas gessardii*, *Sphingomonas paucimobilis*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Yokenella regensburgei*) であった。擬陽性の反応を起こす *Aeromonas hydrophila* は, BGLB 法で検出されたが, ONPG-MUG 法では検出されなかった。その一方で, ONPG-MUG 法では *Erwinia carotovora* と *Pectobacterium carotovorum* の 2 種類が多く検出された。そのため, BGLB 法と ONPG-MUG 法の大腸菌群数が大きく異なる場合, 菌種構成による影響を受けている可能性が考えられた。また, 9 月, 10 月および 11 月の調査における非ふん便性菌種数は, それぞれ 1~4 種, 0~2 種, 2~4 種であり, 各月によって菌種の構成は異なった。以上のことから, BGLB 法と ONPG-MUG 法で検出される細菌は, ふん便由来ではない菌種も存在することが明らかとなり, その中でも *Aeromonas hydrophila* が最も多く検出された。

(2)オゴノリ類 6種の成長と生残に及ぼす温度, 光量, 塩分の影響

馬場 将輔

海生研研報 20, 41-56 (2015).

レビュー: 中田 光紀

紅藻オゴノリ類は, 熱帯から温帯の浅海域に広く生息し, 全世界で採藻, 養殖が実施されている。国内では, オゴノリ類に及ぼす環境要因 (水温, 光量, 塩分) の影響について, それぞれ室内培養実験が実施されている。しかしながら, これらの実験の多くは, 単一の環境要因について検討したものであり, 複合要因の影響を調査した実験は少ない。そこで本研究では, オゴノリ類 6種の生長と生残に及ぼす水温, 光量, および塩分の影響を室内培養によって調査した。供試生物は, クビレオゴノリ, シラモ, カバノリ, ツルシラモ, オゴノリ, セイヨウオゴノリとし, 実験室内で培養した藻体を試験に使用した。生長に及ぼす水温の影響は, 10, 15, 20, 25, 30, 32, 34, 36, 38°C の 9 条件とし, 20 日培養後の日間生長率から評価した。また, 生残に及ぼす水温の影響は, 32~37°C の 6 段階とし, 10 日間の通気培養後の生死を判別して評価した。光量の影響は, 水温 20°C の一定とし, 40, 80, 120, 160 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ の 4 条件における 20 日間培養後の日間生長率を求めて評価した。さらに, 生長に及ぼす水温と塩分の影響は, 水温 15, 20, 25, 30, 34°C と塩分 8, 16, 24, 32 psu を組み合わせた 20 条件で 20 日間培養し, 日間生長率から評価した。生残に及ぼす水温と塩分の影響は, 水温 10, 15, 20, 25, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40°C と塩分 8, 16, 24, 32 psu を組み合わせた 44 条件において 4 日間培養後の生残率から評価した。

オゴノリ類各種の生長適温と生育上限温度は以下の通りであった: クビレオゴノリ, 25°C と 34°C; シラモ, 20~25°C と 33°C; カバノリ, 20~25°C と 34°C; オゴノリ, 20~25°C と 36°C; ツルシラモ, 20°C と 34°C; セイヨウオゴノリ, 15~20°C と 34°C。光量の影響を検討した結果, オゴノリの日間生長率は, 他のオゴノリ類 5 種と比較して 160 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ で有意に高く, 全 6 種の中で唯一, 光量の増加に伴って日間生長率も増加する傾向を示した。次に水温と塩分の複合影響を検討した結果, 日間生長率が有意に高くなる水温と塩分は以下の通りであった: クビレオゴノリ, 25°C と 32 psu; オゴノリ, 20°C と 16~32 psu; その他 4 種, 20°C と 32 psu。さらに, 異なる水温と塩分の生残率を算出した結果, オゴノリは水温 10~34°C, 塩分 8~32 psu の範囲で生残率 100%となり, 全 6 種の中で, 生残率 100%となる水温と塩分濃度の範囲が最も広がった。以上の結果から, 水温ならびに塩分の変化に対して最も耐性の強い種はオゴノリであると示唆された。

(3)質量分析装置 MALDI バイオタイパーによる *Streptococcus* 属菌を対象とした同定性能の検討

太田 悠介, 松本 竹久, 春日 恵理子, 堀内 一樹, 根岸 達哉, 矢口 ともみ
名取 達矢

日本臨床微生物学雑誌 25(2), 31-36 (2015).

レビュー：松脇 知典

Streptococcus 属菌には、疾患の原因となる細菌種も含まれ、臨床上重要な細菌である。細菌の同定手法として、遺伝子学的手法や生化学的手法が挙げられる。しかしながら、いずれの手法も時間と労力を要することから、新たな検査法の開発が望まれている。近年、細菌の同定を迅速かつ正確に行うことのできる、マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析法 (MALDI-TOF MS) が臨床現場において普及し始めている。そこで本研究では、*Streptococcus* 属菌 17 菌種合計 135 株を対象として、MALDI バイオタイパーによる同定性能の検討を行った。また、MALDI バイオタイパーによる同定は、On plate 法またはエタノール・ギ酸抽出法で行い、データベースは biotyper 3.1 を用いた。なお、MALDI バイオタイパーによる同定結果の精度は、16S rRNA 遺伝子と recA 遺伝子に基づく遺伝子学的検査によって得られた同定結果と比較し、評価した。

MALDI バイオタイパーを用いた菌株の同定結果は、遺伝子学的検査結果と比較して、属レベルで 100% (135/135)、菌種レベルで 81.5% (110/135) 一致した。その一方で、遺伝子学的検査と菌種が不一致となった 22 株 (*S. mitis* group 13 株, *S. oralis* 4 株, *S. mitis* 3 株, *S. tigurinus* 2 株), 2 株 (*S. oraris* 1 株, *S. infantis* 1 株) および 1 株 (*S. infantarius* 1 株) は、MALDI バイオタイパーを用いた場合それぞれ、*S. pneumoniae*, *S. peroris* および *S. lutei* と同定された。MALDI バイオタイパーによって *S. pneumoniae* と同定された 22 株は、rRNA 遺伝子配列が近似した菌種であるため、細菌のリボソームサブユニットタンパク質を主な標的とする MALDI バイオタイパーを用いた菌種の同定は、困難であったと考えられる。また、On plate 法またはエタノール・ギ酸抽出法のいずれの場合でも、同様の菌種が同定された。以上の結果から、MALDI バイオタイパーは、*Streptococcus* 属菌を正確に同定できることが明らかとなった。しかしながら、遺伝子学的に近縁な菌種の同定やリファレンススペクトラの少ない菌種の識別は困難であり、リファレンスライブラリの充実や追加検査を行う必要が示唆された。

第 228 回雑誌会

(Sep. 2, 2015)

(1) Horizontal transfer of antibiotic resistance from *Enterococcus faecium* of fermented meat origin to clinical isolates of *E. faecium* and *Enterococcus faecalis*

Jahan, A., Zhanel, G. G., Sparling, R. and Holley, R. A.

International Journal of Food Microbiology, **199**, 78-85 (2015).

Reviewed by M. Nishiyama

食物連鎖は、動物とヒトとの間で薬剤耐性菌が感染・拡散する潜在的な経路のひとつとして考えられている。特に、ハムやソーセージ等の未加熱の発酵食肉は、動物の腸管内に存在する薬剤耐性菌をヒトが直接摂取するため、感染が懸念されている。そこで本研究では、発酵食肉と臨床から分離した腸球菌の遺伝子学的関連性を調査し、耐性遺伝子の伝達性を評価した。供与菌は発酵食肉から分離した17株のテトラサイクリン耐性腸球菌 (*E. faecalis* ; n=11, *E. faecium* ; n=6)、受容菌は臨床から分離した9株のテトラサイクリン感受性多剤耐性腸球菌 (*E. faecalis* ; n=3, *E. faecium* ; n=6) とした。テトラサイクリン耐性遺伝子の水平伝播は、plate mating法による*in vitro* 接合実験を実施し、供与菌に対する接合完了体の割合 (transconjugants/donor, T/D) によって伝達性を評価した。また、PCR法によって薬剤耐性遺伝子を検出し、水平伝播に関わるプラスミドの解析を実施した。さらに、試験に供した供与菌と受容菌についてPFGE法を実施し、分離菌株間における遺伝子型の類似性を評価した。

plate mating法によるテトラサイクリン耐性遺伝子の伝達性を評価した結果、供与菌17株のうち、1株 (*E. faecium* S27) のみの遺伝子伝達が確認された。受容菌として使用した9株の臨床分離株のうち、*E. faecium* S27から伝播が確認された菌株は*E. faecalis* 82916と*E. faecium* 83056の2株であり、その伝達性はそれぞれ 1.1×10^6 T/D, 2.1×10^5 T/Dであった。接合完了体について、薬剤耐性遺伝子をPCR法によって検出したところ、いずれも*tet(M)*が検出され、*E. faecalis* 82916からは*aadA*も検出された。そこで、接合完了体のプラスミドを解析した結果、プラスミド上には*tet(M)*の存在は確認されなかった。また、*aadA*の伝播は、クラス1インテグロンの有無と関係しているため、これらの耐性遺伝子の水平伝播は、インテグロンを経由して生じていると推察された。試験に供した各菌株における遺伝子型の類似性を評価した結果、14株の*E. faecalis*は類似度25%以上で8つのクラスターに分類された。同様に、12株の*E. faecium*においても、類似度55%で2つのクラスターに分類され、発酵食肉と臨床から分離した腸球菌株との間には遺伝子学的関係性は認められなかった。以上のことから、発酵食肉に存在する腸球菌の一部は、院内感染の原因菌となる腸球菌に対して、インテグロンによって耐性遺伝子を水平伝播できることが明らかとなった。

(2) Toxicological effects of metal-EDTA/NTA complex formation in a synthetic medium on the macroalga *Gracilaria domingensis*

Mendes, L. F., Zambotti-Villela, L., Simas-Rodrigues, C. and Colepicolo, P.

Journal of Applied Phycology, **27**(3), 1307-1314 (2015).

Reviewed by S. Hirayama

家庭や工場から排出されるエチレンジアミン四酢酸 (EDTA) やニトリロ三酢酸 (NTA) 等のキレート剤は、水環境中の重金属類と反応し、化学形態を変化させることが知られている。しかしながら、キレート剤と錯体を形成した金属が海藻に及ぼす毒性を詳細に調査した研究例は少ない。そこで本研究では、人工海水中において EDTA ならびに NTA と錯体形成した金属の紅藻 *Gracilaria domingensis* に及ぼす毒性を検討した。試料は、人工海水にキレート剤のみを添加した溶液と、キレート剤と各金属 (カドミウム, 銅, 亜鉛, および鉛) 溶液を混合した溶液を調整した。キレート剤のみを添加した溶液は、EDTA について 0.027~16.4 mmol/L, NTA について 0.50~45.5 mmol/L のそれぞれ 8 濃度区を設定した。一方、キレート剤と各金属溶液を混合した溶液は、EDTA と NTA について、対照区を含む 4 濃度区をそれぞれ設定し、所定濃度 (0.053~0.65 mmol/L) の各金属溶液と混合して調整した。試験は、切断した *G. domingensis* の頂部と調整した試験溶液をフラスコ内で暴露し、48 時間暴露後の湿重量の変化から、1 日当たりの生長率 (DGR) を算出した。

G. domingensis に対する EDTA ならびに NTA の毒性を調査した結果、キレート剤濃度の増加に伴って、DGR は減少する傾向を示した。DGR から半数阻害濃度 (IC₅₀) を算出したところ、EDTA と NTA の IC₅₀ は、それぞれ 8.9 と 26.5 mmol/L であり、EDTA の毒性は、NTA と比較して約 3 倍強かった。次に、各金属溶液に異なる濃度のキレート剤を添加して *G. domingensis* を暴露したところ、すべての金属溶液において、EDTA 濃度の増加に伴って DGR は上昇する傾向を示した。NTA を添加した場合についても、Cd, Zn, および Pb 溶液で EDTA 添加の場合と同様の傾向が認められた。Cd 溶液中 (0.053 mmol/L) における化学種の存在割合を調査したところ、Cd²⁺は、EDTA 無添加の場合に 0.26%であったのに対し、最も高い EDTA 濃度 (0.45 mmol/L) では 0.0001%未満に低下した。この変化は、すべての金属溶液中で認められた。そのため、キレート剤濃度の増加に伴う DGR の上昇は、藻類に対して強い毒性を有する無機の金属イオンの減少によって引き起こされた可能性が高い。以上の結果から、キレート剤の EDTA と NTA は、人工海水中で金属イオンと結合し、海藻の *G. domingensis* に対する重金属類の毒性を低減することが示唆された。

第 229 回雑誌会

(Sep. 17, 2015)

(1) Sunlight inactivation of fecal indicator bacteria in open-water unit process treatment wetlands: Modeling endogenous and exogenous inactivation rate

Nguyen, M. T., Jasper, J. T., Boehm, A. B., Nelson, K. L.

Water Research, **83**, 282-292 (2015).

Reviewed by M. Uno

酸化池法は、素掘りまたは防水シートによって遮水したため池に未処理の下水や畜産排水を一定時間貯留し、自然自浄作用を利用して水質浄化を図る排水処理方法である。特に、排水中の病原性微生物の不活化は日光照射によって促進される。この不活化のプロセスは、2 つに大別される：①日光中の UVB (280~320 nm) による DNA の損傷、②水中の光増感剤の光吸収に伴って生成した活性酸素による、細胞壁および細胞膜の酸化・損傷。しかしながら、日光照射による水中のふん便指標細菌の生存に関する報告は多数あるものの、各プロセスに焦点を置いた研究例は少ない。さらに、近年、活性酸素消去能を有する色素保有の腸球菌株が報告されているが、色素と光不活化の関係性は明らかとなっていない。そこで本研究では、大腸菌と腸球菌を対象として、UVB、水中の光増感剤に伴う活性酸素の有無の不活化への影響を調査した。試料は、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) または下水 2 次処理水に、大腸菌、色素保有腸球菌、色素非保有腸球菌をそれぞれ接種した。その後、実験槽に貯留した試料に、擬似日光を照射し、一定時間ごとの各細菌数を測定した。菌数の測定結果から回帰直線を作成し、直線の傾きを不活化速度係数 k (h^{-1}) として算出した。また、各細菌の不活化に寄与する UVB を調査する際、特定の波長範囲の光を通過することのできる光学フィルターを用いた。なお、腸球菌の色素保有の有無は、ソイ寒天培地を使用して、可視的に黄色に着色しているコロニーを色素保有菌とした。

PBS 中の大腸菌、色素保有腸球菌、および色素非保有腸球菌の k は、それぞれ 3.97 h^{-1} 、 1.04 h^{-1} 、 1.72 h^{-1} であった。これに対して、下水 2 次処理水中の大腸菌、色素保有腸球菌、および色素非保有腸球菌の k はそれぞれ、 3.04 h^{-1} 、 1.35 h^{-1} 、 2.35 h^{-1} であり、日光照射による腸球菌の k は、光増感剤を含む 2 次処理水中において最大となった。このことから、腸球菌の不活化には、UVB に加えて活性酸素も強く寄与していることが示唆された。また、色素保有腸球菌は、色素未保有腸球菌と比較して、日光照射条件下における生残性が高かった。このことから、色素保有腸球菌は、日光照射による不活化に対して、高い抵抗性を有することが明らかとなった。

以上の結果から、日光不活化に寄与する要因は、各細菌で異なることが示唆された。

(2) Rainfall, runoff, and suspended sediment delivery relationships in a small agricultural watershed of the Three Gorges area, China

Fang, N. F., Shi, Z. H., Li, L. and Jiang, C.

Geomorphology, **135**, 156-166 (2011).

Reviewed by K. Kihara

Yangtze 流域の Three Gorges ダムは、急峻な山地や耕作地に囲まれ建設されていることから、高強度の洪水イベントによる土壌浸食に起因したダム堆砂が問題となっている。したがって、流出する浮遊土砂の定量、ならび土砂流出・輸送を支配する要因についての理解は、持続的農業および環境において極めて重要である。そこで本研究では、Three Gorges ダムの上流に流入する Wangjiaqiao 流域を対象とし、降雨、流出、および土砂輸送量の関係から、流域内における水文ならびに土砂の応答について調査した。調査は、1989 年～2004 年までの雨量、河川流量、および土砂量について、それぞれ連続自記雨量計、水位記録計、シルト採泥器を用いて測定した。浮遊土砂 (SS) 負荷量は、SS 濃度データに流量データを乗じて見積った。1989 年～2004 年で観測した 40 回の洪水イベントについて、ピアソンの相関行列ならびに段階式重回帰分析を適用し、月ごと、季節ごと、および洪水イベントごとの降雨、流出、土砂輸送の関係を解析した。

月ごとと季節ごとの SS 負荷量を算出した結果、夏季において年平均 SS 負荷量の 80%と大部分が輸送されていた。また、夏季における降水量と流出量についても、年間のそれぞれ 41%および 52%と高い寄与率を示した。このことから、土砂輸送の動態は月間や季節によって著しく変動し、高強度の洪水イベントが多発する夏季にその影響が大きいと考えられた。ピアソン相関行列によって降水量、洪水流量、および浮遊土砂量の関係を解析した結果、総降水量、最大流量、総流出量、30 分間の最大降雨強度、および流出土砂量に関連した変数の間で、それぞれ有意な相関関係が認められた ($p < 0.01$)。特に、総降水量と総流出量との間で最も強い相関関係を示した ($R=0.883$)。また、段階式重回帰分析によって、洪水イベントにおける流出量および SS 負荷量の回帰式を算出したところ、総降水量を変数とした場合において、流出量の変動の 84%を再現できた。その一方で、SS 負荷量については、最大流量を正の変数、降雨継続時間を負の変数とした場合に、最も強い相関関係が認められた ($R^2=0.761$, $p < 0.001$)。このことから、洪水イベントにおける短時間の降雨に伴った最大流量は、土壌浸食を誘発する重要な因子であることが明らかとなった。以上の結果から、Wangjiaqiao 流域における土砂の応答は、月間、季節、および洪水イベントごとに変動し、複雑かつ不均一な特性を有していることが確認された。

(3) Characterization of Bacteria in Ballast Water Using MALDI-TOF Mass

Spectrometry

Emami, K., Askari, V., Ullrich, M., Mohinudeen, K. and Anil, A. C.

PLOS ONE 7(6), e38515 (2012).

Reviewed by K. Niina

船舶のバラスト水として毎年約 40 億トンの海水が世界中を移動している。このバラスト水を媒体とした細菌の移動・拡散は、海洋環境や人間の健康被害にまで及ぶ問題が報告されている。しかしながら、バラスト水中の細菌を同定するためには、時間と労力を要する。ところが近年、タンパク質の小さなペプチド断片を測定することによって細菌を迅速に同定する MALDI-TOF MS Biotyping (MTB) が開発され、普及し始めている。そこで本研究では、バラスト水から単離した細菌について MTB を用いて同定し、データベースの作成を行った。試料は、Cullercoats 湾における船舶のバラストタンク内 (容積 55 m³) から採取したバラスト水とし、ろ過後のフィルターに生育したコロニーを MALDI-TOF MS 分析に供した。そして、MTB から得られた同定結果を 16S rRNA 遺伝子に基づく菌種同定試験と比較し、MALDI-TOF MS の識別精度を評価した。

バラスト水から単離した菌株 36 株を MTB によって解析した結果、*Vibrio* 属, 9 株; *Enterococcus* 属, 3 株; *Pseudomonas* 属, 9 株; *Pseudoalteromonas* 属, 7 株; *Serratia* 属, 2 株; *Proteus* 属, 1 株; *Halmonas* 属, 2 株; *Tenacibaculum* 属, 1 株; *Bacillus* 属, 1 株; *Lactobacillus* 属, 1 株が同定された。*Vibrio* 属の株で、コレラ毒素を産生する O1 型もしくは O139 型の *Vibrio cholera* は検出されなかった。また *Vibrio* 属は、菌種間におけるマススペクトルの類似性が極めて高かった。このことから、MTB において *Vibrio* 属を菌種別に分類するためには、菌種ごとに特異的なピーク値を探索する必要がある。*Enterococcus* 属 3 株の 16S rRNA 遺伝子に基づく菌種同定試験では、*E. faecium*, 1 株; *E. hirae*, 2 株と同定された。その一方で、MTB では、*E. faecalis*, 1 株; *E. faecium*, 1 株; *E. hirae*, 1 株と同定された。異なる同定結果を示した菌株のマススペクトルを確認したところ、*E. hirae* のリファレンスデータと共通したピーク値を示さず、*E. faecalis* に特異的な質量電荷比 7330±3 の位置でピーク値を検出した。このことから、16S rRNA 遺伝子に基づく菌種同定試験と MTB で得られた菌種同定結果は、必ずしも一致しない可能性が示唆された。その他の菌株における MTB の解析結果は属レベルの同定精度であり、菌種ごとのリファレンスデータをさらに蓄積する必要があると考えられた。以上のことから、MTB の解析結果をデータベースとすることによって、バラスト水から単離した細菌を属レベルで同定することが可能である。

第 230 回雑誌会

(Oct. 7, 2015)

(1) Differential Decay of Wastewater Bacteria and Change of Microbial Communities in Beach Sand and Seawater Microcosms

Zhang, Q., He, X., and Yan, T.

Environmental Science and Technology, **49**(14), 8531-8540 (2015).

Reviewed by K. Teranishi

近年、レクリエーション水域において、海水と比較して、砂浜から高濃度でふん便指標細菌が検出されている。しかしながら、海水と砂浜における細菌数や生残性を比較した調査は見当たらない。そこで本研究では、ラボ内に人工ミニビーチを作成し、海水と砂浜におけるふん便指標細菌の生残性の違い、ならびに時間経過に伴う細菌叢の挙動を調査した。ハワイのクアロアビーチを対象として、砂浜は波打ち際から 0.5 m の地点で採取した。また、砂浜への人為的汚染を評価するために、ビーチ周辺に流入する下水処理施設の下水をミニビーチに添加した。そして、ミニビーチから日光を遮断した状態で、最大 24 日間連続して海水と砂浜を採取した。対象とするふん便指標細菌は、大腸菌、腸球菌、およびウェルシュ菌とし、ANCOVA 検定を用いて、海水と砂浜中における各ふん便指標細菌の生残性を比較した。また、各試料中の細菌叢の挙動を、リアルタイム PCR 法と次世代シーケンサー (Illumina) によって調べた。得られた細菌遺伝子は、類似した遺伝子配列を基に分類し、分類単位として Operational Taxonomic Units (OTUs) で表した。

海水と砂浜の各ふん便指標細菌数を測定した結果、腸球菌とウェルシュ菌は、全期間を通して、海水と比較して、砂浜から高濃度で検出された (平均 $9,789 \pm 7,689$ CFU/100 g, $13,500 \pm 3,822$ CFU/100 g ; n=17)。また、全ふん便指標細菌の生残性を、ANCOVA 検定を用いて評価したところ、海水と比較して、砂浜は有意に高かった ($P < 0.001$)。このことから、砂浜中は海水と比較して、ふん便指標細菌が長期間生残することが明らかとなった。次に、リアルタイム PCR 法を用いて、各試料中の全細菌数を測定した結果、砂浜の細菌数は海水と比較して、全期間を通して高い値を示した (砂浜 ; $8.8 \sim 10.6$ log コピー/g, 海水 ; $7.4 \sim 9.1$ log コピー/mL)。さらに、次世代シーケンサーを用いて、海水、砂浜、および下水の菌叢を解析した結果、合計 986 OTUs が同定された。そのうち、各試料中の大部分 (51~76%) を占める OTUs は 54 OTUs であり、その他の 932 OTUs は非常にマイナーであった。メジャーな 54 OTUs のうち、下水、砂浜、および海水由来の細菌種は、それぞれ 7 種、17 種、および 19 種であった。中でも、砂浜由来であった 17 の細菌種は、経日変化に伴って、存在量は一定あるいは増加傾向を示した。以上の結果から、砂浜の細菌は海水の細菌と比較して高濃度で存在し、砂浜中で長期間生残していることが明らかとなった。

(2) 幌内平野の風化変質と劣化

林 謙二, 山 真典, 米田 哲朗

応用地質 **46**(4), 198-206 (2005).

レビュー：板清 智也

近年、堆積軟岩である泥岩を対象とした物理的性質や風化による化学組成の変化についての研究がなされている。しかしながら、泥岩の風化変質による鉱物・化学組成や組織・構造の変化と工学特性を関連付けた研究は少ない。そこで本研究では、古第三系幌内層泥岩を対象とし、粘土鉱物の性質変化と泥岩の化学組成の変化を調べるとともに、泥岩劣化と風化との関係について検討した。試料は、露頭試料（中風化岩、弱風化岩、未風化岩；計 9 試料）、トンネル試料（未風化岩；1 試料）、およびボーリングコア試料（強風化岩、中風化岩、弱風化岩、未風化岩；12 コア計 46 試料）を採取し、計 56 試料とした。各試料は、粉末 X 線回折（XRD）と蛍光 X 線分析（XRF）によって、層泥岩の未風化岩と風化岩の鉱物組成と化学組成を比較した。また、超音波速度計測とスレーキング実験によって、泥岩劣化と風化の関係について検討した。サイクル数に対する耐久性は、スレーキング耐久度指数（%）によって評価した。

XRD による風化岩と未風化岩の鉱物組成を比較した結果、層泥岩の風化が進行するにつれて緑泥石、黄鉄鉱および方解石が減少する傾向を示した。XRF による化学組成の深度分布をみると、風化は表層部に近づくほど進行しており、同時に黄鉄鉱起源である SO_3 成分と方解石起源である CaO 成分の溶脱も進行した。さらに、表層部付近の風化岩については、広範囲でスメクタイトの存在が確認された。一般に、黄鉄鉱の溶脱が著しい箇所では、緑泥石の減少とスメクタイトの増加が同時に確認される。このことから、黄鉄鉱から SO_3 が溶脱することによって、緑泥石の鉱物学的な性質変化が生じたと考えられる。また、溶脱した SO_3 は方解石の溶解を促進させることから、泥岩の強度に関する物性が低下し、空隙や亀裂を発達させる可能性が考えられた。そこで、超音波速度測定による未風化岩と風化岩の P 波速度を比較すると、未風化岩の P 波速度（2450 m/s 以上）に対して、風化岩の P 波速度（856 m/s）は著しく低下しており、風化による亀裂の発達が示唆された。また、スレーキング実験の結果、風化岩のスレーキング耐久度指数（75%）は、未風化岩（85%以上）と比較して低く、サイクル数の増加に伴って急激に減少した。このことから、岩石の風化によってスレーキングに対する耐久性が低下することが明らかとなった。以上の結果から、幌内層泥岩は風化による黄鉄鉱起源の SO_3 成分の溶脱によって、空隙や亀裂の発達によるスレーキングに対する耐久性の低下と緑泥石の変化を引き起こすことが明らかとなった。

(3) 我が国における水道原水中の水系感染性ウイルスおよび原虫の存在実態と指標微生物の有効性

岸田 直裕, 今野 祥顕, 原本 英司, 浅見 真理, 秋葉 道宏
水道協会雑誌 **82**(10), 2-10 (2013).

レビュー：今福 夕貴

ウイルスや原虫による水系感染症が世界中で問題となっている。しかし、ウイルスと原虫を対象とした調査は観測範囲が限定されており、同一の測定法を用いた事例はほとんどない。そこで本研究では、国内 30 地点の水道原水を対象に、ウイルス（腸管系アデノウイルス、ノロウイルス G I 型, G II 型）、ならびに原虫（クリプトスポリジウム、ジアルジア）の存在実態を調査し、水道原水中におけるウイルス・原虫の検出率・濃度を測定した。さらに、水道原水における水系感染症の指標微生物として用いられている大腸菌、大腸菌群、嫌気性芽胞菌、および F 特異大腸菌ファージの有用性を評価した。試料は、2010 年 6, 10, 12 月、および 2011 年 2 月に、国内浄水場 30 地点から水道原水 2 L を採取し、合計 120 試料とした。ウイルスは、試料から抽出した DNA と相補的 DNA (cDNA) を、リアルタイム PCR によって定量した。原虫は、試料を直接蛍光抗体法と DAPI 染色法に供してプレパラートを作製し、蛍光顕微鏡を用いて計数した。指標微生物は、大腸菌群と大腸菌はクロモカルトコリフォーム寒天培地、嫌気性芽胞菌はハンドフォード改良培地を用いた三重層法、F 特異大腸菌ファージは、*Salmonella enterica* serovar Typhimurium WG49 を用いたブラック法によってそれぞれ測定した。また、ウイルス・原虫濃度と指標微生物濃度の相関関係を、スピアマンの順位相関解析によって評価した。

調査期間内に採取した全 120 試料のうち、腸管系アデノウイルス、ノロウイルス G I、および G II の検出率は、それぞれ 18、16、および 30% であり、検出濃度はそれぞれ 110~2500、88~970、および 310~2900 コピー/L であった。クリプトスポリジウムとジアルジアの検出率は、それぞれ 27、20% であり、検出濃度はそれぞれ 0.5~17 oocysts/L、0.5~2 cysts/L であった。全てのウイルスと原虫が、全 30 地点から検出されたため、ウイルス・原虫は地域・時期を問わず、水道原水中で広範囲に存在していることが明らかとなった。次に、ウイルス・原虫濃度と指標微生物濃度の相関関係を評価したところ、相関関係は総じて低かった ($r = -0.01 \sim 0.52$)。したがって、指標微生物濃度からウイルス・原虫濃度を予測することは困難と推測された。一方、嫌気性芽胞菌濃度と原虫における検出率の間には有意な差 (χ^2 検定, $P < 0.01$) は認められた。指標微生物の中でも、嫌気性芽胞菌は水道原水中における原虫汚染の有効な指標細菌であることが示唆された。

(4) 1990年から2012年までに分離された腸管出血性大腸菌の臨床微生物学的特徴

小林 治, 磯崎 将博, 北川 真喜, 江成 博

日本臨床微生物学会 **25**(1), 34-41(2015).

レビュー：上田 卓矢

感染症の原因菌である腸管出血性大腸菌 (*enterohemorrhagic Escherichia coli*; EHEC) の検出・同定は、次の2段階に分けられる：①生化学性状の違いを利用した EHEC 株の分離、②Shiga toxin (Stx) の検出。しかしながら、Stx の検出が必要な EHEC 株を効率よく分離する手順は不明確である。そこで本研究では、EHEC 株の微生物学的特徴から、効率的な毒素検出に至る手順を検討した。供試菌株は、臨床分離された EHEC 43 株 (O157; 19 株, O26; 3 株, O111; 3 株, その他; 16 株, 群別不能株; 2 株), 対照株として、*E.coli* の Stx 陰性 1 株, Stx 産生 1 株を用いた。全供試菌株について、PCR 法によって、EHEC の病原遺伝子 (*stx₁*, *stx₂*, *eaeA*, *aggR*, *bfpA*, *astA*, *hlyA*) の検出を試みた。また、EHT 寒天培地を用いた腸管溶血素 E-hly の検出と、EHEC の主要な血清型を識別するセフィキシムと亜テルル酸カリウムを添加した CT 培地での発育状況を確認した。さらに、ID32 E API と CLIG 寒天培地を用いて EHEC 株の生化学性状を調査した。なお、CT 培地に発育不良であった EHEC 株は、CT 添加濃度を調整した培地を用いて、CT 感受性を評価した。

PCR 法による病原遺伝子の検出を行った結果、*stx₁*, *stx₂* のいずれかは、EHEC の全菌株から検出された。*astA* は、O157 14 株と O26 1 株から検出され、*aggR* と *bfpA* は、全菌株から検出されなかった。また、*hlyA* は群別不能株 1 株を除く全ての株から検出された。EHT 寒天培地で検出された E-hly 産生株からの *hlyA* の検出率は高いことから、E-hly を指標とする EHT 寒天培地を用いたスクリーニングは有用であると考えられた。*eaeA* は、O157 19 株, O26 3 株, O111 3 株を含む 36 株から検出され、そのうち、O157 2 株と O26 2 株を含む 10 株は、CT 培地に発育しなかった。さらに、CT 濃度調整培地を用いた発育能試験において、O157 と O26 に対して亜テルル酸カリウムによる発育阻止が確認された。生化学性状の調査においては、O157 株に関して、ソルビトール分解能に異型株は見られなかったが、ラムノース非分解性を示す異型株が確認され、分離・収集した EHEC 43 株中の 18 株 (41.8%) が異型株であった。以上のことから、EHEC を分離する際、特定の血清型や生化学性状を指標とする検出方法では限界があると考えられる。したがって、O157 検出と O157 以外の検出法として、それぞれ、ソルビトール分解能を指標とする培地と *E.coli* を特定する培地から釣菌し、各株を E-hly を指標とする培地を用いて EHEC をスクリーニングした後、E-hly 陽性株から Stx の検出を行うことを提案する。

第 231 回雑誌会

(Oct 13, 2015)

(1) Geographic isolation of *Escherichia coli* genotypes in sediments and water of the Seven Mile Creek – A constructed riverine watershed

Chandrasekaran, R., Hamilton, M. J., Wang, P., Staley, C., Matteson, S., Birr, A. and Sadowsky, M. J.

Science of the Total Environment, **538**, 78-85 (2015).

Reviewed by Y. Ota

淡水中におけるふん便汚染を評価する指標細菌として、大腸菌が用いられている。しかしながら、近年、大腸菌は河川中で生残り、増殖することが報告されている。大腸菌を指標細菌として用いるためには、河川における大腸菌の生残りや増殖に関係する気候的、生物学的要因を把握する必要がある。そこで本研究では、ミネソタ州 Seven Mile Creek (SMC) を対象として、堆積土と河川水中における大腸菌の実態および増殖に影響を及ぼす要因について調査した。試料は、2009 年～2010 年（4 月～10 月）の間に、SMC 流域の上流から下流までの 4 地点において河川水と堆積土を採取し、最確数（MPN）法を用いて各試料中の大腸菌を計数した。また、各試料中における大腸菌の遺伝子型は、Horizontal fluorophore-enhanced rep-PCR（HFERP）を用いて取得し、系統樹解析、MANOVA 分析、およびジャックナイフ分析によって、地点間の類似性を評価した。

各年に採取した堆積土と河川水中の大腸菌数は、夏にかけて増加傾向を示した。また、4 地点のいずれの試料においても、降雨後（2009 年 8 月、10 月）の河川水中の大腸菌数は、降雨前と比較して、有意に高かった（ $P < 0.001$ ）。このことから、河川水中の大腸菌数の変動に、気温と降雨が寄与していることが示唆された。HFERP を用いて、各試料中における大腸菌の遺伝子型の類似度を評価した結果、堆積土中と比較して、河川水中は多様な遺伝子型の大腸菌が存在した。また、2009 年 10 月と 2010 年 4 月に堆積土と河川水から採取した試料における大腸菌の遺伝子型は、高い類似性が認められた。さらに、4 地点においても、大腸菌の遺伝子型は、それぞれ 7.9%、11.3%、16.6%、および 12.3% の割合で一致しており、いずれの地点においても遺伝子型の類似性が認められた。このことから、大腸菌は長期間に渡って堆積土および河川水中に生残すること、河川水による堆積土の流下に伴い、堆積土中の大腸菌も流下する可能性が示唆された。さらに、各年に取得した堆積土と河川水中の大腸菌の遺伝子型は、高い類似性が認められた。以上の結果から、堆積土中において生残していた大腸菌は、降雨によって流下し、河川水に供給されることが示唆された。

(2)カギイバラノリ *Hypnea japonica* (スギノリ目, 紅藻) の生長におよぼす水温, 光, 窒素の種類および濃度の影響

早川 浩一, 田中 優平, 駒澤 一朗
水産増殖 **61** (4), 377-382 (2013).

レビュー：中田 光紀

伊豆諸島八丈島では, 重要な水産資源として紅藻カギイバラノリを漁獲している。しかしながら, 高水温・貧栄養の海況が継続しており, 安定した資源量を得るために, 人為的な手段を講じる必要がある。そこで本研究では, カギイバラノリの養殖技術開発における適正環境条件を把握するため, 室内培養実験によって, カギイバラノリの生長に及ぼす水温, 光強度, および窒素の種類ならびに濃度の影響を調査した。試験は, カギイバラノリの藻体を用いて実施した。水温と光強度の影響は, それぞれ 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30, 33 °C の 8 条件と 15, 50, 100, 150, 200, 250, 300 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (明期:暗期=12L:12D) の 7 条件で検討した。窒素化合物の種別実験は, 硝酸態窒素区, アンモニア態窒素区, および対照区の 3 区で実施した。さらに, 最も良い結果が得られた条件に関して, 最適濃度の検討を行った。なお, 各実験は, 0 日目と 7 日目の湿重量の変化による相対生長速度によって影響を評価した。

水温の影響を検討した結果, 12°C と 30°C の相対生長速度は, それぞれ 0.9 と 5.1% day^{-1} であった。その一方で, 18~27°C の範囲では 8.6~11.5% day^{-1} となり, 八丈島の海水温 (18~26.6 °C) は, カギイバラノリの生長に至適であると判断した。また, 光強度の影響を検討した結果, 光強度 100 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 以上において, 相対生長速度は, 11.2~17.9% day^{-1} であり, 50 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 以下の相対生長速度と比較して高い値で算出された。八丈島の光量子密度は, 最低でも 100 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 以上を記録しており, 光強度はカギイバラノリの生長を抑制する因子でないと考えられた。次に, 窒素化合物の種別実験を実施したところ, 3 区の中で最も高い相対生長速度は硝酸態窒素区の 11.0% day^{-1} であった。そこで, 硝酸態窒素濃度を 8 条件 (0, 5, 10, 100, 150, 200, 400 μM) とし, 相対生長速度に最適な濃度を検討した。その結果, 10~400 μM の添加区において, 7.9~10.2% day^{-1} の高い相対生長速度が算出された。しかしながら, 八丈島沿岸域の硝酸態窒素濃度は, 0.6~2.1 μM と報告されており, 低い硝酸態窒素濃度によってカギイバラノリの生長が抑制されている可能性が高い。以上の結果から, 八丈島沿岸域において, カギイバラノリの生長を抑制している因子は, 硝酸態窒素濃度であることが示唆された。

(3)マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析計による使用済みコンタクトレンズケースから回収された微生物の迅速分類

角出 泰造, 豊原 恵, 野町 美弥, 角田 真央, 中田 和彦, 石原 康行
日本質量分析学会誌 57(4), 241-248 (2009).

レビュー：松脇 知典

Multipurpose Solution (MPS) は、ソフトコンタクトレンズ (SCL) のケアに必要な機能を 1 本に集約した簡便な消毒法である。しかしながら、SCL ユーザーにおける角膜感染症の事例では、細菌性感染症が多くを占めており、MPS の使用との関連性が指摘されている。一方で、近年、マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析法 (MALDI-TOF MS) は、細菌種を迅速に分類する手法として普及し始めている。そこで本研究では、レンズケースから回収した微生物を MALDI-TOF MS によって分類することを試みた。試料は、16 人の SCL ユーザーから回収したレンズケース中に残っている MPS とし、真菌生育用の SDA/Cm 培地と細菌生育用の SCDA 培地によって培養した。培養後に生育した計 659 株のコロニーを対象として分析した。また、得られた質量スペクトルは Biotyper 2.0 によってデータ解析を行い、分類できなかった菌株は遺伝子解析によって菌種を決定した。

コロニーの質量スペクトルを Biotyper 2.0 によって解析した結果、644 株 (細菌, 634 株; 真菌, 10 株) が種レベルまで分類された。その一方で、分類されなかった 15 株は、遺伝子解析によって科レベルで 1 株、属レベルで 10 株、および種レベルで 4 株分類された。今回の分析では、グラム陽性菌 (12 属, 34 種, 430 株)、グラム陰性菌 (5 属, 9 種, 215 株)、および真核生物 (3 属, 5 種, 14 株) が分類された。その中でも、*Bacillus subtilis* (305 株)、*Pseudomonas monteilii* (100 株)、*Pseudomonas libanensis* (100 株)、*Staphylococcus epidermidis* (39 株)、*Staphylococcus warneri* (25 株)、および *Rothia mucilaginosa* (21 株) が優占種であり、重大な角膜感染症を引き起こす菌種は検出されなかった。*Staphylococcus* 属菌 (*S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. capitis*, および *S. warneri*) は m/z 9600 付近に共通するピークが検出されたが、種に特有のピークも検出され、菌種を明確に分類することができた。*S. epidermidis* は、 m/z 3340, 4814, 5115, 6585, 6685, 8095, 9633, および 10235 にピークが検出された。これらの菌株を遺伝子解析し、データベースと照合したところ、*S. epidermidis* に 99~100% の相同性を示した。以上のことから、MALDI-TOF MS は、迅速かつ正確に微生物を分類することが可能であると示唆された。

第 232 回雑誌会

(Oct. 21, 2015)

(1) Impacts of anthropogenic activity on the ecology of class 1 integrons and integron-associated genes in the environment

Gaze, W. H., Zhang, L., Abdousslam, N. A., Hawkey, P. M., Calvo-Bado, L., Royle, J., Brown, H., Davis, S., Kay, P., Boxall, A. B. and Wellington, E. M.
The ISME Journal, **5**, 1253-61 (2011).

Reviewed by M. Nishiyama

水平伝播は、異なる細菌属間で薬剤耐性遺伝子を拡散させる原因である。中でも、クラス1インテグロンは、抗生物質、ならびに合成洗剤や殺虫剤に含まれる第四級アンモニウム化合物 (QAC) に対する耐性遺伝子を運ぶ遺伝要素である。しかしながら、人為的活動によって発生する薬剤耐性菌の、環境に与える影響はあまり知られていない。そこで本研究では、環境中におけるクラス1インテグロン、ならびに関連するQAC耐性遺伝子の存在実態を調査した。試料は、QACの排水が流入する土壌、下水消化汚泥、抗生物質を投与している豚糞尿、抗生物質やQACによる汚染のない土壌（非汚染土壌）の4つとした。また、石灰を添加後、脱水消化汚泥を混合した非汚染土壌から以下の経日後に試料を採取した：初日、1、12、24ヶ月後。各試料からDNAを抽出した後、リアルタイムPCR法によって、16S rRNA遺伝子、クラス1インテグロン (*intI1*)、ならびに関連するQAC耐性遺伝子 (*qacE*, *qacEΔ1*, *qacG*, および*qacH*) を測定した。なお、試料中における各遺伝子保有細菌の存在割合は、16S rRNA遺伝子数に対する各ターゲット遺伝子数として評価した。

*intI1*の存在割合は、下水消化汚泥と豚糞尿でそれぞれ1.01%, 0.21%であり、非汚染土壌(0.0036%)と比較して有意に高かった。また、QACの排水が流入する土壌での存在割合は0.65%であり、クラス1インテグロンは人間活動の影響によって増加すると考えられた。QAC耐性遺伝子の存在割合を測定した結果、QACの排水が流入する土壌における*qacE*の存在割合は、全試料の中で最も高かった(0.44%)。その他のQAC耐性遺伝子についてみると、*qacG*と*qacH*はQACの汚染土壌と下水消化汚泥からそれぞれ検出されたのに対し、豚糞尿と汚染無土壌からは検出されなかった。このことから、QAC耐性遺伝子の存在割合は、抗生物質やQACが存在する環境下で増加することが明らかとなった。次に、脱水消化汚泥を含有した土壌をモニタリングした結果、初日と比較すると、1ヶ月後の*intI1*と*qacE*の存在割合はそれぞれ減少した。*(intI1 : 0.56%から0.36%, qacE : 0.50%から0.12%)*。その一方で、*intI1*と*qacE*ともに24ヶ月後においても0.01%存在した。以上のことから、クラス1インテグロンや関連するQAC耐性遺伝子は、人間活動の影響によって環境中に排出され、適切に処理した下水消化汚泥を加えた土壌においても長期間生残することが明らかとなった。

(2) Cadmium and copper accumulation and toxicity in the macroalga *Gracilaria tenuistipitata*

Huang, X., Ke, C. and Wang, W.-X.

Aquatic Biology, **11**(1), 17-26 (2010).

Reviewed by S. Hirayama

中国の海南省に広く分布する紅藻 *Gracilaria tenuistipitata* は、養殖アワビの主要な飼料となるため、商業的な価値が高い。しかしながら、海南省の海岸堆積物中では、カドミウム (Cd) と銅 (Cu) による汚染が深刻化している。そのため、金属汚染された *G. tenuistipitata* を飼料とすることによって、養殖アワビへの間接的な影響が危惧される。そこで本研究では、異なる環境条件において、Cd と Cu の *G. tenuistipitata* への蓄積量ならびに *G. tenuistipitata* に対する両金属の毒性を調査した。試験は、Cd と Cu とともに 0, 10, 50, および 200 $\mu\text{g/L}$ の 4 濃度区に設定した金属溶液に、藻体を 2 週間暴露して実施した。両金属の *G. tenuistipitata* への蓄積量は、試験後の藻体を溶解し、原子吸光分光法で分析した。海藻に対する両金属の毒性は、生長率、脂質過酸化反応、およびエネルギー貯蔵量の 3 つのエンドポイントで評価した。生長率は、生体重の変化から算出した。脂質過酸化反応は、反応の副産物であるマロンジアルデヒド (MDA) 量から評価した。エネルギー貯蔵量は、炭水化物、脂質、およびタンパク質のエネルギー量の合計値とした。なお、すべての金属暴露試験は、水温 18, 23, 28°C, 塩分 20, 26, 33 psu の各 3 つの環境条件で実施した。

両金属の藻体への蓄積量を分析した結果、Cd と Cu のいずれの場合も、水温の上昇ならびに塩分の低下に伴って、蓄積量は増加した。次に、生長率を算出した結果、すべての環境条件において、両金属ともに濃度の増加に伴って、生長率は低下した。特に、高水温条件において金属による生長率の著しい低下が認められ、水温 28°C のとき、Cd と Cu の 200 $\mu\text{g/L}$ での生長率は、0 $\mu\text{g/L}$ における生長率から、それぞれ 83 と 80% に低下した。生長率と同様に、エネルギー貯蔵量をエンドポイントとした場合にも、高水温条件において金属の影響によってエネルギー貯蔵量は低下した。このことから、水温は、*G. tenuistipitata* への金属の蓄積と毒性を支配する重要な環境要因であることが示唆された。両金属の藻体への蓄積量と 3 つのエンドポイントの相関関係を調査したところ、Cd の蓄積量は、生長率との間のみについて相関関係が認められた ($r^2=0.604$)。これに対して、Cu の蓄積量は、すべてのエンドポイントとの間に相関関係が認められた：生長率, $r^2=0.669$; MDA, $r^2=0.747$; エネルギー貯蔵量, $r^2=0.616$ 。このことから、*G. tenuistipitata* への銅の蓄積量を測定することで、*G. tenuistipitata* に対する銅の簡易的な毒性評価も可能となる。

第 233 回雑誌会

(Oct. 28, 2015)

(1) Rainfall, runoff and sediment transport in a Mediterranean mountainous catchment

Tuset, J., Vericat, D. and Batalla, R. J.

Science of the Total Environment, in press (2015).

Reviewed by K. Kihara

地中海性気候に位置する河川流域の降雨、流出、ならびに土砂輸送の関係は、長期的な乾燥期間や高強度の降雨イベントの影響によって著しく変動する。これまでに、地中海の農業流域における降雨、流出、および土砂輸送との関係を調査した研究は数多く報告されている。その一方で、中規模な山地流域を対象とした研究は見当たらない。そこで本研究では、地中海の山地流域を対象として、降雨、流出、および土砂輸送との関係を調査した。調査は、地中海の Ribera Salada 流域を対象とし、2005 年～2008 年における雨量、流量、および浮遊土砂 (SS) 輸送量をモニタリングした。降雨量、流出量、および SS 負荷量に関連した変数について、ピアソン相関解析と多変量解析を実施し、各変数間関係を評価した。なお、降雨初期の流量が定常流の 1.5 倍と観測された場合に、その降雨を洪水イベントと定義し、解析に使用した。

2005 年～2008 年において取得した洪水イベント (全 73 イベント) に基づき、SS 負荷量と流出係数を算出したところ、年平均の全 SS 負荷量と流出係数は、それぞれ 2.3 t/km/y (780 t) と 4.1%であり、地中海における他の流域の値 (年間 SS 負荷量: 15～3000 t/km/y, 年流出係数: 6～69%) と比較して、いずれも極端に低い傾向を示した。これは、Ribera Salada 流域における土壌の高い浸透能が流出量の低下に起因していると考えられた。次に、季節ごとの SS 負荷量を算出したところ、年間の全 SS 負荷量のうち、572 t (72.6%) は春季 (3 月～6 月) において輸送された。春季は、流出量についても年間の 65.3%と大部分を占めていた。このことから、全 SS 負荷量は、季節ごとに変動し、春季の高い流出量に影響を受けている可能性があると考えられた。そこで、ピアソン相関解析によって、降雨量、流出量、および SS 負荷量との関係を調査した結果、全 SS 負荷量は、洪水イベントにおける最大流量と、直接流出量に対して有意な相関関係を示した ($R=0.79$; $p<0.01$, $R=0.67$; $p<0.01$)。また、多変量解析を用いて、全 SS 負荷量に対する降雨量と流出量との複合的な支配要因を調べたところ、直接流出量を含む 5 つの変数で構成された関係式によって、全 SS 負荷量の 94%が説明できた。さらに、5 つの変数のうち、直接流出量に対応する係数 (379.544) は、他の 4 つの係数 (-0.63～7.094) と比較して極端に大きく、正の値を示した。以上のことから、Ribera Salada 流域における SS 輸送は、洪水イベント時における直接流出によって強く支配されていると考えられた。

(2) Rapid identification of bacterial isolates from wheat roots by high resolution whole cell MALDI-TOF MS analysis

Stets, M. I., Pinto, A. S., Huergo, L. F., Souza, E. M., Guimarães, V. F., Alves, A. C., Steffens, M. B. R., Monteiro, R. A., Pedrosa, F. O. and Cruz, L. M.
Journal of Biotechnology **165**, 167-174 (2013).

Reviewed by K. Niina

Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) は、微生物の同定を迅速かつ正確に分析できる手法であり、臨床分野を中心に活用されている。その一方で、MALDI-TOF MSによって環境から単離した細菌を分析した研究例は、極めて少ない。そこで本研究では、小麦から単離した細菌を対象としてマススペクトルと16S rRNA遺伝子に基づく塩基配列情報を取得し、両手法の識別精度を比較した。また、非マメ科植物に共生する*Azospirillum brasilense* (6株), *A. amazonense* (2株) および*A. lipoferum* (1株) を用いて、マススペクトルの菌種識別精度を評価した。試料は、小麦の種をバーミキュライト上に蒔いて13日間栽培した苗とし、生理食塩水に浸してすり潰した。得られた上澄み液は、Potato Dextrose Agarに塗布して培養し、培養後に単離した菌株 (138株) をMALDI-TOF MSによって測定した。なお、マススペクトルと塩基配列情報から得られた結果は、それぞれSPECLUST softwareとMEGA5 softwareを用いて系統樹解析を行った。

16S rRNA 遺伝子に基づく塩基配列情報を取得した結果、Enterobacteriaceae, 2属; Pseudomonadaceae, 1属; Moraxellaceae, 1属; Curtobacterium, 1属が同定された。また、小麦から単離した菌株は、*Pseudomonas*属が優占的であり、次いで*Pantoea*属, *Acinetobacter*属, *Enterobacter*属の順であった。さらに、塩基配列情報における系統樹解析の結果、菌株を種レベルで分類することが可能であった。その一方で、マススペクトルによって菌株を分類したところ、グラム陽性の細菌である*Curtobacterium*属 (1株) のみ、グラム陰性好気性桿菌である*Pseudomonas*属と同じクラスターに分類された。その他の菌属は、マススペクトルによって菌株を正確に分類することが可能であった。*Azospirillum*属の3種は、菌種ごとに異なるクラスターを形成した。その中でも、*A. brasilense*は異なる野生型において、サブクラスターを形成したことから、マススペクトルを用いて種内多様性を評価できることが示唆された。これらのことから、MALDI-TOF MSは、細菌を正確に分類することが可能であり、幅広い分野に活用できることが考えられた。

第 234 回雑誌会

(Nov. 4, 2015)

(1) Influence of seawater intrusion on microbial communities in groundwater

Unno, T., Kim, J., Kim, Y., Nguyen, S. G., Guevarra, R. B., Kim, G. P., Lee, J. H. and Sadowsky, M. J.

Science of the Total Environment, **532**, 337-343 (2015).

Reviewed by K. Teranishi

韓国南部に位置する済州島では、海水流入による地下水の塩性化が深刻な問題となっている。地下水の塩性化は、地下水の電気伝導度を測定することによって、海水流入の影響を調査している。しかしながら、海水流入による地下水中の細菌叢への影響は明らかにされていない。そこで本研究では、次世代シーケンサーを用いて細菌叢を解析し、海水流入に伴う地下水中の細菌叢への影響を調査した。試料は、済州島内陸部の海水による影響のない地下水（地下水原水）、沿岸域における灌漑用の地下水（2 地点）、ならびに塩性化が進行している養殖用の地下水と、その近傍の海水とした。採取した試料から細菌の DNA を抽出し、次世代シーケンサーを用いて 16S rRNA の菌叢解析を実施した。得られた細菌の遺伝子配列情報は、遺伝子配列の類似度 97% で分類し、分類単位として Operational Taxonomic Units (OTUs) で表した。得られた OTUs は既存のデータベースと照合し、門、科、属レベルで細菌を同定した。さらに、地下水と海水から共通して検出された OTUs を対象として、クラスター解析を実施し、各地点の細菌叢の類似性を評価した。

各試料中の細菌叢を調査した結果、地下水原水では、地下水中から高頻度で検出される *Mycobacteriaceae* 科が優占して検出された。一方で、養殖用の地下水と海水からは、共通の細菌である *Flavobacteriaceae* 科が優占的に検出された。また、養殖用に使用される地下水からは、海洋細菌である *Parvularculaceae* 科が検出された。これらのことから、異なる地点から採取した試料中の細菌叢を解析することによって、環境域特有な細菌による影響を把握できることが明らかとなった。次に、クラスター分析によって、各試料中の細菌叢の類似性を評価したところ、養殖用の地下水と海水、ならびに地下水原水と灌漑用の地下水は同一のクラスターに形成された。各試料から検出された OTUs の種類を比較したところ、養殖用地下水の OTUs と海水中の OTUs では、6.7% が共通していた。その一方で、地下水原水と灌漑用の地下水からは、海水中の OTUs と共通して検出された OTUs の割合は極めて低かった (1.2%, 0.4%, 0.3%)。また、地下水原水から、灌漑用の地下水と共通した OTUs が多数検出されたのに対し (55.7%, 53.2%)、養殖用の地下水と共通した OTUs の割合は低かった (29.8%)。以上のことから、次世代シーケンサーを用いた遺伝子解析によって、海水流入に伴う地下水中の細菌叢への影響を把握できることが明らかとなった。

(2) Microbiome characterization of MFCs used for the treatment of swine manure

Vilajeliu-Pons, A., Puig, S., Pous, N., Salcedo-Dávila, I., Bañeras, L., Bañeras, D, M., Colprim, J.

Journal of Hazardous Materials, **288**, 60-68 (2015).

Reviewed by T. Hirai

微生物燃料電池 (Microbial fuel cells, MFCs) は、都市下水や工業排水に含まれる有機物や窒素を除去するとともに発電を行うことが可能である。現在、豚糞を原料とした MFCs の知見は、電気・化学的性能の最適化に関する研究に限られており、MFCs によって豚糞を処理した際の微生物群集構造は解析されていない。そこで本研究では、豚糞の上清を原料とし、構造が異なる 2 つの MFC における微生物群集構造を特徴付け、各 MFC の処理能力と発電量の関係を調べた。MFC の装置は、次の 2 通りとした：C-1、硝化と脱窒が異なる場所で行われる MFC；C-2、硝化と脱窒が同時に行われる MFC。運転期間は、150 日間とし、C-1 と C-2 のアノードとカソードの間には、それぞれ陰イオン交換膜と陽イオン交換膜を設置した。また、C-1 のアノード排水は、曝気を行う外部リアクターを経由してカソード区画へ流入させた。C-2 のカソード区画は、リアクターの中央から酸素の供給を行った。アノード、カソード、および外部リアクターで採取したサンプルの微生物群集構造は、PCR-DGGE 法と FISH 法によって解析した。

FISH 法と PCR-DGGE 法によって、C-1 と C-2 のアノードにおける微生物群集構造を解析した結果、有機化合物を分解する *Clostridium disporicum* と発電を行う *Geobacter sulfurreducens* が検出された。その一方で、C-1 と C-2 のカソードで検出された菌は、Bacteroidetes 門、Chloroflexiaceae 門、および Proteobacteria 門に属する独立脱窒菌であり、群集構造に多様性が認められた。C-1 と C-2 における MFC の有機物除去速度は、それぞれ $2.09 \pm 0.76 \text{ kg m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ と $2.02 \pm 0.57 \text{ kg m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ であった。また、窒素除去速度は、それぞれ $0.16 \pm 0.06 \text{ kg m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ と $0.11 \pm 0.05 \text{ kg m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ であり、顕著な差は見られなかった。一方で、C-2 のカソードにおける硝化速度 ($1.26 \pm 0.29 \text{ kg m}^{-3} \text{ d}^{-1}$) は、C-1 の外部リアクターにおける硝化速度 ($0.26 \pm 0.06 \text{ kg m}^{-3} \text{ d}^{-1}$) よりも大きかった。しかしながら、C-2 のカソードでは、 $0.31 \pm 0.14 \text{ kg m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ の速度で亜硝酸イオンが蓄積されていた。C-1 の外部リアクターと C-2 のカソードにおける亜硝酸酸化細菌の割合は、それぞれ 2~10% と 2% であった。また、C-1 と C-2 の NH_3 濃度は、それぞれ $17 \pm 6 \text{ mg/L}$ と $62 \pm 24 \text{ mg/L}$ であった。これらのことから、C-2 のカソードでは、陽イオン交換膜によって、 NH_3 濃度が増加し、亜硝酸酸化細菌の増殖が阻害されたと考えられる。

(3) Mechanisms for photoinactivation of *Enterococcus faecalis* in seawater

Sassoubre, L. M., Nelson, K. L., Boehm, A. B.

Applied and Environmental Microbiology, **78**, 7776-7785 (2012).

Reviewed by M. Uno

沿岸域におけるふん便汚染の指標細菌として、大腸菌や腸球菌が広く用いられている。しかしながら、水中の指標細菌の生存は、塩分濃度や溶存酸素量、特に日光照射の環境変化に影響を受ける。そのため、昼夜間で指標細菌の細菌数が大きく変動することが報告されている。水中の細菌は日光照射を受けて不活化し、そのプロセスは次の2つに大別される：①UVB(280~320 nm)によるDNAの損傷、②水中の酸素分子が光増感剤の光吸収に伴って変化した活性酸素による、細胞膜の酸化・損傷。しかしながら、各プロセスに焦点をおいて、海水中の腸球菌の動態を調査した研究事例はない。そこで本研究では、*Enterococcus faecalis* を対象として、水中の溶存酸素量の変化による日光不活化の動態を比較した。アメリカカリフォルニア州のビーチで採取した海水を用いて、有酸素または無酸素条件下の試料 200 mL を実験槽に貯留させ、*E. faecalis* を接種した。その後、疑似日光を照射し、一定時間ごとの腸球菌数を測定した。また、日光照射による腸球菌の酸化ダメージを確認するために、23S rRNA 遺伝子を対象とした qPCR 法、細胞膜透過性色素であるプロピジウムモノアジド (PMA) を用いた PMA-qPCR 法、および代謝活性のある細胞に由来する ATP を定量し生菌数を決定する、生物発光法を用いた。

遮光条件下における腸球菌の不活化率は、有酸素と無酸素実験槽においてそれぞれ、 $-0.008 \text{ m}^2/\text{kJ}$ と $-0.001 \text{ m}^2/\text{kJ}$ であった。その一方で、日光照射条件下における腸球菌の不活化率は、有酸素と無酸素実験槽においてそれぞれ、 $-0.3 \text{ m}^2/\text{kJ}$ と $-0.05 \text{ m}^2/\text{kJ}$ であり、有酸素条件下において有意に増加した ($p < 0.05$)。このことから、日光照射による腸球菌の不活化には水中の溶存酸素も寄与していることが示唆された。qPCR 法によって腸球菌の計数を行ったところ、有酸素実験槽における腸球菌の生残率は、日光照射量の増加に関わらず一定であった。また、PMA-qPCR 法によって腸球菌の計数を行ったところ、腸球菌の生残率は、無酸素条件下と比較して、有酸素条件下において有意に減少した ($p < 0.05$)。さらに、生物発光法を用いて腸球菌の計数を行ったところ、有酸素条件下において、日光照射による腸球菌の生残率が最も低下した。以上の結果から、日光照射による腸球菌の不活化は、UV-B による DNA の直接的な損傷と比較して、水中の酸素を介した細胞膜の損傷による影響を受けやすいことが示唆された。

第 235 回雑誌会

(Nov. 11, 2015)

(1) 元素分析による細粒土砂輸送割合の推定方法開発

石田 哲也, 早川 博, 中山 恵介, 岡田 知也, 丸谷 靖幸, 駒井 克昭, 堀田 伸之,
藤井 博司, 加藤 淳子

土木学会論文集 **68**, 637- 642 (2012).

レビュー：板清 智也

北海道オホーツク地方における常呂川は、流域全体に細粒土砂が分布しており、河口からの濁水および土砂流出に起因したホタテの斃死が問題となっている。そこで本研究では、常呂川における細粒土砂の生産場において土砂輸送割合を推定するモデルの開発を試みた。調査は、常呂川流域の小河川であるオロムシ川を対象とし、流域下流端に設置した三角堰において、濁度を計測した。また、流域の大部分を占める森林地および畑地への降雨の影響を考慮するために、両地点の雨量観測所で雨量を測定した。濁度から換算した SS 濃度に、降雨量と流域面積の積から算出した流量を乗じて土砂流出量を算出し、降雨による細粒土砂の生産・流出の特性を評価した。細粒土砂輸送の割合を推定するモデルは、流域に分布する細粒土砂試料の元素組成をもとに開発した。試料は、流域全体の表層土壌（18 地点）とオロムシ川下流端付近の河岸堆積物（1 地点）の計 19 試料とした。全試料について、蛍光 X 線（XRF）分析を行い、元素組成を調査した。また、強熱減量試験を実施し、求められた強熱減量の値を直接炭素（C）として測定した。その後、各地点の元素組成と河岸堆積物の差の平方和からモデルを作成し、各地点からの土砂輸送の割合を評価した。なお、土地利用を考慮するため、作成したモデルには輸送割合係数を新たに導入した。

土砂流出量を算出した結果、森林地の総流出土砂量 (2.36×10^8 mg h km²/L) は、畑地の総流出土砂量 (1.06×10^8 mg h km²/L) の 0.45 倍と算出され、畑地において土砂生産が顕著であった。そこで、土砂輸送割合を推定するモデルには、森林地に対する畑地の比（0.45 倍）を考慮した輸送割合係数を導入した。XRF 分析と強熱減量試験による各地点の元素組成についてみると、いずれの地点においても Al₂O₃、SiO₂、Fe₂O₃、および C の含有率が高い傾向を示し、全体の 85～93% を占めた。このことから、各地点における細粒土砂の特性は、類似していると考えられた。元素組成の結果をもとに作成したモデルを用いて推定した結果、各地域から河岸への土砂輸送割合は同程度と推定された。そこで、各地点における単位面積あたりの土砂輸送割合を求めたところ、上流域（5 地点）、中流域（4 地点）、下流域（3 地点）からの土砂流出が卓越していることがわかった。以上のことから、元素分析と土地利用を考慮した輸送割合係数を用いることによって、細粒土砂輸送割合を推定できると考えられた。

(2) 水道水中の従属栄養細菌の同定における DNA 塩基配列解析法と表現性状試験との比較

猪又 明子, 千葉 隆司, 保坂 三継
水環境学会誌 **31**(10), 609-614 (2008).

レビュー：今福 夕貴

従属栄養細菌の菌種同定には表現性状試験が広く用いられているが、分類できる菌種は少なく、従属栄養細菌を分類する新たな手法が必要である。近年、細菌の 16S rDNA 塩基配列を利用した菌種同定が数多く行われている。そこで本研究は、浄水場の浄水および給水栓水から単離した従属栄養細菌について、16S rDNA 塩基配列解析と表現性状試験を行い、両手法の菌種同定の精度を比較した。試料は、平成 18 年 5 月～6 月に採取した東京都内浄水場の浄水 28 検体、給水栓水 9 検体の合計 37 検体とした。各検体中の従属栄養細菌は、R2A 寒天培地 (22.5 °C, 7 日間培養) を用いて計数した。計数後、菌株を単離し、体温下における従属栄養細菌の増殖性を調査するため、再度、R2A 寒天培地に画線して 37 °C で 24 時間培養した。次に、羊血液寒天培地を用いて、37 °C で増殖した菌株を培養し、溶血性の有無を判定した。溶血性を示した菌株のうち、11 株から DNA を抽出し、MicroSeq 500 16S rDNA Bacterial Identification Sequencing Kit を用いて遺伝子解析を行った。得られた遺伝子配列は、既存のデータベース (Genbank) と照合し、細菌種を同定した。そして、表現性状試験による結果と、16S rDNA に基づく菌種同定の結果を比較した。

採取した浄水および給水栓水試料の 92 % (34/37) から従属栄養細菌が検出され、合計 120 株単離した。単離した 120 株のうち、37 °C で生育したのは 91 株 (75.8 %) であった。このことから、従属栄養細菌の多くは、体温下で増殖することが示唆された。37 °C で増殖が確認された 91 株のうち、39 株 (42.9 %) が溶血性を示した。全菌株に占める溶血性株の割合は 32.5 % であり、既報値 (36 %) と同程度であった。次に、溶血性を示した 39 菌株のうち 11 株について、16S rDNA 塩基配列解析を行ったところ、食中毒原因菌または日和見感染菌である *Staphylococcus* 属 4 株、*Micrococcus luteus* 3 株、*Bacillus* 属 2 株、*Mycobacterium fortuitum* subsp. *fortuitum* 1 株、*Cupriavidus metallidurans* 1 株が同定された。16S rDNA 塩基配列解析と表現性状試験による菌種同定を比較した結果、両検査の結果が一致した菌株は 1 株のみであった。このことから、表現性状試験による従属栄養細菌の同定は困難であり、16S rDNA 塩基配列に基づく菌種同定法は、従属栄養細菌を分類する有効的な手法であることが示唆された。

(3) *stx1* または *stx1+stx2* 遺伝子を保有する腸管出血性大腸菌 O157 による集団食中毒事例

村田 敏夫, 柳生 裕子, 三瓶 美香, 青木 敏也

日本食品微生物学会雑誌 31(1), 36-40 (2014).

レビュー: 上田 卓矢

腸管出血性大腸菌 (*enterohemorrhagic Escherichia coli*; EHEC) 感染症は、溶血性尿毒症症候群や脳症などの重篤な合併症によって死亡する可能性のある重要な疾患である。我が国においても、EHEC 感染症は、年間約 3000~4000 例報告されている。そこで本研究では、2011 年に山形市で発生した EHEC O157 による集団食中毒事例について、汚染源を調査した。本事例は、ある製造元が販売している団子または柏餅を喫食した 287 名が下痢、腹痛、血便などを呈する胃腸炎を発症した事例である。試料は、ふん便 464 検体 (患者 161 検体, 患者家族 300 検体, 従業員 3 検体) とした。各試料から、CT-SMAC 寒天培地とクロモアガー O157 寒天培地を用いて、EHEC O157 株を単離した。なお、1 検体から 2 コロニーずつ単離した。その後、PCR 法によって、*stx* 遺伝子を検出した。また、*stx* 保存の 39 株 [EHEC O157 (*stx1*); 10 株, EHEC O157 (*stx1+stx2*); 29 株] について、パルスフィールドゲル電気泳動法 (Pulsed-field gel electrophoresis; PFGE 法) によって遺伝子型を取得し、菌株間の類似性を評価した。さらに、EHEC O157 (*stx1+stx2*) 株を用いて、室温環境中での *stx* 遺伝子の脱落実験も行った。

ふん便 464 検体のうち、9 検体から EHEC O157 (*stx1*) が検出され、152 検体から EHEC O157 (*stx1+stx2*) が検出された。また、7 検体からは、EHEC O157 (*stx1*) と EHEC O157 (*stx1+stx2*) が 1 株ずつ検出された。次に、PFGE 法によって各菌株の遺伝子型を取得した結果、EHEC O157 (*stx1*) 株と EHEC O157 (*stx1+stx2*) 株は、類似パターンを示した。*stx* 遺伝子の脱落実験では、1 ヶ月後に EHEC O157 (*stx1+stx2*) 25 株中の 1 株で *stx2* 遺伝子の脱落株が確認され、3 ヶ月後には、8 株の *stx2* 遺伝子の脱落株と、1 株の *stx1* 遺伝子の脱落株が確認された。さらに、*stx2* 遺伝子脱落株 EHEC O157 (*stx1*) と患者由来の EHEC O157 (*stx1*) の遺伝子型は一致した。このことから、本事例において分離された EHEC O157 (*stx1*) 株は、EHEC O157 (*stx1+stx2*) 株から *stx2* 遺伝子が脱落した株であることが推測された。それに加えて、従業員のふん便検体から単離した全 59 株は EHEC O157 (*stx1+stx2*) であり、患者由来の EHEC O157 (*stx1+stx2*) の遺伝子型と一致した。しかしながら、従業員が最初から菌を保有していたのか、汚染された食品を喫食し感染したのかを判断することはできず、汚染源の特定には至らなかった。

第 236 回雑誌会

(Nov 18, 2015)

(1) Physiological and biochemical response of seaweed *Gracilaria lemaneiformis* to concentration changes of N and P

Jiang, Y. and Yu-Feng, Y.

Journal of Experimental Marine Biology and Ecology **367**, 142-148 (2008).

Reviewed by K. Nakada

紅藻の *Gracilaria lemaneiformis* は、富栄養化した海において、生態系を正常化する生物として知られている。現在、*G. lemaneiformis* の生化学的反応についての研究の多くは、低濃度の N と P の存在下で実施されている。しかしながら、高濃度の N と P の存在下において、*G. lemaneiformis* の生理学的かつ生化学的反応の特徴ならびに耐性を調査した研究例は極めて少ない。そこで本研究では、N/P 濃度をそれぞれ 0/0, 50/3.13, 100/6.25, 200/12.5, 400/25, 600/37.5 $\mu\text{mol/L}$ の 6 条件とし、*G. lemaneiformis* の比増殖率、生化学的特徴、および抗酸化酵素の防御システムについて、それぞれの変化を室内培養で調べた。試験は、約 3 g の *G. lemaneiformis* の藻体を各 N/P 濃度に 15 日間曝露し、培養の 3, 7 および 15 日目に各項目を測定した。比増殖率は、生体重の変化から算出した。生化学的特徴に及ぼす影響は、フィコエリトリン (PE)、クロロフィル a (Chla)、および可溶タンパク質の 3 つの判定指標から評価した。抗酸化酵素の防御システムに及ぼす影響は、スーパーオキシドジスムターゼ (SOD) の活性、ペルオキシターゼ (POD) の活性、カタラーゼ (CAT) の活性、およびマロンジアルデヒド (MDA) 量から評価した。

G. lemaneiformis の比増殖率を算出した結果、400/25 $\mu\text{mol/L}$ で比増殖率は最大となり、3, 7, および 15 日目での比増殖率は、対照区と比較して、それぞれ 149.62, 116.28, および 98.57% 増加した。ところが、最も高濃度の 600/37.5 $\mu\text{mol/L}$ では、比増殖率が著しく低下し、15 日目の比増殖率は対照区と比較して 252.53% 低下した。比増殖率と同様に、PE と Chla 量についても、全培養期間を通して、N/P 濃度が 400/25 $\mu\text{mol/L}$ のときに、PE と Chla 量が最大となった。抗酸化酵素の防御システムに及ぼす影響を検討したところ、比増殖率、PE、および Chla 同様に、SOD、POD、および CAT の活性は、400/25 $\mu\text{mol/L}$ の N/P 濃度で最大となり、600/37.5 $\mu\text{mol/L}$ では低下する傾向を示した。600/37.5 $\mu\text{mol/L}$ で各指標の値が低下する要因として、*G. lemaneiformis* の最大許容量を超えた N/P 濃度によって、*G. lemaneiformis* の細胞成分が損傷したためと考えられた。一方、MDA 量は、0/0 $\mu\text{mol/L}$ から 400/25 $\mu\text{mol/L}$ にかけて低下し、600/37.5 $\mu\text{mol/L}$ で増加する傾向を示した。以上の結果から、*G. lemaneiformis* の生長に対する N と P の閾値は、それぞれ 50-400 $\mu\text{mol/L}$ と 3.13-25 $\mu\text{mol/L}$ であることが示唆された。

(2) Use of MALDI-TOF mass spectrometry fingerprinting to characterize *Enterococcus* spp. and *Escherichia coli* isolates

Santos, T., Capelo, J. L., Santos, H. M., Oliveira, I., Marinho, C., Goncalves, A., Araujo, J.E., Poeta, P. and Igrejas, G.
Journal of Proteomics **127**, 321-331 (2015).

Reviewed by T. Matsuwaki

腸球菌と大腸菌は、多くの哺乳類、鳥類、爬虫類の腸管内における常在菌であり、ヒトへの感染症を引き起こす原因菌としても知られている。臨床現場における腸球菌と大腸菌の菌種同定試験は、生化学性状試験や分子生物学的手法が用いられる。しかしながら、これらの手法は、煩雑な処理や莫大なコストが必要となることから、迅速かつ低コストな同定技術の開発が望まれている。近年、イオン化飛行時間型質量分析計 (MALDI-TOF MS) は、細菌のリボソームタンパクの質量を測定することで菌種同定を行うことのできる手法として注目されている。そこで本研究では、MALDI-TOF MS を用いて、野鳥から単離した腸球菌と大腸菌を対象として菌種同定試験を行った。試料は、野鳥由来の腸球菌 (*E. faecalis* ; 18 株, *E. faecium* ; 15 株, *E. durans* ; 15 株, *E. hirae* ; 12 株) 合計 60 株と大腸菌 60 株とした。また、菌株は Brain Heart Infusion (BHI) 培地に生育したコロニーを MALDI-TOF MS によって解析し、マススペクトルを取得した。その後、菌種ごとに得られたマススペクトルについてクラスター解析と主成分分析法 (PCA) による統計解析を行い、マススペクトルの類似度を評価した。

すべての腸球菌株で、 m/z 4428 \pm 3 にピークが検出された。その一方で、大腸菌株からは検出されなかった。また、腸球菌を菌種別に見てみると *E. faecalis* , *E. faecium* および *E. hirae* は、種に特有のピークが検出された (*E. faecalis* ; m/z 6077 \pm 2 , 6857 \pm 1 , *E. faecium* ; m/z 6050 \pm 1 , 6888 \pm 2 , *E. hirae* ; m/z 6612 \pm 1 , 6844 \pm 1 および 7974 \pm 2)。しかし、*E. durans* は種に特有のピークは検出されなかった。クラスター解析によってマススペクトルの類似度を評価した結果、大腸菌は、単独のクラスターを形成した。しかし、腸球菌は、異なる菌種を含むクラスターを形成した。また、PCA によってマススペクトルの類似度を評価した結果、腸球菌と大腸菌は、属レベルで分類された。しかし、腸球菌の菌種レベルでは分類されなかった。これは、腸球菌種のマススペクトルの類似度が高かったためと推察された。以上のことから、MALDI-TOF MS は、腸球菌と大腸菌を属レベルで同定することが可能であると明らかになった。

第 237 回雑誌会

(Nov. 25, 2015)

(1) Characterization of fecal vancomycin-resistant enterococci with acquired and intrinsic resistance mechanisms in wild animals, Spain

Lozano, C., Gonzalez-Barrio, D., Camacho, M. C., Lima-Barbero, J. F., de la Puente, J., Höfle, U. and Torres, C.

Microbial Ecology, doi 10. 1007/s00248-015-0648-x (2015).

Reviewed by M. Nishiyama

腸球菌は、環境中への高い適合性を有し、様々な薬剤耐性遺伝子を獲得できることが知られている。その中でも、バンコマイシン耐性腸球菌 (vancomycin-resistant enterococci, VRE) には、獲得耐性と自然耐性が存在し、両面の特徴からVREを評価する必要がある。そこで本研究では、多様な環境中に生息する異なる野生動物から菌株を分離し、VREの存在実態を調査した。試料は、スペインの異なる地域に生息する野生動物の総排泄腔、または直腸を対象とし、合計348試料採取した：イノシシ81試料、鳥類267試料 (アカアシイワシャコ127試料、コウノトリ81試料、アカトビ59試料)。試料採取後、バンコマイシンを添加した腸球菌選択培地を使用して菌株を単離し、生化学性状試験とPCR法によって、菌種を同定した。菌種同定後、バンコマイシンを含む12種類の薬剤感受性試験を実施し、19種類の薬剤耐性遺伝子の検出を試みた。また、バンコマイシン耐性遺伝子の保有を確認した菌株について、各病原性遺伝子を検出した。さらに、MLST (multi-locus sequence typing) を実施し、野生株と臨床分離株との疫学的関連性を評価した。

野生動物から採取した348試料のうち、97試料 (27.9%) からVREが検出された：イノシシ4試料 (4.9%)、アカアシイワシャコ10試料 (7.9%)、コウノトリ38試料 (46.9%)、アカトビ42試料 (71.2%)。このうち、イノシシから採取した1試料のみ、獲得耐性である*vanA*保有VREが検出された。この試料から分離された菌株は、*Enterococcus faecium*であり、水平伝播に関わるトランスポゾンである*Tn1546*に*vanA*がコードされていた。さらに、MLSTによって評価した結果、臨床分離株との関連性は認められず、新規のST (Sequence Type) に分類された (ST993)。このことから、野生動物の腸管内に存在する腸球菌に、*vanA*の伝播が確認された。その一方、VREが検出された97試料のうち、96試料から自然耐性のVREである*Enterococcus gallinarum*と*Enterococcus casseliflavus*がそれぞれ、89株と7株検出された。また、大部分の*E. gallinarum*は、テトラサイクリンとエリスロマイシンのいずれかに対して耐性を示し、それぞれ66.3%と46.1%であった。以上のことから、獲得耐性である*vanA*保有VREは、自然環境のみならず、生息する野生動物にまで普及しており、世界中に拡散する可能性が考えられた。

(2) Metal accumulation and toxicity measured by PAM-Chlorophyll fluorescence in seven species of marine macroalgae

Baumann, H. A., Morrison, L. and Stengel, D. B.

Ecotoxicology and Environmental Safety, **72**(4), 1063-1075 (2009).

Reviewed by S. Hirayama

近年、フィールド調査において、植物の光合成能の評価にパルス変調クロロフィル蛍光分析が使用されており、汚染物質の毒性評価への応用も期待されている。しかしながら、パルス変調クロロフィル蛍光を利用した海藻への毒性評価に関する定量的なデータは乏しい。そこで本研究では、7種の海藻を供試生物として、パルス変調クロロフィル蛍光による金属の毒性評価と金属蓄積量の測定を室内実験で実施し、毒性と金属蓄積量の関係性を調査した。供試生物の海藻は、褐藻門2種(*Ascophyllum nodosum* と *Fucus vesiculosus*)、緑藻植物門2種(*Ulva intestinalis* と *Cladophora rupestris*)、および紅色植物門3種(*Chondrus crispus*, *Palmaria palmata*, および *Polysiphonia lanosa*)とした。試験水は、5種類の金属(Cu, Cr, Zn, Cd, Pb)を0, 0.1, 1, および10 $\mu\text{mol/L}$ の各4濃度区に調整し、藻体を14日間暴露して試験を実施した。パルス変調クロロフィル蛍光は、試験開始時と4, 7, および14日目に測定し、各測定日の量子収量値を算出して毒性を評価した。藻体への金属蓄積量と培地中の金属濃度は、試験終了後に測定した。

10 $\mu\text{mol/L}$ のCuとCdに暴露された藻体の量子収量値は、海藻種によって違いが認められ、両物質に対して影響が認められた海藻種は、*P. palmata*のみであった。10 $\mu\text{mol/L}$ のCrとZnに暴露された藻体の量子収量値は、すべての供試生物において、4日目に0まで低下した。その一方で、いずれの海藻種に対しても、試験期間を通してPbの影響は認められなかった。藻体への金属蓄積量を測定した結果、10 $\mu\text{mol/L}$ の金属溶液に暴露した場合のCu, Zn, およびPbの蓄積量は、*U. intestinalis*で最も高く、1~27 $\mu\text{mol/g}$ と算出された。Cu, Cr, Cd, およびPbの蓄積量は、10 $\mu\text{mol/L}$ の金属溶液に暴露された場合にすべての海藻種において、最も高くなる傾向を示した。これに対して、Znは10 $\mu\text{mol/L}$ に暴露された場合と比較して、0~1 $\mu\text{mol/L}$ に暴露された場合にすべての海藻種で、蓄積量が高くなった。この要因として、10 $\mu\text{mol/L}$ のZnに暴露された藻体は、4日目までに死滅し、その後の10日間に暴露液中へZnを放出したためと考えられた。14日目の量子収量値と金属蓄積量の間関係を調査したところ、両者の関係は海藻種ならびに金属種によって変化し、両者に普適的な関係性は認められなかった。

(3) Population structure of *Cladophora*-borne *Escherichia coli* in nearshore water of Lake Michigan

Byappanahalli, M. N., Whitman, R. L., Shively, D. A., Ferguson, J., Ishii, S., Sadowsky, M. J.

Water Research, **41**, 3649-3654 (2007).

Reviewed by Y. Ota

近年、緑藻シオグサ属植物である *Cladophora* から大腸菌が高濃度で検出されることが報告されている (10^4 CFU/g)。しかしながら、既往の研究では、サンプル数が少なく、地理的、空間的情報が不十分であるため、*Cladophora* と大腸菌数の関連性は明らかになっていない。そこで本研究では、*Cladophora* 中に存在する大腸菌の地理的・空間的变化を明らかにし、ヒト・動物由来の大腸菌との類似性を比較した。試料は、ミシガン湖に設置されている防波堤を基点として、右岸（水路側）と左岸（ミシガン湖側）の2地点から *Cladophora* を採取した。調査は、2003年5月～8月の期間において、月ごとに5サンプル採取した。また、*Cladophora* 中の大腸菌は mTEC 培地を用いて計数し、各サンプルの単離株（879株）は、Horizontal fluorophore-enhanced rep-PCR（HFERP）を用いて遺伝子型を取得した。さらに、得られた遺伝子型は、ヒトならびに動物由来である大腸菌の遺伝子型とともに、系統樹解析、ジャックナイフ分析、および MANOVA 分析に供し、遺伝子型間の類似性を評価した。

各サンプル中の大腸菌数は、ミシガン湖側 (2.55 ± 0.1 CFU/g, $n=417$) と比較して、水路側から高濃度 (3.09 ± 0.12 CFU/g, $n=418$) で検出された。HFERP によって、*Cladophora* から単離された大腸菌 879 株から 357 通りの遺伝子型が取得され、系統樹解析によって 13 のグループに分類された。また、大腸菌の遺伝子型は、地点ごとに固有の遺伝子型が高い割合で一致した（水路；79%，ミシガン湖；80%）。一方で、水路側とミシガン湖側で共通の遺伝子型を持つ大腸菌の割合は低かった（20%）。このことから、大腸菌は、地点ごとに特有な遺伝子型を有することが明らかとなった。また、MANOVA 分析によって、*Cladophora* 中の大腸菌とヒト・動物由来の大腸菌との遺伝子型を比較した結果、類似性は認められなかった。以上のことから、大腸菌の起源は明らかにされなかったが、*Cladophora* 中の大腸菌は、地点ごとに固有の遺伝子型を有することが明らかとなった。

第 238 回雑誌会

(Dec. 2, 2015)

(1) Growth-dependent photoinactivation kinetics of *Enterococcus faecalis*

Maraccini, P. A., Wang, D., McClary, J. S., Boehm, A. B.

Journal of Applied Microbiology, **118**, 1226-1237 (2015).

Reviewed by M. Uno

腸球菌は、沿岸域におけるふん便汚染の指標として、広く用いられている指標細菌である。その一方で、環境水中における指標細菌の細菌数は昼夜間で大きく変動することから、指標細菌の生存は日光に依存する。そのため、ヒトの健康リスクを管理する上で、日光照射による指標細菌の動態把握が極めて重要である。近年、細菌の日光不活化の挙動は、生理的状態の異なる増殖ステージによって変化することが報告されている。しかしながら、細菌の増殖ステージに焦点を置いて、腸球菌の日光不活化の挙動を調査した事例はない。そこで本研究では、*Enterococcus faecalis* を対象として、4 段階（対数期、定常期初期、定常期中期、定常期後期）の増殖ステージと日光不活化の関係性を調査した。試料は、炭酸緩衝生理食塩水（CBS）にバッチ培養法と連続培養法を用いて、増殖ステージを調整した *E. faecalis* を接種し、これを試料とした。その後、疑似日光（放射照度：400 W/m²）を照射し、一定時間ごとの細菌数を測定した。得られた細菌数と日光照射時間から回帰直線を作成し、直線の傾きを不活化速度定数 k (min⁻¹) とした。そして、ANOVA 分析によって、増殖ステージの変化による k への影響を評価した。また、UV-B(280~320 nm)による細菌の不活化の動態を評価するために、特定の波長範囲の光のみを通過することのできるフィルターを用いた。

日光照射した場合と遮断した場合の k はそれぞれ、 $3.6 \times 10^{-1} \sim 6.4 \times 10^{-1}$ min⁻¹ と 3.1×10^{-4} min⁻¹ であり、日光照射を受けて腸球菌数は有意に減少した ($P < 0.05$)。4 段階の増殖ステージにおける *E. faecalis* の k を比較した結果、各増殖ステージと k の間に、有意な差は認められなかった ($P > 0.05$)。その一方で、UV-B を遮断した場合、対数期にある *E. faecalis* の k が最小となり、*E. faecalis* の増殖ステージと k の間に、有意な差が認められた ($P < 0.03$)。このことから、増殖速度の大きい対数期にある *E. faecalis* を用いて k を算出した場合、日光照射による腸球菌の生残性を過大評価する可能性が示唆された。また、培養方法の違いにおける、*E. faecalis* の k を比較した結果、連続培養法を用いた場合、バッチ培養法を用いた場合と比較して、サンプル間の k のばらつきが小さい傾向を示した。以上の結果から、UV-B 以外の波長による腸球菌の不活化の動態は、細菌の増殖ステージによって、変化することが示唆された。

(2) Estimating water quality using linear mixed models with stream discharge and turbidity

Lessels, J. S, Bishop, T. F. A.

Journal of Hydrology, **489**, 13-22 (2013).

Reviewed by K. Kihara

河川流域における栄養塩濃度の推定は、定期的な平水時のサンプリングに基づく予測が広く実施されている。オーストラリア南東部の河川流域の栄養塩濃度は、突発的な嵐イベントによって特徴付けられており、定期調査データに基づいた栄養塩濃度の推定値の正確性が懸念されている。そこで本研究では、オーストラリア南東部の2つの河川流域（Wollondilly, Coxs）を対象として、栄養塩（全窒素；TN，全リン；TP）を推定するための線形混合型モデル（LMM）の有用性を評価した。調査は、1991年～2008年にかけて流量および濁度を連続観測した。また、月に一回のサンプリングと嵐イベント時の採水を実施し、酸分解法を用いてTNとTPを分析した。LMMは一個抜き交差検定（LOOCV）と嵐イベントの交差検定（ECV）に基づき、以下の異なる4つの共変量を用いて作成し、TNとTPを推定した：モデル1，流量；モデル2，流量および流量の導関数；モデル3，濁度；モデル4，モデル2とモデル3の混合型。その後、TN，TP濃度の実測値とLMMによる推定値との残差平均平方誤差（RMSE）を算出し、LMMの有用性を評価した。

Wollondilly および Coxs における栄養塩濃度と流量からモデル1を算出したところ、いずれの河川においても、低流量時にTPおよびTNのばらつきが大きい傾向を示した（ $R^2=0.28\sim 0.44$, $R^2=0.42\sim 0.45$ ）。このことから、流量のみを共変量とした場合、高流量時のTNおよびTPを過小評価する可能性が考えられた。そこで、流量に加えて流量の導関数を共変量としたモデル2を算出すると、Wollondilly と Coxs におけるTPとTNのLOOCVを用いたRMSE値（0.73, 0.39, 0.75, 0.58）は、モデル1のRMSE値（0.78, 0.41, 0.82, 0.60）と比較していずれも低下した。また、濁度を共変量としたモデル3のLOOCVを用いたRMSE値（0.62, 0.33, 0.62, 0.47）では、モデル2のRMSE値よりもさらに低下した。モデル4については、モデル3と比較してLOOCVのRMSE値に顕著な違いは確認されなかった。したがって、栄養塩の推定において、濁度は有用な共変量であることが明らかとなった。これに対して、ECVに基づくRMSE値についてみると、モデル3からモデル4にかけてRMSE値は低下した。以上のことから、オーストラリアのWollondilly と Cox 流域では、嵐イベントや平水時の流量と濁度を共変量としたモデルによって、嵐イベントにおける栄養塩の濃度をより正確に推定できることがわかった。

(3) Detection and diversity of aeromonads from treated wastewater and fish inhabiting effluent and downstream waters

Topic, P. N., Kazazic, S. P., Strunjak-Perovic I., Barisic, J., Sauerborn, K. R., Kepec, S. and Coz-Rakovac, R.

Ecotoxicology and Environmental Safety, **120**, 235-242 (2015).

Reviewed by K. Niina

Aeromonas 属は、グラム陰性の桿菌であり、河川、土壌、および魚介類等に広く分布している。特に、*A. hydrophila* は、腸管系感染症や尿路感染症を引き起こす起因菌としても知られており、菌の増殖が活発な夏期において水系感染のリスクを高める危険性がある。そこで本研究では、下水処理場（WWTP）の放流水が流入するクロアチアの Drava 川流域を対象とし、MALDI-TOF MS と API 20E を用いて *Aeromonas* 属における種の多様性を分析した。各調査地点について、以下の地点から試料を採取した：WWTP の上流 (St.1)；流入下水 (St.2)；糖科植物由来の農業排水 (St.3)；放流水 (St.4)；放流水が流入後の下流 (St.5~9)；WWTP における活性汚泥 (St.10)；汚泥貯留槽 (St.11)。また、St.1, St.5, および St.9 では、コイ科に属する淡水魚である Prussian carp の肝臓、腎臓、およびエラを採取した。各試料は春期と夏期に採取し、ふん便指標細菌である大腸菌群、大腸菌、および腸球菌をメンブレンフィルター法で計数した。*Aeromonas* 属は、Tryptone soya agar を用いて単離した後、簡易検査 kit によって同定試験を行い、陽性を示したコロニーのみを分析に供した。得られた菌株は、MALDI-TOF MS 分析からマススペクトルを取得し、Biotyper3.0 を用いて菌種同定試験を行った。なお、質量取得範囲 (m/z) は 2,000-20,000 とした。

春期における St.1 のふん便性大腸菌群数は、St.5~9 と比較して 1 オーダー高い値を示した。また、大腸菌は春期と夏期ともに全調査地点から検出された。各調査地点から採取した Prussian carp のサンプルからは、ふん便性大腸菌群と大腸菌は検出されなかった。その一方で、St.5 から採取した Prussian carp のみに、腸球菌が検出された。本研究において検出されたふん便指標細菌と *Aeromonas* 属との間に有意な相関はなかった。MALDI-TOF MS を用いて、*Aeromonas* 属における種の組成を分析した結果、試料水と Prussian carp は、それぞれ 8 菌種と 6 菌種で構成されていた。また、各試料ともに *A. veronii* が優占種であった。これに対して、API 20E を用いた *Aeromonas* 属の分析結果では、大きく 2 つのグループに大別され、種まで同定することは困難であった。これらのことから、*Aeromonas* 属は、MALDI-TOF MS を用いることによって種の多様性を分析することが可能であった。

第 239 回雑誌会

(Dec. 11, 2015)

(1) Comparison of the occurrence and survival of fecal indicator bacteria in recreational sand between urban beach, playground and sandbox settings in Toronto, Ontario

Staley, Z. R., Robinson, C. and Edge, T. A.

Science of the Total Environment, **541**, 520-527 (2016).

Reviewed by K. Teranishi

近年、レクリエーション水域における砂浜や公園の砂場からふん便指標細菌 (FIB) が検出されており、利用者の健康被害が懸念されている。また、砂浜中の FIB は、水中と比較して長期間生残することが報告されている。しかしながら、砂浜と公園の砂場における FIB の存在実態に関する報告は少なく、砂中の生残性を調査した事例はほとんどない。そこで本研究では、カナダの Sunnyside Park を対象として、砂浜と公園の砂場中における FIB の存在実態、ならびに砂中の FIB の生残に影響を及ぼす要因を検討した。試料は、Sunnyside Park 内における砂浜の前浜 (波打ち際から 1 m) と後浜 (波打ち際から 10 m) の 2 地点、および公園の砂場 4 地点から、2014 年の 6 月から 10 月の期間に計 13 回採取した。各試料中の FIB (大腸菌群, 大腸菌, 腸球菌) は、最確数法とメンブレンフィルター法を用いて計数した。また、各砂試料の含水比を測定し、重回帰分析によって、含水比が FIB 数に与える影響を評価した。次に、各地点に存在する FIB の起源を調査するため、ヒト、犬、および鳥に特有な遺伝子を有する *Bacteroidales* と *Catelliboccus* を対象としたプライマー (HF183, DG37, qGull4) を用いて定量 PCR 法を実施した。さらに、砂浜から単離した大腸菌を用いて、異なる浜砂の粒径 (0.23 mm, 0.53mm) と温度条件下 (15°C, 28°C) における環境の模擬実験を実施し、大腸菌の生残性を評価した。

砂浜と砂場中の大腸菌群, 大腸菌, および腸球菌の数を比較したところ、いずれの FIB も前浜から最も多く検出された。砂試料の含水比は、前浜がその他の地点と比較して最も高く、砂浜と砂場中の FIB 数と含水比の間には有意な相関関係が認められた ($P < 0.001$)。このことから、砂中の FIB 数は、含水比に強く影響を受けていることが示唆された。定量 PCR 法によって、各試料中における 3 種の遺伝子の有無を確認したところ、砂浜と砂場の両者から qGull4 遺伝子のみが検出された。このことから、Sunnyside Park 内に存在する FIB は鳥由来であることが示唆された。また、砂浜から単離した大腸菌の生残性について模擬実験によって評価した結果、粒径が小さく (0.23 mm)、かつ低温度条件下 (15°C) においてのみ、大腸菌数は変化しなかった。その他の条件では、菌株を接種した 28 日後に、接種した菌数と比較して 4 オーダー減少した。このことから、砂中における大腸菌の生残性は、砂の粒径と温度に影響を受けることが示唆された。

(2) COD removal characteristics in air-cathode microbial fuel cells

Zhang, X., He, W., Ren, L., Stager, J., Evans, P. J. and Logan, B. E.
Bioresource Technology, **176**, 23-31 (2015).

Reviewed by T. Hirai

微生物燃料電池 (Microbial Fuel Cells, MFCs) は、新たな排水処理技術として注目されている。既往の研究によると、MFC の最大電流密度は、回分培養の初期において計測される。その一方で、電流密度は、時間の経過とともに変化するため、回分培養中における COD 濃度と電流密度の関係を知る必要がある。そこで本研究では、酢酸と生活排水を用いて、エアカソード MFC において運転条件の変化に伴う、除去速度、電流生産、およびクーロン効率への影響を比較した。酢酸は、0.3 g/L (COD 濃度 : 260 mg/L) と 1.0 g/L (COD 濃度 : 840 mg/L) の 2 種類を使用した。また、生活排水は、下水処理プラントにおける最初沈殿地のオーバーフローを使用した。外部抵抗は、開回路 (0Ω), 100Ω, および 1000Ω とし、1 つの条件について 4 基の MFC (MFC1, MFC2, MFC3, MFC4) を作製した。酢酸を用いた MFC のサンプリング期間は、2, 4, 6, 8, 10, 12, 23, および 48 時間目とし、採取したサンプルの COD 濃度を測定した。なお、生活排水を用いた MFC は、2, 4, 8, 10, および 24 時間目に行った。

0.3 g/L の酢酸を用いて運転を開始した 8 時間目のサンプリングにおいて、開回路、100Ω, および 1000Ω に接続した MFC の COD 濃度は、それぞれ 167 ± 10 mg/L ($n=4$), 58 ± 11 mg/L, および 108 ± 12 mg/L であった。しかしながら、48 時間目における COD 濃度は、開回路 47 ± 11 mg/L ($n=4$), 100Ω 57 ± 13 mg/L, および 1000Ω 24 ± 15 mg/L であり、1000Ω の外部抵抗を用いた MFC が最も高い COD 除去率 (91%) を示した。また、基質として生活排水を用いた MFC は、100Ω と 1000Ω における COD 濃度の減少速度が類似した傾向を示した。8 時間後における 100Ω と 1000Ω を用いた MFC の COD 濃度は、それぞれ 51 ± 4 mg/L と 52 ± 5 mg/L であり、COD 濃度の減少速度は同程度であった。0.3 g/L の酢酸と生活排水は、COD 濃度が 200 mg/L 以下まで減少した時点で、電力密度が急激に減少した。また、1.0 g/L の酢酸の COD 濃度は、100 mg/L 以下まで減少した時点で、電力密度が急激に減少した。これらのことから、電流密度は、基質が完全に枯渇する前に、低下することが示された。以上の結果から、本研究で用いた MFC は、生活排水からエネルギーを回収できることが確認された。しかしながら、さらに COD 濃度を減少させるためには、後処理が必要となる。

第 240 回雑誌会

(Dec. 16, 2015)

(1) Mineralogical and geo-chemical characterization of a diapiric formation in the North of Spain

Gonzalez, C., Valverde, I. and Lafuente, A. L.

Catena, **70**, 375-378 (2007).

Reviewed by T. Itakiyo

ダイアピルは流動性のある岩石が比重の差によって押し上がり、上から覆っている地層を突き抜ける構造である。ダイアピルは地学や資源探査と強く関連しており、地質学の面から広く研究がされてきた。しかしながら、ダイアピルを形成する土壌を化学的観点から扱った事例は見当たらない。そこで本研究では、地中海性気候に位置するスペイン北部のバスク・カンダブリア盆地を対象として、その南部に位置するダイアピルの鉱物組成の特徴付けと化学組成の同定を行った。また、気候による風化作用に関連する鉱物の起源と進化について調査した。試料は、輝緑岩に由来する 3 土壌 (Ph1~Ph3)、粘土質の泥灰土に由来する 3 土壌 (Ma1~Ma3)、および石膏質の泥灰土に由来する 1 土壌 (My1) から、それぞれ土壌を採取し、合計 7 試料とした。全試料は、粉末 X 線回折 (XRD) 分析によって粘土鉱物を同定した。また、原子吸光 (ASS) 分析を用いて総元素を測定した。さらに、原子発光分光 (ICP) 分析を用いて Al, Fe, Mn, および Si の含有量を測定した。

XRD分析によって各地点の粘土鉱物を同定した結果、Ph1~Ph3における主要な含有鉱物は、パーミキュライト、緑泥石、斜長石、輝石、および黒雲母であり、特にパーミキュライトおよび緑泥石が高い割合で存在した。Ma1~Ma3およびMy1における含有鉱物は、黒雲母と緑泥石の含有率が高く、全体の10%から60%以上を占めた。なお、一般的に黒雲母や輝石は、輝緑岩の主要な含有鉱物である。また、緑泥石は斜長石の分解や黒雲母の熱水変質によって生成するとの報告がある。このことから、Ph1~Ph3と同様に、Ma1~Ma3およびMy1についても輝緑岩に由来する土壌であることが示唆された。そこで、Ph1~Ph3における岩石の起源を特定するために、ASS分析によって、Ph1~Ph3における土壌の総元素を測定したところ、SiO₂の含有率が全体の35%~49%と低い傾向を示す玄武岩の特徴を有していた。したがって、輝緑岩に由来する土壌のPh1~Ph3は、玄武岩起源であることが示唆された。また、ICP分析の結果、Si, Al, Feの割合が著しく低く (Si+Al+Fe < 1%), 地中海における半乾燥気候の影響を受けた砂質土の特徴が顕著であった。以上のことから、地中海地域のダイアピルの岩層上に土壌は、起源である玄武岩の特性と地中海の気候特性の影響によって形成されると考えられる。

(2) Evaluation of water sampling methodologies for amplicon-based characterization of bacterial community structure

Staley, C., Gould, T. J., Wang, P., Phillips, J., Cotner, J. B. and Sadowsky, M. J.
Journal of Microbiological Methods **114**, 43-50 (2015).

Reviewed by Y. Imafuku

次世代シーケンサーとは、一度に多種の細菌を同定可能な技術である。次世代シーケンシング技術の進歩は、環境中（土壌、下水）の細菌叢を低コストかつ迅速に解析することを可能にした。しかし、サンプル量、DNA 抽出キット、および対象とする遺伝子領域の違いによる細菌叢解析への影響は明らかになっていない。そこで本研究では、河川水中の細菌叢を把握するために、異なるサンプル量から得られる細菌遺伝子の量を比較し、DNA 抽出法と遺伝子領域の違いによる細菌叢解析への影響を評価した。調査は、2011 年～2014 年にかけて、ミシシッピ川の上流から下流に至る 11 地点を対象とした。実験に供した河川水量は、1, 2, および 6 L とした。水試料から、2 種類の DNA 抽出キット（Metagenomic DNA Isolation Kit for Water, PowerSoil Kit）を用いて細菌の DNA を抽出し、次世代シーケンサー（Illumina）を用いて遺伝子解析を実施した。得られた細菌遺伝子は、既存のデータベースを基に分類し、Operational Taxonomic Units（OTUs）で表した。対象とする遺伝子増幅領域は、16S rDNA 遺伝子の V6 領域または V4-V6 領域とした。各試料から得られた細菌叢の類似性は、ANOVA 分析、AMOVA 分析、および ANOSIM 分析によって評価した。

異なる河川水量（1, 2, および 6 L）から得られた細菌叢の構成は類似した。一方、河川水量 6 L の河川水量から検出された *Methylophilales* と *Synergistales* の存在量は、1 L と比較して有意に低かった（1 L ; $P=0.011$, 6 L ; $P=0.031$ ）。このことから、河川を対象とした次世代シーケンサーによる細菌叢解析には、2 L 以上の河川水が適当であることが示された。次に、2 種類の DNA 抽出キットから得られた細菌属の割合と OTUs の数を比較したところ、両手法の OTUs の数との間に、有意な差は認められなかった（ $P=0.076$ ）。また、両手法の優占種は、*Actinomycetales* と *Burkholderiales* であり、DNA 抽出キットによる細菌叢解析への影響は小さいことが明らかとなった。対象とする遺伝子増幅領域の違いによる遺伝子解析への影響を比較した結果、得られた細菌数は V6 領域を対象とした場合は 1158 ± 228 OTUs（ $n=22$ ）であり、V4-V6 領域を対象に遺伝子解析した場合（ 2517 ± 1003 , $n=22$ ）を比較して、OUTs は優位に高かった（ $P<0.001$ ）。以上のことから、河川環境中の細菌叢を把握するためには、少なくとも 2 L 以上の河川水が必要であり、16S rDNA の V4-V6 領域を対象とした遺伝子増幅領域が、最適であることが示された。

(3) Impact of urbanization and agriculture on the occurrence of bacterial pathogens and *stx* genes in coastal waterbodies of central California

Walters, S. P., Thebo, A. L., and Boehm, A. B.

Water Research, **45**, 1752-1762(2011).

Reviewed by T. Ueda

沿岸水域は、陸域から河川を通じて排水が流入するエリアである。近年、沿岸水中から、*Salmonella* を含む病原細菌が検出され、ヒトの健康被害が懸念される。しかしながら、同時に複数の水域における、ふん便指標細菌および病原細菌の存在と、土地利用との関係を調査した研究例は少ない。そこで本研究では、アメリカのカリフォルニアの沿岸水域を対象とし、ふん便指標細菌数（腸球菌、大腸菌）、病原細菌（*Salmonella*）、および *stx* 遺伝子の発現と、土地利用および環境要因（降雨、水温、塩分濃度）の影響について調査した。試料は、カリフォルニア中央部の河口 14 地点における河川水とし、2008 年 1 月から 2009 年 11 月にかけて、約 6 週間おきに採取した。各流域の土地利用は、2001 NOAA Coastal Change Analysis Program を用いて、都市部 3 地点、農地 3 地点、森林 8 地点に分類された。また、メンブレンフィルター法を用いて、腸球菌と大腸菌の菌数を計数し、大腸菌の菌株に対して、*stx1* および *stx2* を標的とした PCR 法によって、*stx* 遺伝子の検出を行った。*Salmonella* は、キシロース・リシン・デオキシコレート（XLD）選択培地を用いて、検出した。なお、2009 年 7 月分の腸球菌 14 サンプルは、培地に不備があったため、サンプル数から除外した。

腸球菌は、サンプルの 80%（181/227）から検出され、大腸菌は、92.5%（223/241）、*Salmonella* は、30.7%（74/241）から検出された。*stx* 遺伝子は、大腸菌の 11.2%（25/223）から検出された。また、腸球菌、大腸菌、および *Salmonella* は、都市部のサンプルから、最も高濃度・高頻度で検出された。このことから、都市部に関連した汚染源が、腸球菌、大腸菌、および *Salmonella* に対して強い影響を及ぼしている可能性が考えられた。また、各地点の細菌数（腸球菌、大腸菌、*Salmonella*）は、降雨イベント発生後に増加傾向を示した。さらに、水温と塩分濃度が低い地点において、細菌数は、増加傾向を示した。このことから、環境要因の変化によって、腸球菌、大腸菌、および *Salmonella* 数は、変動すると考えられる。以上のことから、各地点の流域における、土地利用および環境要因は、沿岸水域のふん便指標細菌数、病原細菌数、および *stx* 遺伝子の発現に影響を及ぼしていることが示唆された。

第 241 回雑誌会

(Dec 25, 2015)

(1) Multi-scale temporal and spatial variation in genotypic composition of *Cladophora*-borne *Escherichia coli* populations in Lake Michigan

Badgley, B. D., Ferguson, J., Vanden Heuvel, A., Kleinheinz, G. T., McDermott, C. M., Sandrin, T. R., Kinzelman, J., Junion, E. A., Byappanahalli, M. N., Whitman, R. L., Sadowsky, M. J.

Water Research, **45**, 721-731 (2011).

Reviewed by Y. Ota

近年、ミシガン湖に生息する緑藻シオグサ属 *Cladophora* から、大腸菌が高濃度で検出されている ($10^3 \sim 10^6$ CFU/g)。既往の研究では、湖中の岩に付着している *Cladophora* から検出されている大腸菌の遺伝子型は、ヒトや動物由来とは異なることが報告されている。また、湖水中に浮遊する *Cladophora* 中にも大腸菌が含まれていることが報告されているが、遺伝子型の分析は行われていない。そこで本研究では、湖水中に浮遊する *Cladophora* および湖水中に存在する大腸菌の地理的・時間的変化を明らかにし、大腸菌の変動を調査した。試料は、2007年～2009年の期間において、ミシガン湖西部の4地点から、*Cladophora* と *Cladophora* マット内、およびマット周囲の湖水を4日間連続で採取した。各試料中の大腸菌数は、mTEC培地を用いて計数し、各サンプルの単離株(4285株)については、Horizontal fluorophore-enhanced rep-PCR (HFERP)を用いて遺伝子型を取得した。さらに、得られた遺伝子型は、系統樹解析、ジャックナイフ分析、およびMANOVA分析によって、遺伝子型間の類似性を評価した。

Cladophora マット内とマット周囲の湖水中の大腸菌数はそれぞれ、4～36 CFU/100 mL, 81～2600 CFU/100 mL であり、*Cladophora* マット内の湖水中において高濃度で検出された。大腸菌遺伝子型の系統樹解析によって、2007年の1地点より得られた大腸菌は、遺伝子型が多様であることが分かった。また、MANOVA分析より、地点ごとの大腸菌の遺伝子型の間には、有意な差は認められなかった。その一方で、各サンプルの大腸菌は、年ごとに遺伝子型を比較すると、年ごとに特有な遺伝子型を有していることが明らかとなった ($p < 0.001$)。さらに、各サンプル、各採取日の遺伝子型において、有意な差が認められ、シャノン多様性指数もそれぞれ3.8～4.8, 2.6～4.8と高い数値となった。このことから、各サンプル中には、長期的存在する特有の遺伝子型を有する大腸菌と、短期的に存在する大腸菌が共存していると示唆された。以上のことから、浮遊する *Cladophora* は大腸菌の供給源を担っており、*Cladophora* 中に含まれる大腸菌はほとんどが毎日変動していることが明らかとなった。

(2) Growth and pigment content of *Gracilaria tikvahiae* McLachlan under fluorescent and LED lighting

Kim, J. K., Mao, Y., Kraemer, G. and Yarish, C.

Aquaculture **436**, 52-57 (2015).

Reviewed by K. Nakada

Light-emitting diodes (LED) は、エネルギー効率の良い最新の光資源として知られており、最近では園芸産業へ利用されている。しかしながら、藻類の LED 利用に関する報告は、数例に限られている。そこで本研究では、蛍光灯、純粋な単一の LED、および様々な色を混合した LED が *Gracilaria tikvahiae* の生長および色素濃度に及ぼす影響を検討した。実験には、天然株と緑色変異株の *G. tikvahiae* の葉状体を用いた。天然株と緑色変異株の生長率は、それぞれ 0 日目から 7 日目と 0 日目から 4 日目の湿重量の変化から算出した。各光資源に対する色素濃度の影響は、供試体におけるクロロフィル a、カロテノイド、フィコエリトリン、およびフィコシアニンの 4 つの指標から評価した。各実験において、様々な色を混合した LED には、2 色混合した LED と 3 色混合した LED を使用した。2 色混合した LED では、各色の割合を、赤と青、赤と緑、および青と緑のそれぞれ 50% : 50% の割合とした。3 色混合した LED の場合には、各色の割合を、赤 : 青 : 緑、青 : 緑 : 赤、および緑 : 赤 : 青のそれぞれ 40% : 40% : 20% の割合とした。なお、各実験は、光強度 $100 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (明期 : 暗期 = 12h : 12h) の条件で実施した。

蛍光灯、赤色 LED、および緑色 LED で培養された天然株の *G. tikvahiae* の生長率は、それぞれ 17.1, 13.7, および 13.3% d^{-1} であった。その一方で、青色 LED で培養された *G. tikvahiae* の生長率は、5.8% d^{-1} となり、他の光資源と比較して著しく低い値を示した。また、青色 LED で培養された緑色変異株の生長率は、さらに低い値を示した (4% d^{-1})。青色の光は、緑色や赤色の光と比較して紅藻類の光合成に対する影響が低いことから、青色 LED で培養された天然株と緑色変異株の生長率が著しく低くなった要因と考えられる。次に、3 色混合した LED について検討したところ、混合した 3 色の LED で培養された場合の生長率の平均は、14.2% d^{-1} であり、蛍光灯の生長率 (15% d^{-1}) と比較して、同程度の値を示した。そこで、色素濃度の影響を検討したところ、混合した 3 色の LED と蛍光灯には大きな差は認められなかった。さらに、LED のエネルギーコストは、蛍光灯のエネルギーコストと比較して、17% 低いことが認められた。以上の結果から、室内での海藻養殖における最適な光資源は、LED であることが示唆された。

(3)Insufficient discriminatory power of MALDI-TOF MS mass spectrometry for typing of *Enterococcus faecium* and *Staphylococcus aureus* isolates

Lasch, P., Fleige, C., Stammler, M., Layer, F., Nubel, U., Witte, W. and Werner, G.
Journal of Microbiological Methods **100**, 58-69 (2014).

Reviewed by T. Matsuwaki

腸球菌とブドウ球菌は、ヒトの腸管内や鼻腔、皮膚における常在菌であり、感染症を引き起こす原因菌としても知られている。臨床現場における腸球菌とブドウ球菌の菌種同定試験には、生化学性状試験や分子生物学的手法が用いられている。しかしながら、これら手法は、煩雑な処理や莫大なコストが必要となることから、迅速かつ低コストな同定技術の開発が望まれている。近年、イオン化飛行時間型質量分析計 (MALDI-TOF MS) は、細菌のリボソームタンパクの質量を測定することで菌種同定を行うことができる手法として注目されている。さらに、この手法は、細菌を遺伝子型ごとに分類できることが示唆されている。そこで本研究では、*Enterococcus faecium* と *Staphylococcus aureus* を対象として、MALDI-TOF MS による同一菌種の遺伝子型の分類能力を評価した。試料は、ヒトと動物由来の *E. faecium* (112 株) と *S. aureus* (59 株) とした。全菌株は、multi-locus sequence typing (MLST) を行い、遺伝子型ごとに分類した。また、分類した菌株を MALDI-TOF MS によって解析し、マススペクトルを取得した。得られたマススペクトルについてクラスター解析を実施し、MLST における遺伝子型の分類結果と比較することによって、MALDI-TOF MS による遺伝子型の分類能力を評価した。

MLST によって遺伝子型を分類した結果、*E. faecium* と *S. aureus* はそれぞれ、8 つと 6 つの clonal complex (CC) に分類された (*E. faecium* ; CC2, CC5, CC9, CC17, CC22, CC25, CC26, CC92, *S. aureus* ; CC5, CC8, CC22, CC30, CC45, CC398)。また、臨床分離株のみが *E. faecium* CC17 に分類された。また、クラスター解析によってマススペクトルの類似度を比較した結果、*E. faecium* は CC17 以外の CC (non-CC17) が優占種であるクラスター I と CC17 が優占種であるクラスター II を形成した (クラスター I : CC17, 27.1% ; non-CC17, 72.9% ; クラスター II : CC17, 82.9% ; non-CC17, 17.1%)。しかしながら、*S. aureus* は、異なる CC を含むクラスターを形成し、明確に分類することができなかった。以上の結果から、MALDI-TOF MS における遺伝子型の分類能力は、*E. faecium* CC17 と non-CC17 を分類することが可能であるものの、*S. aureus* の分類には適していないことが明らかとなった。