

## 第 264 回雑誌会

(Jun. 16, 2017)

### (1) The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups

Clermont, O., Christenson, J. K., Denamur, E. and Gordon, D. M.

Environmental Microbiology Reports, 5, 58-65 (2013).

Reviewed by T. Ueda

2000年に、大腸菌 (*Escherichia coli*) 種の 80%以上を遺伝子構造に基づいて 4 種の系統群 (A, B1, B2, および D) に分類することができる triplex PCR 法が開発された。その一方で、ヌクレオチドシーケンスデータに基づいた multi-locus sequence typing (MLST) 技術やゲノム情報の普及に伴って、大腸菌種は、8 種の系統群 (A, B1, B2, C, D, E, F, および大腸菌と遺伝的に異なるが表現型で区別できない *Escherichia* clade I) が認識されている。大腸菌種は各系統群によって、表現型や遺伝子型、宿主、および病原性は異なるため、大腸菌種の系統群分類は臨床的意義としても重要である。本研究では、triplex PCR 法を改良し、大腸菌種の更なる系統群分類を可能にする quadruplex 法を開発し、その有用性を検証した。様々な宿主や環境中から単離された大腸菌株について、quadruplex PCR 法 (標的: *chuA*, *yjaA*, TspE4.C2, および *arpA*) によって遺伝子型の特徴づけを行い、大腸菌を各系統群に分類した。並行して、triplex PCR 法と MLST による系統群分類を行い、各結果を比較した。さらに、大腸菌株の各系統群への分類の割合を調査するために、ヒトのふん便から単離した大腸菌株について、quadruplex 法によって系統群分類を行った。

大腸菌 367 株について、quadruplex 法と triplex PCR 法による遺伝子型を比較したところ、1 株を除く 366 株が *chuA*, *yjaA*, および TspE4.C2 で同一の遺伝子型を示した。また、大腸菌 360 株について、quadruplex 法と MLST による系統群の分類結果を比較したところ、分類された菌株の系統群は、ほぼ 100% (358 株/360 株) 一致した。その一方で、大腸菌 435 株について、triplex PCR 法と MLST による系統群の分類結果を比較したところ、21% (93 株/435 株) が正確に分類されなかった。そこで、triplex PCR 法で正確に分類されなかった大腸菌 93 株について、quadruplex 法で系統群分類を行ったところ、80% (74 株/93 株) が MLST の結果と一致し、正確に分類された。これらの結果から、quadruplex 法は大腸菌株の 95%以上を系統群に正確に分類できることが明らかとなった。さらに、ヒトのふん便から単離された大腸菌 666 株のうち、約 13%が C, E, F, および clade I 系統群に分類された。これら 4 種の系統群に属する株を検出できることは quadruplex 法の大きな利点である。以上のことから、quadruplex 法は、大腸菌株の系統群分類の手法として有用であり、大腸菌の遺伝子構造を形成する宿主や環境要因に関する知見の蓄積に期待できる。

## (2) Change in the Structure of *Escherichia coli* Population and the Pattern of Virulence Genes along a Rural Aquatic Continuum

Petit, F., Clermont, O., Delannoy, S., Servais, P., Gourmelon, M., Fach, P., Oberlé, K., Fournier, M., Denamur, E. and Berthe, T.  
Frontiers in Microbiology, **8**, 1-14 (2017).

Reviewed by R. Hashimoto

大腸菌の中には、ヒトに対して重大な感染症を引き起こす下痢原生大腸菌が存在する。特に、志賀毒素産生大腸菌 (Shiga toxin-producing *E. coli*, STEC ; enterohemorrhagic *E. coli*, EHEC) による水系感染症が問題視されている。STEC / EHEC は牛の消化管に存在しており、農場からの排水を介した動物、水、およびヒトへの拡散が危惧されている。しかしながら、小規模な畜産場を対象とした報告は極めて少ない。そこで本研究では、牛の畜産業が活発な農村に流入する河川沿いにおいて、大腸菌の系統群と構造、薬剤耐性プロファイル、および病原性大腸菌の汚染について調査した。フランス北西部の農村を流れる4つの河川 (上流: Sébec と Selles, 下流: Tourville と Risle) を調査の対象とし、2009年11月と2010年6月において、各河川から河川水と河床底質 (深さ 0-1 cm) を採取した。試料採取後、MF法を用いて大腸菌と腸球菌を計数した。また、大腸菌を各試料から合計651株単離した。単離菌株は、寒天拡散法によって、17種類の抗菌薬に対する薬剤感受性を評価した。また、PCR法によるゲノム解析によって系統群を決定し、病原性大腸菌を評価するために10種類の病原遺伝子 (*afaD*, *stx1*, *stx2*, *eltB* (LT), *estA* (ST), *ipaH*, *bfpA*, *aeae*, *aaiC*, *aata*) を検出した。さらに、全体、ヒト、および反芻動物に特有な *Bacteroidales* の 16s rRNA 遺伝子 (AllBac, HF183, Rum-2-Bac) を検出し、細菌の起源を特定した。

薬剤感受性試験では、少なくとも1種類の抗菌薬に耐性を示した大腸菌株の割合は、上流の Selles (5%, 7/148) よりも下流の Risle (27%, 53/190) で増加した。各試料採取地点における河川水と河床底質中の大腸菌の系統群は、同様の構造を示した。しかしながら、試料採取地点ごとに、大腸菌の系統群が変化した。病原遺伝子を検出した結果、病原性大腸菌の検出率は 1.99% (13/651) であり、このうち STEC O174 : H21 (*stx2*) は 0.30% (2/651), EHEC O26 : H11 (*aeae*, *stx1*) は 0.61% (4/651) であった。また、*Bacteroidales* の検出結果から、上流河川 (Sébec と Selles) の微生物的汚染は主に反芻動物由来であるのに対して、下流の都市地帯 (Risle) ではヒト由来であることがわかった。以上のことから、農村の水環境におけるヒト由来または反芻動物由来の病原性大腸菌の汚染が示唆され、今後も調査を続ける必要がある。

### (3) A rapid Fenton treatment technique for sewage sludge dewatering

Mo, R., Huang, S., Dai, W., Liang, J. and Sun, S.

Chemical Engineering Journal, **269**, 391-198(2015).

Reviewed by K. Endo

下水汚泥中には、汚泥脱水性を低下させる原因となる EPS(生体外高分子物質)などの有機物質が多く存在する。その有機物質を分解し、内部水を放出させることによって汚泥脱水性を向上させることを目的としてフェントン処理が行われている。フェントン処理とは、過酸化水素を用いて有機物質を酸化分解する方法であり、汚泥の高い脱水率を達成することができる。しかしながら、処理時間が長いことや、行程中に改良材を用いるため脱水後汚泥量が増大するなどの欠点が挙げられている。また、既往の研究で、フェントン処理を行う際に最適な pH 値と、処理にかかる最適な時間についての調査は行われていない。そこで本研究では、フェントン処理前に pH 値を調整した汚泥に  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  を添加し、そこに  $\text{H}_2\text{O}_2$  を添加することによってフェントン処理を行った。そしてフィルタープレス脱水機を用いて汚泥を脱水し、その含水率から汚泥脱水性を検討した。また、SRF(ろ過比抵抗)及び CST(毛管吸引時間)によって汚泥の脱水性を評価することによって、フェントン処理に関する pH 値と、 $\text{Fe}^{2+}$ 、 $\text{H}_2\text{O}_2$ 、および改良剤として用いる石灰の添加量、処理時間について最適な値を調べた。さらに、細胞の破壊によって DNA が放出されるため、フェントン処理後汚泥の上澄みにおける DNA 濃度を測定することによって汚泥の酸化分解の程度を評価した。また、フェントン処理後汚泥の EPS 量も調査した。汚泥の物理構造についても、走査型電子顕微鏡(SEM)を用いた汚泥表面の観察と、フラクタル次元解析による汚泥粒子の面積や粒径についての調査を行った。

フェントン試薬( $\text{Fe}^{2+}$ 、 $\text{H}_2\text{O}_2$ )のみを用いたサンプルは、処理時間に依存して汚泥の脱水性が向上した。これに対して、フェントン処理後に石灰を添加したサンプルは、処理時間を長くするに伴って汚泥の脱水性が低下した。これは過剰な酸化分解により、フロック形成が困難となるためと推察された。フェントン処理後に石灰を添加するサンプルの処理時間は短いほど良く、最適値は5分であった。また、5分間のフェントン処理後に石灰を添加するサンプルの脱水性は、フェントン試薬のみで90分間処理したものよりも高くなることが確認できた。最適条件下[pH 3,  $\text{Fe}^{2+}$  50 mg / g DS(乾燥固形分),  $\text{H}_2\text{O}_2$  30 mg / g DS, 石灰 50 mg / g DS]において、SRF を 96%低減し、フィルタープレス脱水後の汚泥含水率は  $55.1 \pm 0.6\%$  となり、最も低い値を示した。これらの結果から、石灰を用いるフェントン処理は極短時間で、高い汚泥の脱水性を得られることが示唆された。

## 第 265 回雑誌会

(Jun. 23, 2017)

### (1) Removal of Ni(II) in aqueous solutions by foam fractionation

Shao, W., Zhang, J., Feng, A., Pan, X. and Xiao, Z.

Desalination and Water Treatment, **57 (40)**, 1–6 (2015).

Reviewed by B. Maralmaa

The most effective and adaptable technique for heavy metal removal, even at low concentrations, is adsorption. However, the high cost of adsorbents is considered as the major complication for industrial application. In recent years, special attention has been given to searching for low cost, easily available, efficient and environmentally friendly methods for the removal of heavy metals from wastewater. Foam fractionation has received considerable interest due to its high selectivity, rapidity, efficiency, flexibility and moderate costs. In this study, optimum flotation conditions on foam fractionation for the removal of divalent nickel ( $\text{Ni}^{2+}$ ) from aqueous solution were investigated. Therefore, enrichment ratio and recovery percentage of  $\text{Ni}^{2+}$  were carried out under the fixed conditions as follows: airflow rate, 40-150 mL/min; initial pH, 5.68; initial concentration of  $\text{Ni}^{2+}$ , 5-25 mg/L; concentration and type of surfactants, 0.05-0.25 g/L sodium dodecyl sulphate (SDS) and dodecyl benzene sulphonic acid (DBSA); loading liquid volume, 15-250 mL; and operation time, 0-45 min, respectively. The concentration of  $\text{Ni}^{2+}$  was determined by Atomic absorption spectrophotometer (Thermo M6 AAS).

Non-surface active aqueous  $\text{Ni}^{2+}$  ions were changed to surface active with anionic surfactants such as SDS and DBSA. The recovery percentage of  $\text{Ni}^{2+}$  increased coordinated with an increase in the surfactant concentration and airflow rate, and decreased with an increase in the initial  $\text{Ni}^{2+}$  concentration. When the conditions set as initial  $\text{Ni}^{2+}$  concentration 5 mg/L, liquid loading volume 200 mL, gas velocity 70 mL/min, initial pH 5.68 and temperature 30°C, recovery percentage (R) and enrichment ratio (E) of  $\text{Ni}^{2+}$  ions were reached to 98% and 12. The enrichment ratio of  $\text{Ni}^{2+}$  was improved by extending the drainage section of column, but deteriorated by increasing the concentrations of the surfactant and metal. The separation factor increased with a concentration decrease in the bulk solution, On the other hand, increase dosage of surfactant was required to reach a higher recovery percentage in condition of high nickel concentration. This study indicates that the foam fractionation is a possible and promising method for treating electroplating effluents which is including low concentration of  $\text{Ni}^{2+}$ .

## **(2) Estimation of runoff, peak discharge and sediment load at the event scale in a medium-size Mediterranean watershed using the AnnAGNPS model**

Bisantino, T., Bingner, R., Chouaib, W., Gentile and Trisorio Liuzzi, G.

Land degradation & Development, **26**, 340-355 (2015).

Reviewed by Y. Kanayama

分布型流出モデルに地形や土地利用等の情報を組み込むことにより、流域規模での土壌侵食や土砂輸送の推定が実現されつつある。中でも、流域内の汚染物質負荷を予測するために開発された AnnAGNPS モデルは、他の分布型モデルと比較して土砂流出量の予測精度が高いとの報告がある。半乾燥地帯は、一般に河川の浮遊土砂濃度が高く、土砂輸送の定量化が困難とされ、モデルの適用事例は少ないのが現状である。そこで本研究では、イタリア南部の半乾燥地帯に位置する Carapelle 川流域を対象として AnnAGNPS モデルを適用し、洪水イベント時の流量、ピーク流量および土砂生産量を予測した。気象データとして、気温、降水量、風速のデータについて、Thiessen 法によって空間補間を行った。土地利用データとして、Coordination of Information on the Environment のデータを用いた。また、流量と浮遊土砂量の観測値を Carapelle 川流域内に設置された超音波水位記録計から取得した。土壌侵食量は、降雨や表面流によって発生する土壌侵食量を推定するモデル (RUSLE model) で計算した。また、土砂生産量は流域に供給される土砂量を定量化するモデル (HUSLE model) で計算した。モデルの較正は、2007 年と 2008 年に発生した 11 つの洪水イベント時の観測値を用いて行った。モデルの検証は、2009 年に発生した 8 つの洪水イベント時の観測値を用いて行った。また、予備実験として、モデルの各パラメータについて感度分析を行った。そして、解析結果の評価を決定係数 ( $R^2$ )、Nash-Sutcliffe 効率係数 (NSE)、Willmott 一致指数 (W) 等を用いて行った。

流出解析による再現結果は、流量 ( $R^2 = 0.74$ , NSE = 0.75, W = 0.92)、ピーク流量 ( $R^2 = 0.85$ , NSE = 0.70, W = 0.94)、土砂流出量 ( $R^2 = 0.70$ , NSE = 0.63, W = 0.91) と良好な再現性であることを示した。さらに、高流量時の推定精度は平水時よりも高い結果が得られた。半乾燥地域では、一般的に土砂輸送が高流量時に集中することから、AnnAGNPS モデルによる土砂輸送量の予測は、半乾燥地帯の河川流域においても有用であることが示された。

### (3) Co-detection of five species of water-borne bacteria by multiplex PCR

Fan, H., Wu, Q. and Kou, X.

Life Science Journal, 5(4), 47-54 (2008).

Reviewed by A. Jikumaru

環境水を媒介とした感染症の発生を予防するには、水環境における病原微生物の定期的な調査が重要となる。従来の病原微生物の検出方法は多大な時間と労力を必要とするが、近年では multiplex PCR 法によって複数の病原微生物を迅速かつ高感度に検出することが可能となった。しかしながら、微生物の同時検出は、最大でも 3 種類にとどまっている。そこで本研究では、5 種類の水系病原菌の特異遺伝子について、同時検出を可能とする multiplex PCR 法の開発を試みた。対象細菌は、赤痢菌、サルモネラ、腸炎ビブリオ、緑膿菌、腸管出血性大腸菌 (EHEC) とし、それぞれの特異遺伝子 (*IpaH*, *IpaB*, *Vpara*, *OprL*, *HlyA*) を標的とした。対象細菌を含む計 39 株の細菌から DNA 抽出を行い、設計した 5 セットのプライマーについて対象細菌の特異性を monoplex PCR 法によって調べた。また、multiplex PCR 法による対象細菌の特異性について検証した。細菌数を調整した懸濁液 (大腸菌  $10^3$  cfu, 各対象細菌  $10^0$ - $10^6$  cfu) を作成し、multiplex PCR 法と monoplex PCR 法における細菌数の違いによる検出感度を比較した。また、異なる水試料に対象細菌を懸濁させ ( $10^6$  cfu/100 mL, 海水, プールの水, 水道水, 蒸留水), multiplex PCR 法によって各水試料の検出感度を比較した。さらに、2005 年 4 月と 12 月にわたって、中国広州の 16 地点において水試料を採取し、multiplex PCR 法によって対象細菌の検出を試みた。

設計した全てのプライマーが、標的とする遺伝子に対してのみ特異性を示し、個々のプライマーおよび標的でない遺伝子との間で交差反応は見られなかった。また、特異遺伝子である *Vpara*, *IpaB*, *HlyA*, *OprL* および *IpaH* の増幅バンドは、175, 315, 366, 504 および 611 bp であり、期待したサイズが得られた。各細菌数に対する検出感度は、monoplex PCR 法における対象細菌の検出限界が  $10^0$ - $10^1$  cfu の範囲であったのに対して、multiplex PCR 法は  $10^1$ - $10^2$  cfu の範囲であり、multiplex PCR 法の検出感度は全体的に 1/10 程度低下した。各水試料に対する対象細菌の検出感度に違いは認められず、どの水試料に対しても検出可能であった。中国広州における調査では、100 試料中 14 試料から対象細菌が検出された。この時、調査期間の前後である 9 月から 11 月において対象細菌とそれ以外の病原菌による同時感染が発生しており、本調査が妥当であることが示唆された。以上のことから、本研究で開発された multiplex PCR 法は、公衆衛生を保全するための日常的な調査方法になり得ると考えられる。

## 第 266 回雑誌会

(Jun. 30, 2017)

### (1) Effects of flow regime on benthic algae and macroinvertebrates – A comparison between regulated and unregulated rivers

Schneider, S. C., and Petrin, Z.

Science of the Total Environment, **579**, 1059-1072 (2017).

Reviewed by K. Shirasaka

河川生態系の保全には、気候や地質に特徴付けられる流況の自然な変動が重要となる。流量制御が河川生物相に及ぼす影響についての研究事例はあるが、そのほとんどが短い時間スケールを対象としており、長期の影響を評価した研究は限定的である。そこで本研究では、流況が人為的に制御された河川（以下、制御河川）と制御されていない河川（以下、非制御河川）を対象に、生息場特性、水質、流況特性が底生動物群集と付着藻類に及ぼす影響を評価した。調査を制御河川 20 箇所と、非制御河川 20 箇所において行った。調査地点の選定条件として、1) 2008 年以降の日毎流量データが入手できること、2) 調査地点が独立である、すなわち同一の制御河川に 2 地点以上無いこと、3) 25 年以上に渡り流量制御されていること、4) 地理的条件が可能な限り類似していること、を設定した。付着藻類は各地点の早瀬の 2 箇所における 5 個の大礫を対象に、Benthos Torch (BBE Moldaenke GmbH) を用いて Chl a を計測した。また、礫表面 8cm×8cm の範囲を削り取ったサンプルを用いて顕微鏡で同定した。その後、酸性化の指標として AIP 値、富栄養化の指標として PIT 値を算出した。底生動物は、0.1m<sup>2</sup> のサーバーネットを用いて 1 地点につき 10 回のサンプリングを行い、可能な限り細かい分類レベルまで同定した。その後、酸性化の指標として Raddum 2、水質の指標として ASPT 値を算出した。ノルウェー水資源エネルギー局 (NVE) が観測しているデータを基に、77 項目の水文改変指標を計算した。底生動物と付着藻類に関する統計解析には、非類似度に基づく生物相の違いを可視化する非計量多次元尺度構成法 (NMDS)、多変量から主成分を抽出する主成分分析 (PCA) を用いた。

統計解析の結果、制御河川では非制御河川と比較して安定した流況を形成していた。また、制御河川において、PCA によって求められた長期 (5 年間) の流れの主成分 PC<sub>hydr</sub> と底生動物群集は相関 ( $r=0.536$ ) が検出されたが、付着藻類とは相関が確認されなかった。以上のことから、底生動物は長期的な流れの影響を受けるが、付着藻類は影響を受けないことが示唆された。さらに生態学的な状態評価の指標 (Raddum 2, AIP, ASPT, PIT) は制御・非制御河川間において、有意差が検出されなかった。したがって、非制御河川において用いられてきたこれら既存の評価指標は制御河川においても適用可能である。

## **(2) The prevalence and characterization of antibiotic-resistant and virulent *Escherichia coli* strains in the municipal wastewater system and their environmental fate**

Osińska, A., Korzeniewska, E., Harnisz, M. and Niestępski, S.

Science of the Total Environment, **577**, 367-375 (2017).

Reviewed by E. Nishimura

下水処理場は、家屋、医療機関、および畜産場において生産された薬剤耐性菌が流入するため、それらを水環境中に拡散する主要な供給源であると考えられる。本研究では、下水処理場と周辺の河川を対象として、河川における薬剤耐性決定因子の検出頻度と分布を調査した。試料は、2015年1月、4月、7月、および10月において、未処理下水（UWW）、下水処理水（TWW）、および河川水（URW；下水放流口から600 m上流，DRW；下水放流口から600 m下流）を採水し、各試料の水温，pH，BOD，およびCODを測定した。各試料について、MF法によって大腸菌を計数し、生育した菌株をランダムに単離した。また、amoxicillin（AMPC）、tetracycline（TC）、およびciprofloxacin（CPFX）をそれぞれ添加した培地を用いたMF法によって薬剤耐性大腸菌を計数した。単離菌株について、DNA抽出後、16s rRNA遺伝子、ITS領域、および23s rRNA遺伝子を標的としたPCR法によって大腸菌を同定した。また、各抗菌薬（AMPC、TC、CPFX）含有培地を用いて、同定菌株の薬剤感受性試験を実施した。薬剤耐性を示した菌株について、各PCR法によって20種類の薬剤耐性遺伝子、2種類のインテグラーゼ遺伝子、および8種類の病原性遺伝子を検出した。さらに、ERIC PCRを用いたクローン分析によって菌株間の類似性を評価した。

大腸菌数および薬剤耐性大腸菌数は、どちらもUWWから最も多く検出され、各試料の薬剤耐性菌数と有機物汚濁（BOD、COD値）との間には正の相関が認められた。単離した大腸菌455株について薬剤感受性試験を実施した結果結果、455株中317株が1薬剤以上に耐性を示した。そこで、耐性菌317株について薬剤耐性遺伝子を調べたところ、TC系に特異的な薬剤耐性遺伝子がURWで5種類、UWWで12種類、TWWで11種類、DRWで6種類検出された。下流は、上流と比較して耐性遺伝子数が多かった。また、耐性菌317株は、11のクラスター（類似度95%）に分類された。そのうちの2つのクラスターは、DRW、UWW、およびTWWの菌株のみで構成され、これらの菌株は、高い頻度でインテグラーゼ遺伝子（*intI1*；69%、*intI2*；17%）と病原性遺伝子（95%）を保有していた。これに対して、URWの菌株は、6株中5株が他試料の菌株と異なるクラスターに分類された。以上のことから、下水処理場は、上流から下流に至る薬剤耐性大腸菌数および遺伝子の変動に寄与していることが明らかとなった。

### **(3) Sediment sorting and beach erosion along a coastal foreland: Magnetic measurements in Point Pelee National Park, Ontario, Canada**

Hatfield, R. G., Cioppa, M. T. and Trenhaile, A. S.

Sediment Geology, **231**, 63-73 (2010).

Reviewed by A. Miyazono

沿岸環境は、土砂の流入・流出によって影響を受ける可能性があるため、土砂の堆積状況を把握することは重要である。また、土砂を構成する鉱物のうち、重鉱物が軽鉱物よりも割合が大きい場合には、侵食傾向になることが示唆されている。さらに、鉱物種同定のうち粒径や鉱物種の分析は、コストや煩雑さを有するが、磁気分析では安価で容易に堆積物の発生源、輸送経路、および堆積過程が推定可能である。そこで本研究では、磁化率測定、調査地点における磁化率のマッピング、および磁気分析を用いて、海岸の堆積・侵食環境を区分した。調査は、カナダのエリー湖の北に位置する Point Pelee 国立公園の東海岸沿い 8.9 km に沿って実施した。磁化率測定は、遡上波帯 (Front beach) から植生線 1~2 m (Back beach) にかけての 168 のトランセクトに沿って、20 cm 間隔で測定した。磁気分析試料は、海浜に沿って 50 m 間隔に置かれた 18 のトランセクトから、Front beach 付近 と Back beach において、合計 36 試料採取した。採取した試料は、6 つの区分 (125  $\mu\text{m}$  未満, 125~250  $\mu\text{m}$ , 250~350  $\mu\text{m}$ , 355~500  $\mu\text{m}$ , 500~1000  $\mu\text{m}$ , >1000  $\mu\text{m}$ ) にふるい分けをし、各区分における磁化率と重鉱物種を分析した。さらに、125~250  $\mu\text{m}$  において、光学顕微鏡法と X 線回折分析によって含有鉱物を同定し、Front beach と Back beach における鉱物種を比較した。

磁化率測定による調査地点への磁化率のマッピングを行った結果、Back beach 中央部付近において高い値を示した。一方で、Front beach では低い値を示した。また、高い磁化率は、多くの重鉱物を含んでいることから、Back beach では、過去から現在にかけて侵食傾向であることが示唆された。異なる粒子区分における磁気分析の結果、全試料はマグネタイトが含まれていることが示された。また、磁化率は、粒子が小さいほど高い傾向を示し、250  $\mu\text{m}$  未満で最も高くなった。さらに、光学顕微鏡と X 線回折分析によって、Front beach と Back beach において鉱物種を比較したところ、Front beach では方解石と石英が支配的であり、Back beach ではマグネタイトに支配された。以上の結果から、Back beach は侵食傾向にあることが示唆された。これによって、磁化率および磁気分析を用いることによって、侵食傾向である海岸の推定が可能である。

## 第 267 回雑誌会

(Jul. 7, 2017)

### (1) 岩手県におけるヒトスジシマカの分布と GIS を用いた生息条件の解析

佐藤 卓, 松本 文雄, 安部 隆司, 二瓶 直子, 小林 睦生

衛生動物, **63**(3), 195-204 (2012).

レビュー：西元 竣哉

東南アジアを原産地とするヒトスジシマカは、デング熱やチクングニア熱等のウイルス性疾患を媒介する節足動物であり、1948 年までは栃木県が分布北限とされていた。しかしながら、ヒトスジシマカの生息北限は徐々に北上しており、2006 年には岩手県花巻市において同蚊の発生が確認されている。そこで本研究では、今後の疾病媒介蚊対策に資するため、岩手県内全域を対象に蚊類の生息分布状況を調査した。調査期間は、2009 年 7 月～9 月と 2010 年 6 月～9 月とし、10 市 7 町の計 134 地点において実施した。調査対象は、各地点における手水鉢や屋外の古タイヤ等の水たまりとし、生息する蚊の幼虫および蛹を採取した。飛来してきた成虫も捕虫網で捕獲し検体とした。また、生息北限地点の定着確認のため、計 95 地点で幼虫生息分布の戸別調査を行った。地理情報システム (GIS) を用いて、近年の気象条件とヒトスジシマカの分布の関係を検討するため、有効積算温日度の閾値を  $10.8^{\circ}\text{C}$  とし、1 km メッシュの日平均気温から、2006～2010 年における 5 年間の平均値を算出した。北限地点よりも北において生息が確認された 2 地点は、他の地点と比較して気温が低く、2010 年で初めて生息が確認されたため、解析から除外した。2009 年の北限地点では、ヒトスジシマカの生息が 2 年連続で確認されたため、解析は本地点よりも南側を対象とした。

ヒトスジシマカの生息が確認された地点数は、2009 年において 26 地点、2010 年において 13 地点、両年において計 34 地点であった。ヒトスジシマカの北限地は、2009 年から 2010 年にかけて約 20 km の北上が確認された。ヒトスジシマカと共存する幼虫としては、ヤマトヤブカが最も多く、今回採集されたその他全ての種との共存が確認された。定着確認のための戸別調査により、2009 年の生息北限地である仙北 2 丁目において、2010 年にヒトスジシマカが広範囲に生息していることが確認された。また、2009 年の北限地点より北に位置し、同蚊の生息が確認された 2 地点において、5 年間の平均有効積算温日度は、1,376 日度と 1,490 日度であり、県内の他の確認地点とほぼ同様の値を示した。このことから、気温等の生息条件を備えた地域に同蚊が侵入した場合、繁殖して地域に定着することが示唆された。今後同蚊の監視および防除体制を構築するためには、生息条件に関わる地理情報も利用して、将来の分布の可能性を予測することが有意義であると考えられる。

## (2) イヌふん便からの薬剤耐性菌検出の試み

畠山 薫, 奥野 ルミ, 遠藤 美代子, 柳川 義勢

東京都健康安全研究センター研究年報, **58**, 73-76, (2007).

レビュー：溝田 悠貴

メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA), バンコマイシン耐性腸球菌 (VRE), および基質特異性拡張型  $\beta$  ラクタマーゼ (ESBL) 産生菌は, 免疫力の低下したヒトに対して重篤な感染症を引き起こす可能性がある薬剤耐性菌である。海外では, 家畜やペットからも MRSA, VRE, および ESBL の分離報告がされている。しかし, 国内では, MRSA, VRE, および ESBL の家畜やペットに関する情報は少ない。そこで, 本研究では, ペットとしてヒトと密接な関係にある, イヌのふん便を対象として, これらの薬剤耐性菌の分布調査を実施した。試料は, 2005 年 4 月から 2006 年 2 月において, 東京都動物愛護相談センターのイヌ 134 頭からふん便を採取した。試料採取後, 確認試験を行い, 各薬剤耐性菌を検出した。MRSA は, マンニット食塩培地 (MSEY) 上でレシチン反応を示したコロニーを単離し, MRSA 確認試験を実施した。また, VRE は, 8  $\mu\text{g/mL}$  のバンコマイシンを添加したエンテロココセル培地 (BBL) に培養液を塗布して培養した。そして, 培養後のコロニーをトリプトソイブイオン (OXOID) に接種し, 発育試験を実施した。さらに, ESBL 産生菌はマッコンキー寒天培地に発育したコロニーについて, 薬剤感受性試験とプラスミド接合伝達試験で ESBL 産生菌を判定した。

MRSA 確認試験の結果, 134 試料中 1 試料からメチシリン耐性菌が検出された。しかしながら, このメチシリン耐性菌に対して菌種同定試験を実施した結果, *Staphylococcus intermedius* に同定され, MRSA は未検出となった。また, 134 試料中 33 試料からバンコマイシンに中度耐性を持つ腸球菌が検出された。この腸球菌について, *vanA* および *vanB* 遺伝子を検査したが未検出となった。その一方で, 薬剤感受性試験とプラスミド接合伝達試験の結果, 134 試料中 1 試料から ESBL 産生菌が検出された。この ESBL 産生菌に対して菌種同定試験を実施した結果, *Escherichia coli* に同定されたが, 下痢原生大腸菌の病原遺伝子は認められなかった。以上の結果から, イヌふん便中には ESBL 産生大腸菌が非常に低い割合で存在したが, 病原遺伝子は保有していなかった。しかしながら, 過去の調査より, 薬剤耐性菌の検出率は地域と時期によって差があることが明らかになっている。このことによって, ヒトの薬剤耐性菌感染を予防するためには, 今後も継続的に動物における薬剤耐性菌の保菌状況の動向を把握していく必要がある。

### (3) 造水技術および水利用—海水淡水化—

太田 敬一

日本海水学会誌, **59**(6), 396-401(2005).

レビュー：佐藤 亜李紗

水需給は地域差があり、日本と世界全体の状況で差異がある。日本において水は豊富であり、人口も減少傾向にあることから将来の水需要は横這いと予想される。一方、世界においては急速な人口増加、降水量の低減・砂漠化などにより、水不足が予想され水需給バランスは厳しい状況にある。海水淡水化は自然の水循環を効率よく強制的に行う仕組みであり、水資源開発の手段として世界中で利用されている。現在実用化されている海水淡水化として、逆浸透法、蒸発法、および電気透析法などが挙げられる。その中でも逆浸透法が最も経済的であり、将来主流になると考えられている。しかしながら、未だにいくつかの課題と開発が望まれる技術がある。

課題として、逆浸透膜の汚れを防止するための前処理システムが挙げられる。膜の汚れについては、未だ十分な解析が進んでおらず、その原因物質や付着の要因およびメカニズムは明らかとなっていない。SDI 値 (Silt Density Index) は、供給水の指標であり、孔径 0.45  $\mu\text{m}$  のメンバレンフィルターで供給水を 15 分間ろ過したときの目詰まり率を基にしている。逆浸透法では、SDI 値 <4 以下が供給可能水質であり、この水質を達成するために前処理が行われている。しかしながら、都市臨海部において、SDI 値を満足する前処理を行っても膜の汚れ付着や劣化が問題となっている事例がある。このような状況から、海水の溶解性有機物の影響が懸念されており、これを除去する必要がある。膜の殺菌に使用される塩素には細菌類や微生物の繁殖を抑制する効果があるが、微生物の増殖を促す逆効果も指摘されている。そこで生物殺菌だけの目的に絞って、前処理システムの入り口で 1 日 1 回 30 分～1 時間の塩素間欠注入殺菌法が開発されている。また、逆浸透膜の洗浄は、薬品を使用した化学的洗浄が実用化されている。しかしながら、薬品による洗浄効果と膜劣化に未だ問題があり、安全で有効な膜洗浄方法の開発が求められている。また、海水淡水化プロセスでは、海水中の塩分や有機物を分離するだけで分解はしていない。濃縮海水は濃度規制がないため、排水放流基準に適合するように処理されており、狭い地域に集中して放流される場合には環境への影響が懸念されている。海域放流ができない内陸部では、放流排水の最終処分方法を確立する必要がある。膜分離技術の応用は海水淡水化に限らず、多くの水処理に適用され、水資源開発として下水再生利用が最も注目されている。

## 第 268 回雑誌会

(Jul. 14, 2017)

### (1) Real-Time PCR for Quantitative Analysis of Human Commensal *Escherichia coli* Populations Reveals a High Frequency of Subdominant

Smati, M., Clermont, O., Gal, F. L., Schichmanoff, O., Jaureguy, F., Eddi, A., Denamur, E., and Picard, B.

Applied and Environmental Microbiology, **16**, 5005-5012 (2013).

Reviewed by T. Ueda

ヒトの腸管内の常在菌である大腸菌 (*Escherichia coli*) は、4 種の系統群 (A, B1, B2, D) に分類され、それぞれが生態的特異性を示す。しかしながら、ヒトの腸管内における大腸菌系統群の多様性はほとんど明らかになっておらず、特に、腸管内に低い割合で存在する準優占群までを調査対象とした研究は極めて少ない。本研究では、大腸菌の主要な生息環境であるヒトの腸管内における群集構造を明らかにするために、real-time PCR 法を用いて、ふん便中の大腸菌系統群の相対的割合を調査した。試料は、2009 年 5 月から 2011 年 12 月にかけて採取されたフランス在住の健常者 (男性 46 人; 女性 54 人, 26~86 歳) のふん便 100 検体とした。各検体から DNA を抽出し、定量 PCR 法 (標的: 16S rRNA) で大腸菌を定量するとともに、real-time PCR 法 (標的: *chuA*, *yjaA*, *TspE4.C2*) によって各系統群に属する大腸菌を定量した。並行して、Drigalski 寒天培地を用いて、各検体からランダムに 1 株を単離し、API20E を用いて大腸菌を同定した。大腸菌と同定された株について、大腸菌を各系統群に正確に分類可能な Multiplex PCR 法によって各系統群に分類し、real-time PCR 法の結果と比較した。また、単離菌株について、6 種抗菌薬に対する薬剤感受性試験を実施した。さらに、因子分析によって、各データ間の関連性を特徴づけた。

100 検体中 98 検体から大腸菌が検出された。real-time PCR 法によって各検体の系統群を調査した結果、77 検体から複数の系統群が検出された。また、real-time PCR 法で優占群として検出された系統群 A, B1, B2, および D の割合は、それぞれ 38, 13, 37, および 11% であり、Multiplex PCR 法の結果と同様の傾向を示した。このことから、ヒトの腸管内における主な優占群は、系統群 A あるいは B2 であることがわかった。因子分析の結果、A が優占群の場合では、優占系統群が B2 の場合と比較して、その他の系統群と共生している確率が明らかに高く、抗菌薬に耐性を示す確率も高かった。一方で、宿主の年齢や性別と系統群構造の関連性は確認されなかった。以上のことから、ヒトの腸管内における大腸菌系統群の多様性は高く、その群集構造と薬剤耐性の出現には関連性があることが示唆された。大腸菌の準優占群までを検出可能な real-time PCR 法によって、個体内における大腸菌系統群の多様な群集構造の解明が期待できる。

## **(2) Applying rheological analysis to understand the mechanism of polyacrylamide(PAM) conditioning for sewage dewatering**

Wang, H., Wang, H., Hu, H., and Zeng, R.

The Royal Society of Chemistry, 7, 30274-30282 (2017).

Reviewed by K. Endo

下水汚泥処理における汚泥脱水性の向上を目的として、機械脱水前に汚泥の調質が行われる。調質手段として、凝集剤による汚泥フロックの形成が広く用いられるが、凝集剤によって生じる汚泥フロックの脱水性を決定するメカニズムについて、明確な研究報告がない。また、下水汚泥は単位時間あたりにかかる力の大きさによって粘度が変化する流体(非ニュートン流体)と考えられている。しかし、流体の粘弾性を調査する手法であるレオロジー分析で得られる結果と、汚泥脱水性との関係性はほとんど報告されていない。そこで本研究では、凝集剤として一般的に使用されている PAM(ポリアクリルアミド)を用いて作成した下水汚泥フロックに対して、レオロジー分析を行った。また、汚泥フロックに対して CST(毛管吸引時間)試験、ブフナー漏斗ろ過、遠心分離機による脱水を行い、汚泥の脱水性を評価し、レオロジー的特性との関係を検討した。

PAM 添加量と汚泥の脱水性の関係について、PAM 量を 0~18.80 mg/g VSS(強熱浮遊物質重量)の範囲で変化させて調べた。PAM 量の増加に伴い、CST は、PAM 量 12.53 mg/g VSS で 13.60 s の最良値を示した。一方でまた、ブフナー漏斗ろ過と遠心分離器による脱水によって得られた脱水汚泥の含水率が減少した。脱水汚泥の含水率はブフナー漏斗ろ過のろ過時間を長くするほど減少した。さらに、遠心分離の遠心力を 500~4000 g の範囲で増加させるとともに、脱水汚泥の含水率は減少した。次に、PAM 量を 0~18.80 mg/g VSS の範囲で、変化させた汚泥フロックに対して、レオロジー分析を行った。レオグラム(せん断応力-せん断速度曲線)では、PAM 量が 0~3.76 mg/g VSS の範囲ではフロックにせん断応力のピークは確認できず、PAM 量が 6.26~18.80 mg/g VSS の範囲において、せん断応力のピークが確認された。せん断応力のピーク値(最大せん断応力)は、フロック強度の指標であり、ピーク値は PAM 量の増加に伴って増加した。また、フロックの耐変形性を示す複素弾性率は、PAM 量の増加に伴って増加し、PAM 量とフロックの変形への抵抗性の間に関係性が認められた。以上のことから、PAM 量の増加に伴う粘弾性の強化によって強固なフロックが形成され、脱水汚泥含水率が減少し、汚泥脱水性とレオロジー的特性との関係が確認できた。以上のことから、レオロジー分析は、汚泥フロックの脱水性のメカニズムを理解するために有効な手法となることが示唆された。

## 第 269 回雑誌会

(Jul. 21, 2017)

### (1) Effect of reclaimed water effluent on bacterial community structure in the *Typha angustifolia* L. rhizosphere soil of urbanized riverside wetland, China

Huang, X., Xiong, W., Liu, W. and Guo, X.

Journal of Environmental Sciences, **55**, 58-68 (2017).

Reviewed by R. Hashimoto

再生水処理場 (RWTP) の排水は、河川環境に流入する塩素源のひとつであり、殺菌副生成物などによるヒトへの健康に対する潜在的なリスクは高いと言われている。また、近年では都市河川において、人工湿地が水質改善のために使用されており、湿地植物根圏の細菌群集は、生態系バランスを維持する上で重要な役割を果たしている。しかしながら、水質擾乱状態での湿地植物根圏細菌に関する研究は極めて少ない。そこで本研究は、都市河川における人工湿地の植物根圏細菌に及ぼす RWTP 排水の影響を評価するため、末端制限断片長多型 (T-RFLP) と 16S rRNA クローンライブラリー法を用いて、湿地植物であるヒメガマの根圏土壌における細菌群集を調査した。中国北京の永定河において、RWTP 排水が流入する人工湿地を調査の対象とし、2012 年 10 月に、上流 (RWTP 流出口より上流 300 m 地点)、RWTP 流出口直前と直後、下流 (RWTP 流出口より下流 2000 m 地点) の計 4 地点からヒメガマ根圏土壌を採取した。そして、試料の水質特性と物理化学的性質の分析を実施し、DNA 抽出を行った。T-RFLP 分析によって細菌の群集構造を解析した後、細菌群集の多様性を推定し、上流と下流の根圏土壌試料における分類学的組成を比較した。また、16S rRNA クローンライブラリー法により、細菌群集の系統発生的分布を調査した。

T-RFLP 分析の結果、RWTP 流出口直後において根圏細菌の多様性は大きく減少し、下流で再び増加することがわかった。上流と下流において、細菌門数はそれぞれ 15 と 11 であり、細菌の分類学的組成は明らかに変化した。また、採取地点ごとの細菌の特徴は、根圏土壌の水質特性と物理化学的性質に強く依存した。16S rRNA クローンライブラリー法の結果、下流において Firmicutes と Chloroflexi の細菌門が顕著に増加した。また、重金属耐性菌 (*Steroidobacter*, *Geobacter*, *Clostridium*) は、下流でのみ検出された。上流では、病原菌がほとんど検出されなかった。これに対して、病原菌の 12.3% が下流で検出された。植物の成長促進に寄与している根粒菌は、上流と下流でそれぞれ 27 クローンと 7 クローンであり、下流において著しく減少することがわかった。以上のことから、RWTP 排水が流入する人工湿地において、細菌群集の多様性や重金属などの汚染物質による根圏細菌への影響が示唆された。今後は、重金属耐性細菌の分析、根粒菌の特徴など、さらに調査を進める必要がある。

## (2) Evaluation of the quality of coastal bathing waters in Spain through fecal bacteria

### *Escherichia coli* and Enterococcus

Aragonés, L., López, I., Palazón, A., López-Úbeda, R. and García, C.

Science of the Total Environment, **566-567**, 288-297 (2016).

Reviewed by T. Matsuwaki

スペインでは、レクリエーション水域における衛生管理のために、水域のふん便汚染を評価する指標細菌である大腸菌と腸球菌を対象としたモニタリング調査を行っている。しかしながら、大腸菌と腸球菌の生残性や存在実態は、さまざまな環境要因に影響される。そこで本研究では、2012年から2015年にかけてスペインの Iberian 半島に存在するビーチ 1392 地点を対象として指標細菌数と環境要因の関連性を調べた。各調査地点について、隣接する 5 つの海域に分類した：地中海北部 (NM)；地中海南部 (SM)；海峡エリア (SA)；大西洋 (AO)；Cantabrian 海 (CS)。指標細菌数は、スペイン保険社会対策省 (MSSSI) からデータを入手し、95%値を統計解析に用いた。また、各調査地点について、スペイン農業食料環境省 (MAGRAMA) が規定する都市化率と堆積物特性による指標細菌の動態を調査した。さらに、統計解析に用いる環境要因として 11 のパラメータを設定した (紫外線量, 塩分濃度, 水温, 降雨量, 日照時間, 波高, 風速, 家畜頭数, 排水処理率, 海水浴期間中の人口と人口密度)。そして、SPSS 20.0 を用いて、指標細菌数と各パラメータ間の相関係数を求めた。また、one-way ANOVA を用いて、指標細菌数と各パラメータ間の有意差検定を行った。

各海域における指標細菌数の平均を比較した結果、大腸菌は、SA を除く全ての海域で有意差が認められた ( $p < 0.05$ )。また、腸球菌は、SM と SA, AO と CS の間に有意差は無く、NM のみ単独で有意差が認められた ( $p < 0.05$ )。指標細菌数の動態を都市化率で評価すると、全ての海域において都市化率が高くなるほど細菌数も増加した。さらに、堆積物特性で評価すると、SA を除く全ての海域で、堆積物の粒径が小さいほど細菌数が増加した。次に、指標細菌数と各パラメータの相関係数を求めた結果、塩分濃度, 水温, および日照時間は、大腸菌と腸球菌の両方に負の相関を示した (大腸菌,  $r = -0.838 \sim -0.711$ ；腸球菌,  $r = -0.685 \sim -0.428$ )。また、紫外線量は、腸球菌のみ負の相関を示した ( $r = -0.423$ )。その一方で、降雨量と波高は、大腸菌と腸球菌の両方に正の相関を示した (大腸菌,  $r = 0.736, 0.817$ ；腸球菌,  $r = 0.552, 0.624$ )。以上の結果から、Iberian 半島における海水中の指標細菌は、環境要因に強く影響され、細菌数が増減することが明らかとなった。そのため、ふん便汚染の評価する際には、環境要因による影響を考慮する必要性が示唆された。

## 第 270 回雑誌会

(Aug. 4, 2017)

### (1) The erosion of the beaches on the coast of Alicante: Study of the mechanisms of weathering by accelerated laboratory tests

López I., López M., Aragonés L., García-Barba J., López M.P. and Sánchez I.

Science of the Total Environment, **21**, 191-204 (2016).

Reviewed by T. Itakiyo

スペインでは、観光地に代表される海岸において海岸侵食が発生しており、これらの地域における土砂動態を解明することが求められている。本研究では、スペインの南東に位置するアリカンテ州の4つの砂浜 (Molinos y Palmeras beach, Portet de Moraira beach, Levante beach, Arenales del Sol beach) を対象に、土砂粒径と海岸侵食の関係ならびに土砂粒径の変動を生じるメカニズムを調査した。調査は、1981年～2009年における海岸線の変動を測量した。また、地質学データと地理情報システムを用いて、沿岸方向の横断に沿って海底の土砂を3つの層に分類し、第1層は $D_{50}$ の値、第2層はふるい分けによる各ふるいの残留物量、第3層は底部形態を横断面図にプロットし、横断に沿った粒径の分布を調査した。さらに、4つの海岸の土砂と Levante beach の貝殻試料の計5試料を採取し、粒子風化実験と炭酸塩溶出試験を実施した。そして、実験前後において粒度測定、X線回折分析、および走査電子顕微鏡観察を行い、堆積物の鉱物組成と粒度分布を分析し、侵食プロセスにさらされた場合の粒径の変化と炭酸塩の含有率を調べた。

各海岸の海岸線変動を分析した結果、Molinos y Palmeras beach では、海浜が堆積・維持・侵食の順に形成過程を経ていることがわかった。Portet de Moraira beach と Levante beach では海岸線の変動は小さかった。Arenales del Sol beach は、海岸線が一度後退したものの、元の位置付近まで戻っていた。また、 $D_{50}$ の横断変化をみると、沿岸方向に粒径が小さくなった。粒子風化実験の結果、すべての海岸で $D_{50}$ の値が減少し、特に浚渫土砂で形成されている Portet de Moraira beach と Arenales del Sol beach は、開始1日後で $D_{50}$ の値が大きく減少した。炭酸塩溶出試験では、すべての海浜において試験開始から4～8日で溶出する炭酸塩の割合が、最小値0.23%から最大値3.31%まで増加した。走査電子顕微鏡によって土砂粒子を観察した結果、すべての海浜土砂において、粒子風化実験後に炭酸塩や塩化ナトリウム結晶の消失が見られた。X線回折分析においても、粒子風化実験後に方解石 ( $\text{CaCO}_3$ ) のピークが減少していることがわかった。以上の結果から、海浜土砂は、侵食を受けて粒径の小さい養浜材料 (浚渫土砂) や炭酸塩の溶出によって粒径が減少し、横断方向に移動するプロセスを経ることが明らかとなった。

## (2) 出水平野に飛来するツル糞便からの *Salmonella Typhimurium* の分離および分離株の性状

穂満 康弘, 室賀 紀彦, 田原口 智士, 中馬 猛久, 高瀬 公三, 塩谷 克典,  
毛利 資郎

日本獣医師会雑誌, **58**, 411-414 (2005).

レビュー：杉田 弘樹

鹿児島県北部に位置する出水平野には、毎冬約 12,000 羽のツルが飛来する。このツルの群れに悪性の伝染病が発生した場合、ツルは絶滅する恐れがある。これまでに、ツルの糞便を対象とした調査が実施されており、病原性微生物である *Salmonella Typhimurium* が検出されている。しかしながら、この *S. Typhimurium* についての情報は一部に限られている。そこで本研究では、出水平野に飛来するツルを対象として、*S. Typhimurium* の分離状況、薬剤感受性、ならびに菌株間の関連性について調査した。調査は、2000 年 11 月から 2002 年 2 月の冬季にかけて計 8 回実施した。試料は、出水平野の東干拓地、古浜地域、西干拓地、荒崎休遊地とその周辺地域および江内川地域において、飛来したツル 342 検体（ナベヅル 183 検体、マナヅル 53 検体、識別不可 106 検体）から糞便を採取した。試料採取後、Deoxycholate-hydrogen sulfide-lactose (DHL) 培地を用いて菌株を単離した。単離菌株について、生化学性状試験によって分離株の血清型を判別し、*S. Typhimurium* 株を同定した。同定された菌株と先行の研究で分離・保存されていた *S. Typhimurium* について、寒天平板希釈法によって 12 種類の抗菌薬に対する薬剤感受性試験を実施し、菌株の最小発育阻止濃度 (MIC) を調べた。また、薬剤感受性試験に供した *S. Typhimurium* について、パルスフィールドゲル電気泳動 (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。

DHL 培地を用いて菌株を単離した結果、342 検体中 64 検体 (18.7%) からサルモネラ陽性株が分離された。そこで、分離された菌株について、生化学性状試験を実施した結果、全ての菌株が同一の血清型 (O4:i:1, 2) を示し、*S. Typhimurium* と同定された。また、同定された *S. Typhimurium* 64 株と先行の研究で保存されていた *S. Typhimurium* 3 株の計 67 株について薬剤感受性試験を実施した。その結果、1 株のみがゲンタマイシン (GM) に耐性を持ち、高い MIC 値を示した (50 µg/ml)。薬剤感受性試験に供した *S. Typhimurium* のうち、33 株の遺伝子型を取得した結果、1 株のみが解析不可であり、残りの 32 株は全て同一の遺伝子型を示した。以上のことから、出水平野に飛来したツル群内には、起源を同じにする *S. Typhimurium* が拡散しているものの、薬剤耐性菌が存在す

る可能性は低いことが明らかとなった。

### (3) 在来希少種カワバタモロコの環境 DNA による検出系の確立

福岡 有紗, 高原 輝彦, 松本 宗弘, 兵庫県立農業高校生物部, 丑丸 敦史,  
源 利文

日本生態学会誌 66,613-620(2016).

レビュー：浜砂 有紀

近年、生物多様性の減少が著しく進んでおり、汽水・淡水域における生物や希少種の保全、低密度で存在する対象種の分布を把握することが重要である。従来の調査手法である直接捕獲、目視観察は相当な時間と労力を必要とするが、近年では環境 DNA を用いることによって従来の手法よりも遥かに効率の良い調査が可能となっている。そこで本研究では、絶滅危惧種に分類されているコイ科のカワバタモロコを対象として、環境 DNA 法を用いた検出法を確立し、野外での分布調査における有用性を検討した。環境 DNA は、TaqMan プローブ法を用いたリアルタイム PCR によって検出した。本研究で開発した検出系の妥当性を確認するため、神戸大学構内において対象種が生息する 2 カ所のビオトープで調査した。ビオトープの池から 500 ml を採水し、ガラス繊維ろ紙(GF/F)によって吸引ろ過した。そして、ろ紙の DNA を抽出し、対象 DNA の検出を行った。また、神戸市内の対象種が分布既知のため池 11 箇所、および兵庫県内の分布未知のため池 81 箇所において、250 ml を採水し、同様の工程で対象 DNA を検出した。対象 DNA が検出された地点の PCR 産物は、ダイレクトシーケンスを行い、塩基配列を確認した。さらに、対象 DNA が検出された地点において捕獲調査を実施し、野外での分布調査に対する有用性を検討した。

分布既知のため池 11 箇所のうち、生息が確認されている 7 箇所全てにおいて対象 DNA が検出され、生息が確認されていないため池 4 箇所では対象 DNA は検出されなかった。分布未知のため池 81 箇所では、6 箇所から対象 DNA が検出され、ダイレクトシーケンスによって、それらの PCR 産物は対象種のものであることが確認された。さらに、そのうちの 5 箇所から対象種が捕獲された。従来の捕獲作業では、1 日に 5、6 箇所程度の調査が限界であった。しかし、環境 DNA 法では、5 日間で 81 箇所の調査が実施でき、その作業時間が 5 分程度であるにも関わらず、5 箇所の新規生息地が発見された。したがって、環境 DNA を用いた手法は、希少種の分布調査に対して有用である。一方、対象 DNA が検出された地点において、1 箇所だけ捕獲できなかった地点があり、その要因として、(1)対象種が低密度で捕獲できなかった、(2)外来種侵入による駆逐、(3)検出地点での偽陽性が考えられる。今後は、捕獲調査の頻度や方法の変更、駆逐の原因と考えられる魚種

の DNA 検出を同時に行うなど、環境 DNA 手法の改良を検討する必要がある。

#### (4) 食品あるいはその製造環境から分離されたグラム陰性桿菌の薬剤耐性状況

中村 寛海, 安福 潔, 平山 照雄, 平井 有紀, 藤原 佐美, 西尾 孝之  
日本食品微生物学会雑誌, **33**(2), 61-68 (2016).

レビュー：廣木 颯

最も有力な  $\beta$ -ラクタム系抗菌薬に耐性を示すカルバペネム耐性腸内細菌科細菌 (CRE) が欧米を中心に広がり、問題となっている。CRE を含む薬剤耐性菌は、食品を介してヒトに伝播する可能性があるが、我が国において食品からの薬剤耐性菌の検出報告は少ない。そこで本研究では、食品製造環境や食品から分離したグラム陰性桿菌を対象として、CRE の国内での拡散状況を調査した。試料は、2008 年 4 月～2013 年 1 月において、大阪市内の食品製造施設と販売食品から分離されたグラム陰性菌 114 株とした。分離した菌株は、ディスク法によってメロペネム (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) に対する薬剤感受性試験を実施し、カルバペネム耐性菌を検出した。また、ニトロセフィン法によって  $\beta$ -ラクタマーゼの保有を確認した。さらに、セフォタキシム (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 含有 MacConkey 寒天培地および基質特異性拡張型  $\beta$ -ラクタマーゼ (ESBL) 選択培地を用いたスクリーニング試験によって、ESBL 産生菌株と AmpC 型  $\beta$ -ラクタマーゼ (AmpC) 産生菌株の発育を確認した。発育した菌株は、ディスク法によって 11 種類の抗菌薬に対する薬剤感受性を評価し、ESBL および AmpC を判定した。判定された菌株について、PCR 法によって CTX-M を含む 11 種類の薬剤耐性菌遺伝子を検出した。さらに、CTX-M 遺伝子を保有していた菌株について、CTX-M1, 2, および 9 遺伝子型と RAHN 遺伝子型への分類を行った。

メロペネムに対する薬剤感受性試験を実施した結果、1 株のみが耐性を示した。その一方、分離した 114 株について  $\beta$ -ラクタマーゼの保有を確認したところ、61.4% (70/114 株) が陽性を示した。そこで、スクリーニング試験を実施した結果、47.4% (54/114 株) の発育が確認された。そのうちの 23 株について薬剤感受性試験を実施した結果、セフォキシチン耐性菌が 10 株 (*Pseudomonas fluorescens*; 1 株, *Enterobacter* 属; 8 株, *Citrobacter freundii*; 1 株) 検出され、そのうちの 6 株は AmpC 産生菌と考えられた。また、セフポドキシム中度耐性株が 2 株 (*Rahnella aquatilis*) 検出された。そこで、薬剤耐性遺伝子を検出したところ、*R. aquatilis* の 2 株は、CTX-M 型を保有する ESBL 産生菌であったが、CTX-1, 2, および 9 の遺伝子型ではなく、*R. aquatilis* の CTX-M 型は RAHN-2 に分類され、プラスミド性の耐性遺伝子とは異なった。以上のことから、本研究から検出されたグラム陰性桿菌が CRE である可能性は低い、CFX に耐性を持つ菌や

ESBL 産生菌は拡散していることが示唆された。

## 第 271 回雑誌会

(Aug. 25, 2017)

### **(1) Heterotrophic cultivation of mixed microalgae for lipid accumulation and wastewater treatment during sequential growth and starvation phases: Effect of nutrient supplementation**

Devi, P., Subhash, V. and Mohan V.

Renewable Energy **43**, 276-283 (2012).

Reviewed by K. Nakada

現在、急速な化石燃料の利用によって、資源の枯渇や大気汚染の影響が問題となっている。そこで、生物燃料の生産における生体触媒の可能性を持つ微細藻類は、下水処理水による生長能力および窒素やリンの除去能力を有することから、高い注目を集めている。また、微細藻類から生産される生物燃料は、微細藻類における生物量の生産率および脂質量に依存している。そこで本研究では、生活排水を用いて、従属栄養培養している混合微細藻類の脂質生産性における生長段階および飢餓段階の連続培養による影響を評価した。供試生物は、インドの Nacharam Cheruvu 湖の排水管付近から採取した混合微細藻類を用いた。試験は、生活排水に窒素 (N)、リン (P)、炭素 (C)、およびカリウム (K) を用いて、C, N, P, C+N, C+P, C+N+P, N+P, および N+P+K の 8 条件とし、バイオマスの生長と脂質蓄積について検討した。生長段階 (GP) における微細藻類のバイオマスと脂質生産率を算出した。さらに、飢餓段階 (SP) における微細藻類の脂質生産率を算出した。GP と SP について、それぞれ 8 日間ずつ連続培養し、GP のバイオマスと脂質生産率の初期値は、それぞれ 0.22 mg/mL と 5.3% にした。また、対照区には生活排水のみを使用した。

生長段階における栄養塩の影響を検討した結果、N+P の条件におけるバイオマスは、1.69 mg/mL となり、最も生長した。N+P の条件でバイオマスが最も高くなった理由は、生長促進に伴って DNA 構造に N と P が作用したためと考えられる。一方、C のみの条件における脂質生産率は 14.5% となり、最大であった。この要因は、光合成組織に利用する代わりに、中性脂質を全脂質の蓄積とするためと示唆された。飢餓段階では、C のみの条件における脂質生産率についても 28.2% となり、最も高い値を示した。脂質の生産については、栄養が不足している時に多く生産されることが確認されており、本実験においても生長段階と比較して、飢餓段階における脂質生産性が高いことがわかった。以上の結果から、微細藻類は生物燃料生産における理想的な材料であり、生長段階と飢餓段階を連続して実施することによって、バイオマスの生長と脂質生産に良い影響を及ぼすことが示唆された。

## **(2) Performance appraisal of foam separation technology for removal of Co(II)-EDTA complexes intercalated into in-situ formed Mg-Al layered double hydroxide from radioactive liquid waste**

Mamdoh, R. M., Mohamed, A. S. and Ghada, M. R.

Chemical Engineering Journal, **326**, 782-793 (2017).

Reviewed by B. Maralmaa

The combination of coprecipitation and foam separation is utilized for removal of CoEDTA<sup>2-</sup> complexes which are known with their contamination and markedly increases the mobilization of cobalt into the environment. This approach was based on intercalation of these complexes into Mg-Al layered double hydroxide (LDH) colloidal particles, in-situ formed by coprecipitation process, and the subsequent separation of these particles by foam separation. The effects of various experimental conditions for the removal efficiency of LDH particles intercalated with CoEDTA<sup>2-</sup> were evaluated as following parameters: pH, [Mg(II)/[Al(III)] molar ratio, aging time, concentrations of collector, frother, EDTA and competitive anions. The pH was ranged between 4-12 using NaOH. The suspension was kept under stirring for 15 min before transferred to the foam separation cell. In the foam separation process, sodium lauryl sulfate (SLS) and cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) as anionic and cationic collectors, and ethanol (EtOH) as frother were used. Furthermore, this study was extended to investigate the efficiency of the proposed method for the removal of CoEDTA<sup>2-</sup> from radioactive liquid waste.

SLS was more effective for removal of CoEDTA<sup>2-</sup> than that of CTAB. At the range of [Mg(II)]/[Al(III)] molar ratio 0.5 to 3, the optimum ratio was 2. In the pH ranges of 8-10 and 9-10 using CTAB and SLS, the removal of CoEDTA<sup>2-</sup> from the artificial liquid waste was reached to 92%. The impact of foam separation parameters and concentrations of SLS and EtOH played a significant role. The effect of various competitive anions on the removal efficiency of CoEDTA<sup>2-</sup> was examined. Their deleterious effect was followed  $\text{NO}_3^- < \text{Cl}^- < \text{SO}_4^{2-} < \text{CO}_3^{2-}$  in order. The efficiency of the coprecipitation/foam separation process was more than 95% of CoEDTA<sup>2-</sup> removal from the radioactive liquid waste within 1min of flotation time. Accordingly, the present treatment process has the potential application for treatment of wastewaters contaminated with metal-EDTA complexes.

## 第 272 回雑誌会

(Sep. 1, 2017)

### (1) Tracing recent environmental changes and pe-dogenesis using geochemistry and micro-morphology of alluvial soils, Sabie-Sand River Basin, South Africa

Eze, P. N., Knight, J. and Evans, M.

Geomorphology, **268**, 312-321 (2016).

Reviewed by T. Itakiyo

南アフリカの Sabie 川は、生物学的に多様な河川である。なかでも、Sabie 川の堆積段丘における化学的風化および土壌生成は、過去の環境変化の指標として研究されている。そこで本研究は、Sabie 川の堆積段丘における土壌学的特性を調査した。調査は、Sabie 川の沖積地帯のうち、高部沖積段丘 (P1)、中部沖積平野 (P2)、低部沖積氾濫原 (P3) の 3 地点を対象とした。各地点の地層断面の層位から合計 12 試料を採取した。採取した試料は、2 mm のふるいによってふるい分けし、土色判別、粒度分析、元素測定、および顕微鏡観察を行った。元素測定によって得られた元素割合から、炭酸塩溶解率 (K/Ca)、ケイ酸塩溶解率 (K/Na)、塩性化率 ((K+Na) /Al)、および Al/Si を算出し、各試料を比較した。また、風化度指数である Chemical Index of Alteration (CIA) と Chemical Index of Weathering (CIW) によって風化状態を評価した。さらに、顕微鏡観察によって得られた情報から微細形態学的発達指数 (MISECA, 未発達: 1~強発達: 24) を算出し、風化作用や堆積作用によって土壌の性質が変化する土壌発達を評価した。

土色判別の結果、各地点における土色は褐色から暗赤褐色の間で変化した。また、P2 は、P1 や P3 と比較して明るい色相を示した。ふるい分けの結果、全試料の 94% 以上が 2 mm 以下の砂質であり、粗粒砂と中粒砂が約 50% を占め、粘土はほとんど存在しなかった (0%~0.2%)。元素測定の結果、SiO<sub>2</sub> が最も多く含まれており、各試料の 64.00~83.21% を占めていた。全地点において、K/Ca の値は K/Na の値よりも高いことから、ケイ酸塩溶解率よりも炭酸塩溶解率が高いことが明らかとなった。Al/Si の値は低く、土壌発達や風化の影響が弱いことがわかった。CIA の値は CIW の値よりも低く、未風化に近いことから、CIA は CIW よりも段丘内の風化指標に適していることが示唆された。全試料における MISECA の値は 4~8 であり、弱~中程度に発達した土壌であった。さらに、P1 と P3 における元素含有割合は、深度方向に不連続であることから、洪水による土壌の堆積-劣化サイクルの影響を受けていることが明らかとなった。以上の結果から、土壌学的特性を調査することによって、Sabie 川の体積段丘は、風化作用や発達が弱い土壌であり、洪水が土壌生成の要因になっていることが明らかとなった。

## (2) Damming the rivers of the Amazon basin

Latrubesse, E. M., Arima, E. Y., Dunne, T., Park, E., Baker, V. R., Horta, F. M., Wight, C., Wittmann, F., Zuanon, J., Baker, P. A., Ribas, C. C., Norgaard, R. B., Filizola, N., Ansar, A., Flyvbjerg, B. and Stevaux, J. C.  
Nature, **546**, 363-369 (2017).

Reviewed by K. Shirasaka

アマゾン川流域には、水力発電用ダムが 100 基以上建設されており、それに加えて数多くのダムの建設計画が検討されている。既設のダムや建設予定のダムが建設された場合の環境への累積的な悪影響は生物学的、水圏物理学的にも重要である。しかしながら、近年のアマゾン川におけるダムの影響評価はダムの近傍においてのみ行われており、このような局所的な検討では流域スケールの総合的な河川生態系の生産性予測や河川環境予測は不可能である。そこで本研究では、ダム環境脆弱性指数 (Dam Environmental Vulnerability Index :以下, DEVI) などの指標を用いることでアマゾン流域に既設・設置予定の 428 基のダムによる潜在的な影響を評価することを目的とした。アマゾン流域全体を対象として調査を行い、解析にはアメリカ地質調査所 (USGS) が公開している全球規模の水文学的データセット HydroSHEDS を用いた。DEVI はダムの潜在的な影響を評価する指標であり、流域の土地利用の変化を定量化する Basin Integrity Index (BII), 流送土砂量など河川の形態力学的変化を表す Fluvial Dynamics Index (FDI) およびダムの河川水系への影響を定量化する Dam Impact Index (DII) の 3 つを組み合わせたものである。DEVI は 1~100 で表され、値が大きいほどダムの影響を強く受ける可能性が大きいことを示す。

アマゾン流域を支流ごとに分けて DEVI を算出した結果、低地の支流域 (Purus, Juruá, Jutai, Jacari) は勾配が小さく、発電効率が悪いためにダムは建築されておらず、DEVI は低い値 (0~20) を示した。最も高い値を示した支流の流域は Madeira であった。この原因として、本流域に最近建設された 2 つの大規模ダム (Santo Antonio, Jirau) が考えられる。これらに建設予定のダムを含めると、DEVI は 80 を超え、生物多様性が失われる危険性が示唆された。以上のことから、アマゾン流域の全ての国が大規模ダム建設の影響を認識することが不可欠であり、国境を超えた対策と協力を行うべきと考えられる。最近の研究で、アマゾン流域においては水力発電が過剰であり、河川および河川沿岸の生態系破壊が問題視されている。風力エネルギーの活用や送電・配電システムの改善などによって水力発電への依存度を小さくするなど、ダム建設による影響を国際的および法的に制御することが必要である。

### **(3) Distribution of virulence factors in ESBL-producing *Escherichia coli* isolated from the environment, livestock, food and humans**

Müller, A., Stephan, R. and Nüesch-Inderbinen, M.

Science of the Total Environment, **541**, 667-672 (2016).

Reviewed by E. Nishimura

病原性大腸菌は、腸管外病原性大腸菌 (ExPEC) と腸管内病原性大腸菌 (IPEC) に分類される。ExPEC の 1 種である尿路感染性大腸菌 (UPEC) は、細菌感染症を発症させる主要な細菌であり、近年、ヒトだけに限らず動物や水環境からも検出されている。そのため、ExPEC の供給源を特定することは、それらが環境全体に拡散する経路を理解するうえで重要である。そこで本研究では、異なる宿主から分離した基質特異性拡張型  $\beta$ -ラクタマーゼ (ESBL) 産生大腸菌を対象として、病原因子の発現および分布を調査した。供試菌株は、異なる 7 種類の宿主から分離した ESBL 産生大腸菌 207 株 (表層水 60 株, 淡水魚 33 株, 野菜 26 株, 家畜動物のふん便 28 株, 鶏肉 13 株, 健康者のふん便 34 株, 患者のふん便 13 株) とした。分離した ESBL 産生大腸菌株について DNA を抽出した後、PCR 法によって、病原性大腸菌に関連する病原因子 (UPEC : 6 種類, IPEC : 8 種類) を検出した。また、7つのハウスキーピング遺伝子を対象とした MLST (Multi-Locus Sequence Typing) と triplex PCR 法によって、菌株の系統群分類を実施した。その後、得られた情報を用いて、宿主間における ESBL 産生大腸菌のクローン分布を調査した。

ESBL 産生大腸菌 207 株について病原因子を検出した結果、82% (169/207 株) が UPEC に関連する病原因子を 1 つ以上保有しており、全ての宿主から検出された。これに対して、IPEC に関連する病原因子は、表層水、淡水魚、野菜、家畜動物のふん便、およびヒトのふん便の菌株から検出された。また、各宿主から分離した菌株の病原因子数は、1~3 種類の範囲で変動し、患者のふん便で最も多かった。次に、系統群分類を実施した結果、系統群 A (62/207 株), B1 (60/207 株), B2 (29/207 株), および D (56/207 株) に分類された。各系統群に分類された菌株の病原因子数は、系統群 B1 が最も少なく、系統群 B2 が最も多かった。さらに、各菌株における病原因子と系統群の情報を用いて、宿主間におけるクローン分布を調査した結果、クローン A : ST10 (CTX-M-1) は、野菜を除く全ての宿主に分布しており、特に、家畜動物のふん便で顕著に確認された。クローン A : ST10 (CTX-M-55) と B2 : ST131 (CTX-M-27) は、全ての菌株が病原因子を保有しており、表層水、淡水魚、野菜、あるいは患者のふん便で分布が確認された。以上のことから、様々な宿主から分離した ESBL 産生大腸菌の多くは、病原因子を保有していることが明らかとなった。

## 第 273 回雑誌会

(Sep. 8, 2017)

### **(1) Distribution of clay minerals in marine sediments of Chennai, Bay of Bengal, India:**

#### **Indicators of sediment sources and transport processes**

Veerasingam, S. Venkatachalapathy. R. and Ramkumar. T.

International Journal of Sediment Research, **29**, 11-23 (2014).

Reviewed by A. Miyazono

海洋堆積物における鉱物は、隣接する土地の地質、水理学、および気候と密接に関連している。そのため、海洋堆積物の鉱物特性や粘土鉱物の調査によって、海洋堆積物の起源と堆積条件を把握することができる。そこで本研究では、炭酸塩相の同定ならびに、堆積物の分布と輸送過程を推定した。調査は、インドのチェンナイ沿岸にある Ennore から Neelangarai までの地域を対象に 10 m, 15 m, および 20 m の水深から計 21 地点において 21 個の表層土砂試料を採取した。採取した試料は、フーリエ変換赤外分光法 (FTIR) と X 線粉末回折法 (XRD) を用いて、鉱物種を同定し、FTIR と XRD の結果を比較した。また、試料における砂、シルト、および粘土の含有量を粒子解析によって推定した。さらに、ピアソンの相関行列、因子分析によって、鉱物種の特性に関連する因子を特定し、クラスター解析を用いて、鉱物種と堆積物の粒径の関係を評価した。

FTIR による分析の結果では、カオリナイト、亜塩素酸塩、イライト、石英、長石、酸化鉄 (マグネタイト、ヘマタイト) が存在した。また、XRD による分析の結果では、すべての試料において、石英が最もピーク強度が高い値を示した。さらに、カオリナイト、亜塩素酸塩、イライト、酸化鉄、および炭酸塩 (方解石・アラゴナイト) も同定された。FTIR では炭酸塩は同定されなかったが、XRD の結果とほぼ一致していた。また、堆積物の粒子解析の結果、調査地域では、砂が大部分 (最小値 : 68.06%, 最大値 : 97.28%) を占めた。さらに、相関行列と因子分析の結果、鉱物種の特性和粒径から 3 つの因子が特定された。石英、炭酸塩、結晶度指数、および砂は、第一・二において負の相関を示した。また、カオリナイト、イライト、酸化鉄、シルト、および、粘土は、第一・二因子において負の相関を示した。第三因子では、イライトと長石が正の相関を大きく示していた。特定された因子を用いてクラスター解析をした結果、3 つのグループ (I : 砂, 炭酸塩, および石英, II : シルト, 酸化鉄, カオリナイト, 有機物, 緑泥石, イライト, および粘土, III : 長石) に分類された。これは、相関行列と因子分析との結果とも一致していた。この結果から、チェンナイ沿岸における鉱物種について、FTIR と XRD の結果が一致していたことから、FTIR の信頼性が確認できた。また、鉱物の分布と堆積物の堆積状況が明らかとなった。

## **(2) Watershed scale application of WEPP and EROSION 3D models for assessment of potential sediment source areas and runoff flux in the Mara River Basin, Kenya**

Defersha, B. M, Melesse, M. A, McClain, E. M

Catena, **95**, 63-72 (2012).

Reviewed by Y. Kanayama

東アフリカに位置するケニアは、人口増加による土地利用の変化で生じた土壌侵食が深刻な問題となっている。中でも、Mara 川流域は、上流域の森林が集中的に農地へと転換されており、土壌侵食が著しく進行している地域の一つである。しかしながら、Mara 川流域において土壌侵食量の定量化を行った研究例は存在しない。そこで本研究は、ケニアの Mara 川流域を対象に 3D erosion model および WEPP model の 2 つのモデルを適用し、流域内の土砂生産量と土壌侵食量を推定することを目的とした。土壌データには、東アフリカの土壌地形データベース (SOTER) のデータを用いた。降水量データには、Mara 川流域内に位置する 3 つの観測所 (Bomet, Tenwek, Hail) の観測値を用いた。そして、デジタル標高モデル (DEM) を用いて、流域内の土壌パラメータと地形的特徴を定義した。モデルの解析期間は、2009 年の 5 月から 2009 年の 8 月とした。

流出解析の結果、Mara 川流域の流出高は 258 mm/y と推定された。さらに、異なる土地利用や土地被覆で流域内の流量が変動することがわかった。流域内の平均土壌侵食量は、約 31 t/ha/y と推定された。土地利用と土壌侵食量の関係を解析した結果、農地における土壌侵食量が最も多く (120 t/ha/y)、草地における土壌侵食量が最も少なかった (3 t/ha/y)。また、勾配と土壌侵食量の間には有意な相関関係は認められなかった。このことから、Mara 川流域における土壌侵食は、地形よりも土地利用の変化に影響される可能性がある。土壌の物理的性質と土壌侵食量の関係を解析した結果、土壌侵食量は、砂と粘土粒子の含有量において負の相関が認められ、シルト粒子の含有量と最も強い正の相関が認められた ( $r=0.76$ ;  $p<0.01$ )。これは、土壌のシルト粒子の含有量に比例して、土壌侵食量が増加することを示している。流域内の土砂生産量は、農地において最も多く、草地において最も少なかった。以上のことから、土地利用や土地被覆の変化は、Mara 川流域の土壌侵食や流量変動に大きく寄与していることが示唆された。

### (3) Next generation sequencing-based multigene panel for high throughput detection of food-borne pathogens

Ferrario, C., Lugli, G. A., Ossiprandi, M. C., Turroni, F., Milani, C., Duranti, S., Mancabelli, L., Mangifesta, M., Alessandri, G., Sinderen, D. and Ventura, M.  
International Journal of Food Microbiology, **256**, 20-29 (2017).

Reviewed by A. Jikumaru

食品媒介性病原体 (FBPs) は食品上に存在し、食品摂取によって様々な病気をもたらすことが問題視されている。これら FBPs の存在を明らかにすることは、食品衛生上重要である。近年、次世代シーケンサー (NGS) による 16S rRNA を対象とした菌叢解析によって、食品の細菌叢を迅速かつ高感度で把握することが可能となった。本研究では、前者とは異なり、FBPs の特異遺伝子を対象として、NGS による FBPs の検出法 (NGS 法とする) を開発し、その有用性を検証した。対象の FBPs は 25 種類とし、DNA 抽出後、PCR 法、Multiplex-PCR 法、および NGS 法によって、関連する 49 種類のプライマー対の特異性を検証した。そして、特異性を示したプライマー対のみを以下の実験で用いた。試料は、鶏肉、チーズ、および魚の切り身を対象食品とし、試料における FBPs の有無を PCR 法によって確認した。PCR 法によって汚染が確認された試料 (自然汚染試料) について、Multiplex-PCR 法で増幅後、NGS によって FBPs の検出を行った。PCR 法によって確認されなかった FBPs (*Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni*, *Shigella sonnei*, および *Salmonella enterica subsp. enterica serovar enteritidis*) を各濃度 ( $10^1$ ,  $10^3$ , および  $10^5$  cells/mL) に調整した懸濁液を作成し、懸濁液によって汚染した試料 (人為汚染試料) についても同様の実験を行った。

PCR 法、および Multiplex-PCR 法によって約 39% (19/49) のプライマー対が特異性を示した。さらに、NGS 法によって、12 種類の特異性プライマー対が選択され、対象となる FBPs は 8 種類となった。そこで、NGS 法によって対象食品から FBPs の検出を行った結果、自然汚染試料では、合計 6 種の FBPs (*Campylobacter coli*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Yersinia enterocolitica*, *S. sonnei*, および *S. enteritidis*) が検出され、鶏肉、および魚の切り身は、チーズと比較して低いリード数であった。人為汚染試料では、全ての試料から人為的に汚染した FBPs が各濃度条件 (最低濃度:  $10^1$  cells/mL) において検出された。鶏肉、および魚の切り身は、チーズと比較して、リード数が 2~3 オーダー低下した。リード数の違いは、各食品の DNA 抽出効率や PCR 阻害物質の影響によって生じた可能性がある。以上のことから、本研究で開発された NGS 法は、食品によって感度の違いがあるものの、食品からの FBPs 検出に有用であることが示唆された。

## 第 274 回雑誌会

(Sep. 15, 2017)

### (1) Comparison of biofilm formation and antibiotic resistance pattern of *Pseudomonas aeruginosa* in human and environmental isolates

Gholami, S., Tabatabaei, M., Sohrabi, N.

Microbial Pathogenesis, 109, 94-98 (2017)

Reviewed by H. Hiroki

緑膿菌は、患者に対して日和見感染症を発症させる病原体である一方、土壌や水環境に広く分布している。また、3つの細胞外高分子物質（EPS）によってバイオフィームを形成することができる。EPSの1つであるアルギン酸塩は、バイオフィーム形成において重要な物質であり、薬剤耐性の獲得に寄与する。そこで本研究では、ヒトおよび環境から分離した緑膿菌を対象として、バイオフィーム形成および薬剤感受性を比較した。試料は、ヒト（呼吸器感染患者 27 検体、尿路感染症患者 13 検体、火傷患者 10 検体）および環境（土壌 32 試料および表層水と水道水 18 試料）から分離した計 645 株とした。分離した菌株について生化学性状試験によって、緑膿菌を同定した。同定された菌株について DNA を抽出後、16s rRNA 遺伝子、バイオフィーム因子（*algD*, *algU* 遺伝子）および薬剤耐性遺伝子（*bla<sub>TEM</sub>*, *bla<sub>SHV</sub>* 遺伝子）を標的とした PCR 法によって、各遺伝子の保有を確認した。その後、Wakimoto モデルを用いて緑膿菌がバイオフィームを形成する表現型能力を調査した。さらに、ディスク法によって、12 種類の抗菌薬に対する薬剤感受性試験を実施した。なお、各試験によって得られた結果は、統計解析によって、ヒトと環境分離株の有意差を算出した。

陽性コロニーから分離した株（ヒト：152 株、環境：493 株）について、菌種同定を実施した結果、ヒト分離株で 34%（52/152 株）、環境分離株で 11%（55/493 株）が緑膿菌と同定された。同定された菌株についてバイオフィーム因子の検出を行ったところ、ヒト分離株の 98%が *algD* と *algU* を保有しており、環境分離株の 80%と 70%が *algD* と *algU* を保有していた。また、薬剤耐性遺伝子を検出したところ、ヒト分離株の 92%と 16%が *bla<sub>TEM</sub>* と *bla<sub>SHV</sub>* を保有していた。これに対して、環境分離株の 20%と 6%が *bla<sub>TEM</sub>* と *bla<sub>SHV</sub>* を保有していた。次に、バイオフィーム形成単離株とみなされる光学密度の基準が 0.2 よりも高い株の存在確率を調査したところ、ヒトと環境分離株において 70%と 28%の存在割合であった。さらに、薬剤感受性試験を実施した結果、ヒト分離株は、ゲンタマイシン（74%）およびメロペネム（70%）に対して高度耐性を示した。これに対して、環境分離株の耐性率は低かった。以上より、緑膿菌におけるバイオフィームの形成能力および薬剤耐性率は、ヒト分離株の方が高いことが示唆された。

## (2) Dissemination of antibiotic resistant *Enterococcus* spp. and *Escherichia coli* from wild birds of Azores Archipelago

Tiago, S., Nuno, S., Gilberto, I., Pedro, R., Joana, M., Tiago, R., Robert, R., Alexandre, G., Catarina, M., David, G., Regina, C. and Patricia, P. *Anaerobe*, **24**, 25-31 (2013).

Reviewed by K. Sugita

野生動物からの薬剤耐性菌の検出は、薬剤耐性菌の拡散状況を知るためのひとつの重要な指標である。その一方で、野生動物の薬剤耐性菌の保有について調査した事例は少なく、特に、遠隔の諸島に生息する野鳥における薬剤耐性菌の保有に関する情報はほとんど明らかになっていない。そこで本研究では、大西洋に位置するアゾレス諸島に生息する野鳥を対象として、腸内細菌の薬剤感受性と耐性遺伝子の保有を調査した。試料は、アゾレス諸島の9つの島に生息する野鳥（9種の燕雀類；178検体，2種の鴉鳥類；40検体）のふん便とした。試料から、各選択培地を用いて腸球菌および大腸菌陽性株をそれぞれ単離した。腸球菌陽性株は生化学性状試験とPCRの併用によって菌種を同定し、大腸菌陽性株は生化学性状試験によって菌種を同定した。また、大腸菌と同定された菌株は、PCR法によって系統群分類を実施した。その後、ディスク法によって抗菌薬（腸球菌11種類，大腸菌16種類）に対する薬剤感受性試験を実施した。さらに、1薬剤以上に耐性を示した菌株について、PCR法によって薬剤耐性遺伝子を検出した。

単離した菌株について菌種同定を実施した結果、腸球菌の同定率は63%（138/218株）であり、そのうち、*E. faecalis*が43%（59/138株），*E. faecium*が29%（40/138株），*E. hirae*が9%（12/138株），*E. durans*が20%（27/138株）同定された。これに対して、大腸菌の同定率は53%（115/218株）であった。また、同定された大腸菌115株について系統群分類を実施した結果、系統群A，B1，B2，およびDの割合は、それぞれ17%（20/115株），46%（53/115株），14%（16/115株），および23%（26/115株）であった。次に、各菌種に同定された菌株について薬剤感受性試験を実施した結果、1薬剤以上に耐性を示した腸球菌は、46%（64/138株）検出され、テトラサイクリン，シプロフロキサシン，およびエリスロマイシンに対して高度耐性を示した。これに対して、大腸菌は、24%（28/115株）検出された。また、1薬剤以上に耐性を示した菌株について薬剤耐性遺伝子を検出したところ、バンコマイシンに耐性を持つ*E. faecalis*1株から*vanA*遺伝子が検出された。以上のことから、遠隔の諸島に生息する抗菌薬を直接使用しない野鳥にも、薬剤耐性を獲得した腸内細菌が伝播していることが示唆された。

### (3) 犬猫の各種感染症における分離菌頻度，アンチバイオグラムおよび抗菌薬選択法

宮本 忠，嶋田 恵理子，木村 唯

山口獣医学雑誌, **40**, 15-23 (2013).

レビュー：溝田 悠貴

ヒトが細菌によって感染症を発症した場合，初期段階では，抗菌薬への感受性が不明であるため，アンチバイオグラム（抗菌薬感受性率表）を用いた治療が経験的に行われる。しかしながら，獣医学分野では，アンチバイオグラムに関する情報が少ない。そこで本研究では，感染症を発症した犬と猫を対象として，原因菌の分離頻度と薬剤感受性を調査し，各分離菌のアンチバイオグラムを作成した。調査は，2006年1月から2013年9月にかけて，感染症を発症した犬と猫1378頭を対象として実施した。試料は，犬と猫の各部位から分泌物を採取した。試料採取後，羊血液寒天培地とBTB（bromothymol blue）寒天培地を用いて菌株を分離した。菌株を分離した後，グラム染色を確認し，生化学的性状試験によって菌種を同定した。耐性の有無による薬剤感受性率を比較するため，*Staphylococcus spp.*と同定された菌株について，セフォキシチンディスク法によって，メチシリン耐性*Staphylococcus spp.*を検出した。また，*Escherichia coli*と*Klebsiella pneumoniae*と同定された菌株について，基質特異性拡張型βラクタマーゼ（ESBL）を産生するか検討した。その後，各菌株についてディスク法と微量液体希釈法によって薬剤感受性試験を実施した。さらに，得られた結果からアンチバイオグラムを作成した。

犬と猫から分離した菌株について菌種同定試験を実施した結果，11属の菌種が同定された。中でも，*Staphylococcus intermedius group*と*Escherichia coli*が優占種として同定された（*S. intermedius group*, 372株；*E. coli*, 173株）。そこで，*S. intermedius group* 372株に対して，23種の薬剤耐性試験を実施した結果，メチシリン非耐性株は，クラバン酸・アンモキシシリン，セフェム系抗菌薬（3種），イミペネム，およびホスホマイシンに高い感受性率を示した（82~100%）。その一方で，メチシリン耐性株は，これらの抗菌薬に低い感受性率を示した（0~34%）。次に，*E. coli* 173株について23種の薬剤耐性試験を実施した結果，ESBL非産生株は，セフェム系抗菌薬（7種），アズトレオナム，およびレボフロキサシンに高い感受性率を示した（83~100%）。これに対して，ESBL産生株は，これらの抗菌薬に低い感受性率を示した（0~21%）。また，*S. intermedius group*と*E. coli*以外の菌株についても，抗菌薬への感受性率は，耐性の有無や菌種によって大きく変動していた。以上のことから，犬や猫が感染症を発症した場合，今回作成したアンチバイオグラムを用いることで，適切な抗菌薬を選択することが可能になる。

## 第 275 回雑誌会

(Sep. 29, 2017)

### (1) Nuclear internal transcribed spacer-1 as a sensitive genetic marker for environmental DNA studies in common carp *Cyprinus carpio*

Minamoto, T., Uchii, k., Takahara, T., Kitayoshi, T., Tsuji. S., Yamanaka, H. and Doi, H.  
Molecular Ecology Resources, 17, 324-333(2017).

Reviewed by Y. Hamasuna

生物の存否や生息分布を推定する環境 DNA (eDNA) 分析において、遺伝子マーカーとしてミトコンドリア DNA (mtDNA) が用いられてきている。しかし、mtDNA マーカーには、コピー数の変動性の高さや母系遺伝など、遺伝子マーカーとしての課題がある。一方で、核 DNA (ncDNA) には、ITS 領域を含むリボソーム DNA (rDNA) のコピーが複数存在し、それらのコピー数は個体の状態や細胞の種類に関わらず一定である。さらに、rDNA には、ITS1 および ITS2 が存在することから、近縁種の遺伝子同定に有用であると考えられる。そこで本研究では、コイ (*Cyprinus carpio*) を対象種として、ITS1 領域の eDNA 分析の遺伝子マーカーとしての有用性を検証した。琵琶湖に生息するコイの近縁種であるフナ属の魚 (ニゴロブナ, ギンブナ, およびゲンゴロウブナ) から DNA を抽出した。そして、コイを対象に設計されたプライマーおよびプローブの特異性について、DNA 量を変化させ (100, 10, 1, および 0.1 pg), qPCR 法によって検証した。次に、野生のコイ 27 個体の脳, 鰓, および腸内容物から DNA を抽出し, qPCR 法によって ITS1, および mtDNA である CytB のコピー数を測定した。さらに、メソコスム, 池, および湖の水を採水し, DNA 抽出後, qPCR 法によって ITS1 および CytB のコピー数を測定した。さらに、ITS1 と CytB の検出感度を比較するために、2014 年 10 月 28 日に滋賀県の伊庭内湖から 10 L の水を採水し, 異なるろ過量 (1000 mL, 330 mL, 100 mL, 33 mL, および 10 mL) におけるコピー数を qPCR 法で測定した。

設計したプライマーとプローブの特異性を調べた結果、DNA 量が最大の 100 pg のときにはニゴロブナのみが陽性を示した。しかし、10 pg 以下の DNA 量では近縁種における陽性は確認されなかった。得られた増幅産物について、コイの ITS1 から得られた配列と同一であると確認された。野生のコイの細胞当たりのコピー数を比較した結果、CytB では、脳, 鰓, および腸内容物の細胞間で有意に変動したが、ITS1 では、脳, 鰓, および腸内容物の細胞間において有意な差は見られなかった。これは、核遺伝子のコピー数が個体の細胞型や成長段階に関係なく一定なことに起因すると考えられる。さらに、異なる環境における水試料から ITS1 と CytB のコピー数を比較した結果、ITS1 のコピー数は CytB のコピー数よりもメソコスムで約 160 倍、池で約 300 倍、湖で約 150 倍高かった。コピー数の定量に必要な湖水の最小量は、ITS1 で 33 mL, CytB で 100 mL であった。ITS1 を使用することによって、少ない水量で対象種の DNA 検出が可能であることがわかった。これは eDNA 分析において、PCR 阻害物質の影響を小さくするために有意義である。以上のことから、eDNA 分析において、ncDNA 中の ITS1 は、mtDNA と比較して、さらに高感度で有用性の高い遺伝子マーカーとなることが示唆された。

## **(2) Examination of flotation behavior of metal ions for process water remediation.**

Unzile, Y. and Gulay, B.

Journal of Molecular Liquids, **241**, 130-135 (2017).

Reviewed by B. Maralmaa

The most of the industrial processes produces solutions containing low concentrations of heavy metals. It is significant to remove these ions from aqueous solution due to environmental regulations. In this paper, ion flotation method was employed to remove metal ions such as copper, lead, zinc, cadmium and nickel from aqueous solution. Firstly, several parameters such as pH, concentration and type of surfactants were investigated along with copper. Anionic sodium dodecyl sulfate (SDS), potassium ethyl xanthate (KEX), cationic hexadecyltrimethyl ammonium bromide (HTAB) and nonionic saponin reagents were used on the ion flotation process as surfactants. In addition, copper precipitation test was applied to make comparison with ion flotation method. After that, ion flotation was tested on multiple ions individually and collectively in different type of flotation machines. Synthetic waste water sample was composed from 20 mg/L of each Cu, Pb, Zn, Ni and Cd ions. In the ion flotation, hallimond tube was used to optimize experimental conditions, and those conditions were tested with laboratory type Denver flotation machine with different rotor speeds (700-1200 rpm). All metal speciation diagrams were drawn by Medusa Hydra chemical equilibrium software program, and the metal ion concentrations were analyzed by atomic absorption spectrometry (AAS).

As results of flotation tests, all metals except lead and cadmium ion was removed from water successfully. It was observed that the optimum pH for maximum flotation of metals is varied for each metal by single flotation test. However, they were acting almost similar to each other, when all the metals were together in the solution. For the removal rate of metals, SDS was acted more effectively as a surfactant than others. The best conditions were found as pH 9, each metal concentration of 20 mg/L, flotation time of 3 min, with 1:1 ratio of sodium dodecyl sulfate and metal concentration where metals and SDS surfactant makes strong adsorption. The metal removal was found to be over 80% in all rotor speeds and highest removal was obtained as 89.5% at 900 rpm by ion flotation process using Denver flotation machine. This study showed that ion flotation technique is proposed to clean process waters which are produced in flotation plants that contain low concentrations of metals, just by adding another flotation unit cell in the end of the process.

### (3) 水田の有機農法がサギ類の採食効率および個体数に与える影響

片山 直樹, 村山 恒也, 益子 美由希

日本鳥学会誌, 64(2), 183-193 (2015).

レビュー：西元 竣哉

近年, 有機農法などの環境保全型農業が生物多様性の増進にもたらす効果について研究の蓄積が進んでいる。しかしながら, 有機農法の効果は実地面積の少なさもあり, 鳥類を対象とした国内での研究事例は未だに報告されていない。そこで本研究では, 水田の代表的鳥類であるサギ類を対象に, 有機農法がサギ類に与える影響を評価した。サギ類の集団繁殖地が多く存在し, 水稻の実地面積が多い茨城県と栃木県の5市町において, 対象種をダイサギ, チュウサギ, およびアオサギとして生物学的な調査を実施した。食物内容と採食行動の調査を2013年5月14日~7月17日と2014年5月26日~7月8日に実施し, 食物種ごとの湿重量から各サギ個体の単位時間あたりの採食効率(湿重量 g/min)を推定した。個体数調査は, 2013年5月28日~7月3日および2014年5月26日~7月8日にかけて見晴らしのよい場所を定点として, 目視や鳴き声によって野生生物の種類や数を調査する方法(スポットセンサス)を用いて各年4回ずつ実施した。サギ類の食物内容における魚類の重量割合, 採食効率, 採食個体数を応答変数とし, 一般化線形モデル(GLM)を用いて解析した。説明変数は種, 年, 日付, 市町, 農法および2種類の交互作用項(種と年, 種と農法)の7つとした。

採食行動調査の結果, ダイサギ, チュウサギおよびアオサギの総観察個体数は85, 52および39となり, 総獲得食物量は1144.1g, 502.7g, 412.2gであった。慣行水田と有機水田の魚類の食物重量割合は, ダイサギ, チュウサギ, アオサギの順に高かった。2013と2014年の観察個体数は, ダイサギで8個体と25個体, チュウサギで24個体と5個体, アオサギで20個体と24個体だった。GLMの係数をみると, 食物内容の魚類割合, 採食効率, および採食個体数は, 有機水田と正の効果(係数: 0.796, 0.264, 0.87)を示した。ダイサギの主食がドジョウなどの魚類であり, 有機水田において採餌条件が向上したことが原因として考えられるが, チュウサギおよびアオサギでは原因が不明瞭であった。この理由として, (1)食物種ごとの水田農薬の影響の違い, (2)有機農法の実地面積割合の少なさなどが考えられる。今後, 農法および環境条件の違いを対象とした研究事例を蓄積することで, 地域の生物相を考慮した効果的な環境保全型農業のあり方を解明し, 農業生産性と生物多様性の両立を実現することが重要である。

## 第 276 回雑誌会

(Oct. 13, 2017)

### (1) Enhanced dewaterability of anaerobically digested sewage sludge using

#### *Acidithiobacillus ferrooxidans* culture as sludge conditioner

Murugesan, K., Ravindran, B., Selvam, A., Kurade, M., Yu, S. and Wong, J.

Bioresource Technology, **169**, 374-379 (2014).

Reviewed by K. Endo

鉄酸化細菌の一種である *Acidithiobacillus ferrooxidans* は硫酸鉄をエネルギー基質として利用し、第二鉄イオンを生産する。生産された第二鉄イオンは、下水汚泥処理において用いられる鉄系無機凝集剤と同様の働きをすると考えられている。しかしながら、*A. ferrooxidans* の培養物を無機凝集剤として検討した研究報告は少ない。そこで本研究では、嫌気性消化汚泥から単離した *A. ferrooxidans* の培養物による汚泥の調質実験を行った。全培養物、細菌細胞、および無細胞ろ液を、*A. ferrooxidans* のエネルギー基質である硫酸鉄添加の有無を区別した嫌気性消化汚泥に添加し、6日間インキュベート処理を行って汚泥フロックを得た。得られた汚泥フロックについて、生物酸化による pH の変化と ORP（酸化還元電位）の変化を調べた。さらに、汚泥フロックの脱水性を評価するため、CST（毛細管吸引時間）と SRF（ろ過比抵抗）を計測した。

汚泥フロックの pH は、細菌細胞のみを硫酸鉄添加消化汚泥に加えた場合、2日間の処理で 7.45 から 2.7 に低下した。これに対して、細菌細胞を硫酸鉄無添加消化汚泥に添加した場合には、未処理の消化汚泥と比較して、pH に有意な結果は確認されなかった。全培養物、無細胞ろ液を消化汚泥に添加した場合は、硫酸鉄の添加の有無に関わらず有意な pH の低下が確認された ( $P < 0.05$ )。未処理の消化汚泥の ORP は、2日目の計測で 224 mV を示し、硫酸鉄添加消化汚泥に全培養物、無細胞ろ液を添加した場合には、2日間の処理で 550 mV 以上に達することが確認された。また、CST は、未処理の消化汚泥では 28.2 秒であり、硫酸鉄無添加消化汚泥に細菌細胞のみを添加し、4日間処理したものが 20.7 秒であった。最小値を示したのは、硫酸鉄添加消化汚泥に全培養物を添加し、4日間処理したもので、15.0 秒であった。未処理の消化汚泥の SRF は、 $1.36 \times 10^{13} \text{ m/kg}$  であり、硫酸鉄無添加消化汚泥に細菌細胞を加えて4日間処理した場合には、 $9.87 \times 10^{12} \text{ m/kg}$  であった。一方で、硫酸鉄添加消化汚泥に全培養物を加えて4時間処理した場合、未処理の消化汚泥と比較して、SRF が 87.3%減少した。以上のことから、*A. ferrooxidans* の培養物は、嫌気性汚泥への添加後、2日間から4日間程の処理時間を設けると汚泥の脱水性を改善できることが示唆された。

## (2) Occurrence of *Enterococcus* species with virulence markers in an urban flow influenced tropical recreational beach

Ahmad, A., Dada, A. C., Usup, G. and Heng, L. Y.

Marine Pollution Bulletin, **82**, 26-38 (2014).

Reviewed by T. Matsuwaki

熱帯気候のレクリエーション水域において水質の悪化は、利用客に対する水系感染症の発症リスクと強く関連している。そのため、水域の汚染状況を評価するための指標である腸球菌を対象としたモニタリング調査が行われている。しかしながら、水域から検出された腸球菌の動態や疫学的な特性に関する情報は少ない。そこで本研究では、マレーシアの Chempedak 湾内に位置する Teluk Chempedak を対象として、腸球菌の存在実態を調査した。調査は、試料採取前において降雨イベントが有る場合と無い場合について行った。調査地点について、以下の地点から試料を採取した：海水 (BW) ; Chempedak 川流入口付近の海水 (BWNTR) ; 砂浜の湿潤砂 (BS) ; Chempedak 川の河川水 (RC) と河床の砂 (RS)。各試料について、腸球菌をメンブランフィルター法によって計数し、菌株を単離した。単離した菌株について、PCR 法または 16S rRNA に基づく遺伝子解析によって菌種を同定した。また、同定された菌株について、K-B ディスク法によって 7 種の抗菌薬に対する薬剤耐性を評価した。

各調査地点における腸球菌数を計数した結果、River area (RC, RS :  $5.0\sim 9.0\times 10^7$  CFU/100ml) における腸球菌数は、Beach area (BW, BWNTR, および BS :  $2.8\sim 6.4\times 10^7$  CFU/100ml) と比較して、有意に高い値を示した ( $p<0.0079$ )。また、全調査地点において、降雨イベント後の調査 ( $2.8\sim 9.0\times 10^7$  CFU/100ml) では、降雨イベント無しの調査 ( $1.05\sim 3.55\times 10^5$  CFU/100ml) と比較して、腸球菌数が高くなる傾向を示した。次に、各試料から単離した腸球菌 96 株を同定した結果、BW, BWNTR では *Eenterococcus casseliflavus* または *E. faecalis* が優占種として同定された。その一方で、BS では、*E. hirae* , RC, RS では、*E. gallinarum* が優占種として同定された。同定した 96 株について薬剤耐性試験を行った結果、River area および Beach area とともにカナマイシンに対して、最も高い耐性率を示した (River area, 90.24% (37/41 株) ; Beach area, 85.45% (47/55 株))。また、テトラサイクリン、クロラムフェニコール、ストレプトマイシンへの耐性率は River area では高く、Beach area では、低くなる傾向を示した (River area, 51.22~68.29% ; Beach area, 7.27~27.27%)。以上の結果から、Teluk Chempedak に存在する腸球菌は、環境によって優占種や薬剤耐性率が大きく異なることが明らかになった。

## 第 277 回雑誌会

(Oct. 20, 2017)

### (1) Geochemical fingerprints and controls in the sediments of an urban river: River Manzanares, Madrid (Spain)

Miguel, E. N., Charlesworth, S., Ordóñez, A. and Seijas, E.

Science of the Total Environment, **340**, 137-148 (2005).

Reviewed by T. Itakiyo

世界的な都市人口の増加に伴い、都市河川の環境汚染は注目されている。なかでも都市河川堆積物は、微量元素を蓄積する可能性が高く、堆積作用および化学的挙動の予測は困難となっている。そこで本研究では、スペインのマドリードを通過する Manzanares 川を対象に、土砂に含まれる元素および鉱物種について調査を実施した。試料は、河川水位下における表層から 20 cm までの土砂を計 18 地点から採取した。採取した土砂は、硝酸、過塩素酸、フッ化水素による全温浸と酢酸ナトリウムと酢酸による弱温浸を行い、誘導結合プラズマ原子発光分光法 (ICP-AES) によって微量元素と主要元素を測定した。また、冷蒸気原子吸光法 (CV-ASS) によって Hg を測定した。さらに、X 線回折分析 (XRD) によって鉱物種を同定した。微量元素、主要元素、および Hg の測定結果は、階層クラスター分析と非階層クラスター分析 (K-平均クラスター法) によって各地点を比較した。また、因子分析によって各元素を比較した。

全温浸を行った試料における階層クラスター分析の結果、3 つのクラスターに分類された。Cluster 1 は、Manzanares 川上流地域の“自然”試料、Cluster 2 と 3 は、マドリードと Manzanares 川下流地域の“都市”試料で構成されていた。Cluster 3 は、Ca 濃度が Cluster 2 の 2 倍であったため、Ca を除去した K-平均クラスター法を実施した結果、都市部の影響を受けたサンプルが同一のクラスターに分類された。さらに、因子分析によって各元素を比較した結果、Ag, Cr, Cu, Pb, Zn は同一因子において相関が高かった。どのクラスターにも分類されなかった 1 試料は、As と Fe の濃度が高かった (As : 57  $\mu\text{g/g}$ , Fe : 90800  $\mu\text{g/g}$ )。XRD の結果から約 10%の黄鉄鉱の存在が確認され、黄鉄鉱が As と Fe の増加に関与することが示唆された。一方、弱温浸を行った試料の濃度を比較した結果、都市部および Manzanares 川下流地域において Zn と Cu の割合が流下に伴って高い値を示した。これは、河川流下において方解石が流入し、都市部で供給された Zn および Cu を方解石表面が吸着したためと推察された。以上の結果から、Manzanares 川の堆積物は、Ag-Cr-Cu-Pb-Zn が都市起源の元素であり、土壌における都市攪乱の指標となることが明らかになった。さらに、河川の下流側の地域において環境への悪影響が高まっていることが示唆された。

## (2) Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry assigns *Escherichia coli* to the phylogroups A, B1, B2 and D

Sauget, M., Nicolas-Chanoine, M. H., Cabrolier, L., Bertrand, X., Hocquet, D.

International Journal of Medical Microbiology, **304**, 977-983 (2014).

Reviewed by T. Ueda

大腸菌 (*Escherichia coli*) は、多様な遺伝子型に基づいて4つの主要な系統群 (A, B1, B2, D) に分類され、それぞれが生態的特異性を示す。なかでも、腸管外感染症の原因となる大腸菌の多くは系統群 B2 に属している。通常、大腸菌の系統群分類は PCR 法によって実施されるが、臨床検査では一般的に使用されていない。一方で、臨床検査における細菌の迅速な同定手法として、イオン化飛行時間型質量分析計 (MALDI-TOF MS) が普及し始めている。また、MALDI-TOF MS は、細菌を遺伝子型ごとに分類できることが報告されている。そこで本研究では、MALDI-TOF MS を用いた大腸菌の系統群分類手法を開発し、その分類能力を評価した。菌株は、2006 年から 2014 年にかけて臨床および環境から採取し、PCR 法によって各系統群に分類されている大腸菌とした。各菌株について、MALDI-TOF MS によってマススペクトルを取得した。その後、2つの異なるソフトウェア (Biotyper ならびに ClinProTools) を用いて、各菌株のマススペクトルを解析し、菌株を各系統群に分類した。

Biotyper によって、大腸菌 611 株を各系統群に分類した結果、B2 群 265 株中 255 株 (96%) が MALDI-Type1 に分類され、それ以外の群 (A, B1, D) 346 株中 290 株 (84%) が MALDI-Type2 に分類された。この結果から、Biotyper によって、感度 96%、特異度 84% で B2 群とそれ以外の群 (A, B1, D) に識別できることがわかった。しかしながら、この手法では、A, B1, および D 群の株を群ごとに識別することはできなかった。一方で、ClinProTools によって3つのモデルを定義し、大腸菌 556 株について系統群分類を行った結果、モデル 1 は、B2 群 249 株中 228 株 (92%) とそれ以外の群 (A, B1, D) 307 株中 285 株 (93%) に分類した。また、モデル 2 は、D 群 105 株中 79 株 (75%) とそれ以外の群 (A, B1) 202 株中 188 株 (93%) に分類した。さらに、モデル 3 は、A 群 169 株中 115 株 (68%) と B1 群 33 株中 25 株 (76%) に分類した。これらの結果から、3つのモデルを連続的に使用することによって、大腸菌を各系統群に正確に分類できることがわかった。以上のことから、MALDI-TOF MS は、病原性を保有している可能性が高い B2 群に属する大腸菌を迅速かつ簡便に検出することが可能であり、臨床分野における腸管外病原性大腸菌の疫学モニターのためのツールとして有用であると考えられる。

## 第 278 回雑誌会

(Oct. 27, 2017)

### (1) Environmental *Escherichia coli*: ecology and public health implications -a review

Jang, J., Hur, H. G., Sadowsky, M. J., Byappanahalli, M. N., Yan, T. and Ishii, S.

Journal of Applied Microbiology, **1364-5072**, 1-12 (2017).

Reviewed by R. Hashimoto

大腸菌はグラム陰性桿菌であり、水質を評価するふん便指標細菌 (FIB) として設定されている。大腸菌は最も研究されている細菌の一つであり、長期的な研究が継続中である。しかし、実験室条件下における大腸菌に関する研究が主であり、環境中における大腸菌についてはほとんど知られていない。また、近年では腸外環境において大腸菌が生残・増殖することが報告されており、大腸菌の FIB としての信頼性が危惧されている。そこで本研究では、自然環境中における大腸菌株の生態に関する知識を更新することを目的とし、環境中の大腸菌 (環境大腸菌) による水質と公衆衛生への影響についても議論した。

大腸菌の中にはヒトに対して病原性を示すものが存在し、多くの水系感染症に関与している。また、大腸菌は温血動物の腸管内に存在することから、宿主に使用される抗生物質と接触することによって、抗生物質に対して耐性を獲得することが報告されており、ヒトの活動に起因する公衆衛生上のリスクの増加が示唆されている。さらに、大腸菌は、多様な表現型、遺伝子型、および血清型を示し、近年では、遺伝子構造に基づいて 8 つの系統発生群 (A, B1, B2, C, D, E, F, および *Escherichia* clade I) に分類されている。通常、異なる系統発生群に属する大腸菌株は異なる表現型および遺伝子型を示すことから、未知の大腸菌株における系統発生群の同定は、大腸菌の生態に関する重要な情報を提供することが可能である。また、宿主の腸内環境は、大腸菌の系統発生群に大きな影響を与えることも報告されている。近年では、環境中の砂、土壌、底質、および付着藻類において、大腸菌が生残・増殖するとの報告がある。また、環境大腸菌から様々な薬剤耐性遺伝子も検出されており、環境中の水質に影響を与える可能性がある。自然環境における薬剤耐性および毒性の拡散に関する環境大腸菌の役割は、いまだ解明されておらず、今後明らかにする必要がある。大腸菌の生残・増殖に影響を及ぼす環境因子として、温度、水、栄養素、pH、日射、大腸菌以外の微生物の存在、バイオフィーム形成能力、および大腸菌株の生残・増殖能力の差などが挙げられる。環境大腸菌株のゲノム特性については、腸内大腸菌株とのゲノム解析の比較によって進化系統の理解が拡大しているが、さらに多くのゲノム情報が求められている。

これまで行われた研究によって、環境大腸菌の存在は認識されてきている。今後は、環境大腸菌の生態について詳細に調査を行い、より多くのデータ、特にゲノム情報の蓄積が不可欠である。

## (2) Antibiotic-producing bacteria from stag beetle mycangia

Miyashita, A., Hirai, U., Sekimizu, K., Kaito, C.

Drug Discoveries & Therapeutics, 9(1), 33-37 (2015).

Reviewed by H. Hiroki

新しい抗生物質や抗真菌剤の探索は、感染症の治療にとって非常に重要である。クワガタムシは、日本において飼育技術が確立されていることから、野生の生物資源として期待されている。また、クワガタムシの雌には、菌嚢という細菌を貯蔵する器官が存在する。しかしながら、この菌嚢中に存在する細菌について調査した事例は少ないのが現状である。そこで本研究では、クワガタムシの雌を対象として、菌嚢における細菌の存在を確認し、その細菌の増殖阻害活性を調査した。試料は、購入または捕獲したクワガタムシを飼育し、出生したオオクワガタの雌 7 匹、コクワガタの雌 5 匹、およびヒラタクワガタの雌 5 匹とした。出生したクワガタムシについて、滅菌生理食塩水を用いて各クワガタムシの菌嚢を摘出した。その後、摘出で生じた懸濁液を potato nutrient broth (PN) 寒天培地に塗布し、23°Cで1日間培養した。培養後、生育したコロニーについて PN 液体培地でさらに好気条件下で5日間培養し、細菌を単離した。単離した細菌について、ゲノム DNA 抽出後、16S rDNA と 18S rDNA をターゲットとした PCR 法によって細菌種を同定した。また、*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* および *Cryptococcus neoformans* を対象とし、各クワガタムシから単離・同定した細菌の増殖阻害活性を調査した。

3種類のクワガタムシから単離した40株について同定試験を実施した結果、12種の細菌属が同定された。そのうち、*Klebsiella* spp.が優占種であり(30%, 12/40株)、*Serratia marcescens*が2番目に多く同定された(15%, 6/40株)。次に、菌嚢から単離・同定された40株の細菌について、*E. coli*, *S. aureus* および *C. neoformans* に対する増殖阻害活性を調査した結果、それぞれ29株、33株、および18株の細菌が増殖阻害活性を示した。そこで、3種類のクワガタムシにおいて増殖阻害活性を示す細菌の存在率を比較した。その結果、*E. coli* または *S. aureus* に対して増殖阻害活性を示す細菌の存在率は、それぞれ69-100%および62-81%であり、3種類のクワガタムシにおいてほぼ同程度であった。これに対して、*C. neoformans* に対して増殖阻害活性を示す細菌の存在率は、ヒラタクワガタが82% (9/11種類)と最も多く、オオクワガタは19% (3/16種類)と最も少なかった。これは、各クワガタムシの成長環境が影響したためと推察される。以上のことより、クワガタムシの菌嚢に存在する細菌は、新規の抗生物質産生において有用な資源となることが示唆された。

## 第 279 回雑誌会

(Nov. 10, 2017)

### (1) Combined and synergistic effects of climate change and urbanization on water quality in the Wolf Bay watershed, southern Alabama

Wang, R., Kalin, L.

Journal of Environmental Sciences, in press (2017).

Reviewed by Y. Kanayama

土地利用/土地被覆 (LULC) の変化や気候変動は、河川水質の悪化を引き起こす可能性がある。これまでに、LULC および気候変動の各々の影響を調査した例はあるが、LULC と気候変動の複合的な影響を調査した研究は少ない。そこで本研究では、アメリカアラバマ州南部の Wolf 湾流域を対象に SWAT モデルを用いて、LULC の変化と将来の気候変動に対する流量、全浮遊物質量 (TSS)、全窒素量 (TN)、および全リン量 (TP) の変化を予測した。モデルの将来予測機関である 2016 年から 2040 年の月平均降雨量と月平均気温は、4 つの全球気候モデル (GCM) および 3 つの IPCC 排出シナリオ (SRES) を用いて推定した。LULC データは、BCPZC (Baldwin County Planning and Zoning Commission) のデータを用いた。将来の LULC 予測は、LULC change model を用いて推定した。モデルの校正期間は、1984 年から 2008 年とした。

将来の気候・土地利用変化予測の結果、流域内において 2016 年から 2040 の間に年平均気温が 0.4 °C から 1.4 °C 上昇すること、2030 年において都市域が増加し森林域が減少することが推測された。気候変動のみの影響を解析した結果、流量、TSS、TN および TP は全ての月での増加が予測された。N/P 比 (窒素とリンの重量比) は、47.6 から 50.1 に変化すると予想された。LULC の変化のみの影響を解析した結果、流量に有意な変化は見られなかったが、表面流出量は増加し、基底流出量は減少すると予測された。TSS は表面流出量と同様の変動パターンを示し、増加すると予測された。TN は、全ての月で減少すると予測された。また、TP は夏期に減少することが予測された。N/P 比は、47.6 から 36.7 に変化すると予想された。このことから、LULC の変化は、気候変動と比較して、N/P 比に大きく影響を与えることが示唆された。LULC の変化と気候変動の複合的な影響を解析した結果、流量と TSS は全ての月で有意に増加した。TN と TP は、LULC 変化および気候変動の個々の影響と比較して、顕著な変化が見られた。さらに、LULC 変化および気候変動による相乗的な影響を解析したところ、TSS に対する相乗的な効果が確認された。TN に対して相殺的な効果が見られ、これは LULC 変化と気候変動がそれぞれ逆の影響を有することを意味する。以上の解析結果から、河川の水質悪化を防ぐためには、科学的根拠に基づいた適切な土地利用計画を策定し、LULC 変化による影響を最小限に抑えることが不可欠である。

## **(2) Chronic offshore loss of nourishment on Nice beach, French Riviera: A case of over nourishment of a steep beach?**

Anthony, J. E., Cohen, O. and Sabatier, F.

Coastal Engineering, **58**, 374-383 (2011).

Reviewed by A. Miyazono

砂利の海岸は、波を打ち消す効果や沿岸域を暴風雨の影響から緩和する能力をもち、背後地を守る面においても重要である。しかし、多くの沿岸域に属する国において、海岸侵食が問題となっている。そのため、侵食対策として養浜が行われている。そこで本研究では、侵食傾向である砂利の海岸に対して、養浜を断続して行うことによる養浜効果を調査した。調査は、フランスのリビエラ地方で侵食が進行している砂利のビーチ 4.5 km を対象として、6 地点 (P1, P2, P3, P4, P5, P6) においてビーチプロファイルを作成した。また、ビーチの西から東にかけて 40~250 m (平均間隔=50 m) 離れた 50 のトランセクト (最西箇所 : 1, 最東箇所 : 50) を対象に、30 年間にわたり養浜量と浜幅を年 2~3 回測定した。各トランセクトは、平均浜幅の変化と養浜量を比較し、トランセクトごとの浜幅の変化を特徴付けるために、主成分分析とクラスター解析を行った。さらに、等深線が 10 m に達するまでの距離と浜幅との相関関係について、回帰分析を行った。

養浜量の測定の結果、このビーチでは 30 年間で計 558,000 m<sup>3</sup> の養浜が行われており、2000 年において最も多くの養浜 (97,000 m<sup>3</sup>) が行われた。各トランセクトによる養浜量は、東側 (35~50) において養浜土砂が集中しており、中央 (18~25) において養浜土砂は確認されなかった。また、6 地点におけるビーチプロファイルを比較した結果、P5 と P6 は、他の地点よりも海水浴場の浜の高さが高いことがわかった。これは、P5 と P6 を含む東側 (40~50) の海岸で養浜土砂が多く投入されたためであると考えられる。各トランセクトの浜幅の変化を比較した結果、浜幅の増加を示すセクターは 2~3, 13~22, および 41~50 であった。減少する浜幅を示すセクターは 4~12 と 23~40 であった。また、各トランセクトにおける養浜量と浜幅の変化を浜幅の変化を特徴付けるために、主成分分析を行った結果、浜幅の増減を明確に分類できた。クラスター解析の結果、浜幅の増減に関する 4 つのクラスター (1 : 浜幅が増加, 2, 3 : 浜幅が減少か比較的安定, 4 : 隣接するトランセクトと対照的な挙動) に分類されたが、養浜との関連は認められなかった。さらに、養浜量と浜幅の測定の結果、養浜量と浜幅の増減について相関は認められなかった。また、10 m 等深線までの距離と浜幅の回帰分析の結果においても浜幅の増減による相関は認められなかった。以上の結果から、大規模な養浜が行われているが、大規模な養浜による浜幅の変動は見られなかった。

## 第 280 回雑誌会

(Nov. 17, 2017)

### (1) Evaluation of bacterial pathogen diversity, abundance and health risks in urban recreational water by amplicon next-generation sequencing and quantitative PCR

Cui, Q., Fang, T., Huang, Y., Dong, P. and Wang, H.

Journal of Environmental Sciences, **57**, 137-149 (2017).

Reviewed by A. Jikumaru

都市部におけるレクリエーション水域（湖沼や河川）の公衆衛生を管理するために、病原細菌の効率的かつ包括的なモニタリングは重要である。さらに、細菌のリスク評価をするには、病原細菌の定量化が必要である。本研究では、レクリエーション水域を対象とし、次世代シーケンシング（NGS 法）によって病原細菌の多様性を調査し、さらに、qPCR 法によって病原細菌を定量後、定量的微生物リスク評価（QMRA）を行った。調査は、2013 年の 3 月～10 月にかけて毎月実施した。試料は、北京オリンピック森林公園内の主要な湖である Aohai Sea（5 地点）と、その北西に位置する湿地（2 地点）から合計 46 の水試料を採取した。全試料から DNA を抽出した後、15 試料を対象に、16S rRNA を標的とした NGS 法によって遺伝子解析を実施した。得られた細菌遺伝子は、本研究で作成したヒト病原細菌のデータベース（40 属、76 種）を基に分類した。また、全 46 試料を対象とし、病原細菌である *Aeromonas* spp. (*aerA*)、*Mycobacterium avium* (16S rRNA)、*Pseudomonas aeruginosa* (*oaa*)、および *Salmonella* spp. (*invA*) と、ふん便指標細菌である大腸菌 (*uidA*) の特異遺伝子を qPCR 法によって定量した。QMRA は、*Salmonella*、*M. avium*、および *P. aeruginosa* の用量・反応モデルを用いて、レクリエーション活動におけるそれぞれの細菌の年間感染確率を算出した。

属レベルでは、16 属が検出され、そのうち 7 属 (*Acinetobacter*, *Arcobacter*, *Clostridium*, *Legionella*, *Mycobacterium*, *Pseudomonas*, および *Rickettsia*) が全 15 試料から検出された。種レベルでは、13 種の病原細菌が検出され、*Acinetobacter johnsonii*, *Aeromonas hydrophila* / *veronii*, および *M. avium* が優占種であった。qPCR 法によって 5 種類の特異遺伝子 (*aerA*, *M. avium* の 16S rRNA, *oaa*, *invA*, および *uidA*) を検出した結果、*aerA* 遺伝子のコピー数が最も高かった ( $10^{+6}$  genome copy/100 mL)。また、全試料の 89.1% から 2~4 種類の病原遺伝子が検出された。さらに、QMRA によって年間感染確率を推定した結果、*P. aeruginosa* と *M. avium* は、U.S.EPA が推奨するレクリエーション水域における感染確率 (0.032) より高く、病原細菌の潜在的危険性が明らかとなった。以上のことから、NGS 法と qPCR 法を併用することによって、レクリエーション水域における病原細菌のリスク評価が可能であると示唆された。

## 第 281 回雑誌会

(Nov. 24, 2017)

### **(1) Hydrothermal and alkaline hydrothermal pretreatments plus anaerobic digestion of sewage sludge for dewatering and biogas production: Bench-scale research and pilot-scale verification**

Li, C., Wang, X., Zhang, G., Yu, G., Lin, J. and Wang, Y.

Water Research, **117**, 49-57 (2017).

Reviewed by K. Endo

汚泥処理における水熱処理は、高温の水が持つ高い加水分解能を利用して有機物を分解する手法であり、汚泥脱水性改善を目的として用いられている。また、アルカリ性の薬品を汚泥に添加して有機物を分解することで汚泥脱水性を改善する手法も存在し、近年では水熱処理との併用が研究されている。しかしながら、水熱処理とアルカリ処理を組み合わせた下水汚泥脱水において最適な水温、処理時間、および pH に関する報告はない。そこで本研究では、嫌気性消化汚泥について、水熱処理と  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  を用いたアルカリ処理（アルカリ水熱処理）を行い、処理後に遠心分離およびフィルタープレスによる脱水実験を行った。そして、汚泥脱水性改善の最適な条件を検討した。さらに、水熱処理を行うためのエネルギー獲得を目的として、アルカリ水熱処理を pH 調整なし、 $160^\circ\text{C}$ 、60 分と、pH 調整なし、 $180^\circ\text{C}$ 、30 分および pH 10、 $160^\circ\text{C}$ 、60 分の 3 パターンの処理を行った汚泥について、それぞれ脱水して得られた脱水ろ液を  $55^\circ\text{C}$  でインキュベートし、好熱性嫌気性消化によるメタンガスの回収実験も行った。

水熱処理において、 $140^\circ\text{C}$ ～ $220^\circ\text{C}$  の範囲では、高温になるほど脱水後汚泥の固相が多くなる傾向を示した。しかし、 $180^\circ\text{C}$  以上では温度の増加に対する脱水後汚泥の固相の増加が小さくなることから水熱処理における最適温度は  $180^\circ\text{C}$  であると考えられた。また、30 分～90 分の処理時間では、脱水後汚泥の固相量に大きな変化が見られなかった。汚泥の pH は、pH 9.0～11.0 の範囲に調整したところ、アルカリ性が強くなるほど脱水後汚泥の固相が多くなる傾向を示した。しかし、pH 10 以上では脱水後汚泥における固相の増加は認められなかった。脱水ろ液からのメタンガスの回収は、pH 10、 $160^\circ\text{C}$  で 60 分の条件においてメタンガスが最も多く回収できた。以上のことから、メタンガス回収効率を考慮してアルカリ水熱処理を行う場合には、pH 10、 $160^\circ\text{C}$  で 60 分が最適な条件であると判明した。この時の脱水汚泥の固相量は、分離係数 8000、15 分の遠心分離で約 40 重量%、1.60 MPa、3 時間のフィルタープレスで約 70 重量%であり、脱水ろ液からのメタンガス収率は約 290 ml/g-COD だった。以上の結果より、アルカリ水熱処理は汚泥脱水性を改善し、回収したメタンガスで水熱処理に必要なエネルギーの一部を賄える手法であることが示唆された。

## (2) Use of Droplet Digital PCR for Estimation of Fish Abundance and Biomass in Environmental DNA Surveys

Doi, H., Uchii, K., Takahara, T., Matsushashi, S., Yamanaka, H. and Minamoto, T.  
PLOS ONE, **10(3)**, (2015).

Reviewed by Y. Hamasuna.

環境 DNA (eDNA) 分析法の一つである droplet digital PCR (ddPCR) 法は、リアルタイム PCR (qPCR) 法に代わる遺伝子の定量技術として注目されている。これまでに、ddPCR 法によってウイルス、細菌、および動物細胞の定量が行われている。さらに近年、ddPCR 法によって魚の eDNA 濃度を定量化し、qPCR 法よりも推定値の変動が小さいことが報告された。本研究では、種の個体数およびバイオマスを推定するために、コイの個体数が異なるメソコスム (180×100×33 cm) において、qPCR 法および ddPCR 法の定量精度を比較した。実験は、260 匹のコイを用いて、個体数が異なる (0~85 匹) メソコスムを対象とした。実験の 1 日目、2 日目、3 日目に水深 5 cm の各メソコスムの中心からそれぞれ 15 mL の水試料を採取した。採水した試料から、DNA を抽出し、Cytb 遺伝子を qPCR 法によって定量した。プライマーおよびプローブは、コイの特異性が確認されているものを用いた。qPCR 法と同様のプライマーおよびプローブを用いて、ddPCR 法によって Cytb 遺伝子を定量した。実験終了時に各コイ個体の湿重量を測定後、各メソコスムにおけるバイオマスの合計値を算出し、両手法を比較した。

qPCR 法と ddPCR 法によるコイの eDNA 濃度を比較した結果、両手法の間には有意な正の相関 ( $R^2 = 0.961$ ) が認められた。また、コイの個体数、バイオマスが増加するとともに、DNA コピー数も 95%信頼区間内で増加を示したことから、両手法がコイの eDNA 濃度を定量化できることが確認された。しかし、既往研究と同様に、eDNA 濃度の推定値の変動は、qPCR 法よりも ddPCR 法の方が小さかった。このことから、誤差の低減には、ddPCR 法の方が eDNA の定量に適していると考えられる。また、qPCR 法と ddPCR 法を比較したことによって、eDNA 濃度はバイオマスよりも個体数との関係が強いことがわかった。本研究では、類似した体重のコイを使用したことから、体重の変化が少ない種については、ddPCR 法によって、個体数をさらに正確に推定できることが示唆された。さらに、メソコスム内のコイの個体数を段階的に変化させたことによって、ddPCR 法は qPCR 法よりも低濃度でコイの eDNA 濃度を定量化できることも確認された。以上のことから、ddPCR 法は qPCR 法よりも標的種の個体数およびバイオマスを正確かつ高感度に推定できることがわかった。

### **(3) Persistence of extracellular DNA in river sediment facilitates antibiotic resistance gene propagation**

Mao, D., Luo, Y., Mathieu, J., Wang, Q., Feng, L., Mu, Q., Feng, C. and Alvarez, P. J. Environmental Science & Technology, 48, 71-78 (2014).

Reviewed by E. Nishimura

土壌や水環境中の薬剤耐性遺伝子（ARG）は、抗菌薬が除去された、あるいは宿主細菌が死滅した後も残留する可能性がある。また、細胞外 DNA（eDNA）や細胞内 DNA（iDNA）として存在する ARG は、それぞれの水平伝播メカニズムによって環境中に拡散し得る。そのため、環境中における ARG の残留性および貯留源を特定することは重要である。そこで本研究では、河川水および河床堆積物を対象として、以下の 3 つの調査を実施した：試料中の eDNA と iDNA における ARG の定量；試料ごとの各 DNA の残留性評価；堆積物中の eDNA に存在する ARG の形質転換。試料は、2010 年 12 月に中国の Haihe 川から採取した。試料採取後、各試料から eDNA と iDNA を抽出し、分光光度計およびゲル電気泳動によって、DNA 濃度を測定した。また、PCR 法によって ARG を検出し、定量 PCR 法によって ARG 数を定量した。その後、試料から抽出した各 DNA について、マイクロコズムおよび統計分析によって、20 週にわたる DNA の残留性を評価した。さらに、カナマイシン（Kr）耐性遺伝子を用いたマイクロコズムによって、堆積物中の eDNA に存在する ARG の形質転換を調べた。

河川水における eDNA と iDNA の平均濃度は、それぞれ  $2.2 \pm 0.8 \mu\text{g/mL}$  と  $9.7 \pm 1.5 \mu\text{g/mL}$  であった。これに対して、堆積物の各 DNA 平均濃度は、それぞれ  $96.8 \pm 19.8 \mu\text{g/g}$  と  $76.7 \pm 13.0 \mu\text{g/g}$  であり、河川水と比較して、DNA 濃度が高かった。また、抽出した各 DNA から ARG を検出した結果、各試料から共通して 12 種類の ARG が検出された。特に、堆積物中の eDNA は、iDNA と比較して、ARG が高濃度であった（有意差： $p < 0.05$ ）。次に、各 DNA の残留性を評価したところ、6 週目において堆積物中の eDNA は  $0.06 \mu\text{g/g}$  の濃度で残留しており、20 週に至るまで残留し続けた。これに対して、堆積物中の iDNA は 9 週目以降において残留は確認されなかった。また、それら DNA ( $< 0.1 \mu\text{g/g}$ ) の一次減少係数は、eDNA が  $0.009 \pm 0.003 \text{ day}^{-1}$  であったのに対し、iDNA は  $0.106 \pm 0.012 \text{ day}^{-1}$  であった。さらに、堆積物中の eDNA に存在する ARG において、Kr 耐性遺伝子の形質転換が確認された。以上のことから、堆積物中の eDNA は、ARG の残留および拡散に寄与する重要な貯留源であることが示唆された。

**(4) Spatial distribution pattern of oviposition in the mosquito *Aedes aegypti* in relation to urbanization in Buenos Aires: southern fringe bionomics of an introduced vector**

Carbajo, A. E., Curto, S. I. and Schweigmann, N. J.

Medical and Veterinary Entomology, **20**, 209-218 (2006)

Reviewed by S. Nishimoto

ネッタイシマカは、黄熱やデング熱等のウイルス性疾患を媒介する節足動物である。しかしながら、米国における経済水準の違いや湿度の不均一性により、ネッタイシマカの分布の推定は困難とされている。そこで本研究では、ネッタイシマカの産卵の空間分布パターンをモデル化するため、ネッタイシマカの分布南限付近に位置するアルゼンチンのブエノスアイレスを対象に、人口統計的変数と環境変数を用いて産卵活動の空間分析を行った。調査は、1997年7月～2006年6月に行った。調査地点は、格子状に850mの間隔で279ヵ所設定し、蚊が水面付近に卵を産みつける習性を利用した捕虫器（オビトラップ）を設置して、週ごとに産卵活動を調査した。オビトラップから1つ以上のネッタイシマカの卵が確認された場合をネッタイシマカが検出されたこととした。応答変数をネッタイシマカの卵が検出された週の割合（PI）、卵が検出されない週を除いた割合（PIo）、卵の総数（TE）、および卵が検出されない週を除いた卵の総数（TEo）の4項目の産卵活動の変数とし、一般化線形モデル（GLM）を用いて解析した。説明変数は、人口密度、工業用地の従業員の人口比率、住居あたりの住民の比率、住宅密度、高層ビルの密度、植生被覆率、大通りまでの距離、工業用地までの距離、標高の9項目とした。

ネッタイシマカの卵は、279地点中194地点で観測された。PIとPIoのベストモデルには、住宅密度、高層ビルの密度、および工業用地までの距離が説明変数として選択された。TEのベストモデルには、住宅密度、高層ビルの密度、および工業用地までの距離が説明変数として選択された。すべてのモデルにおいて、ネッタイシマカの産卵活動は、住宅密度と正の相関関係、工業用地までの距離と負の相関関係を示した。また、高層ビルの密度とは負の相関関係、大通りまでの距離とは正の相関関係を示した。これらの理由として、(1)ブエノスアイレスは人口密度が高いため血の供給が制限されない、(2)繁殖条件に適した潜在的な飼育容器が住宅地や工業用地に多い、(3)人口密度が高い地域では、高層ビルの密度も高くなり、ネッタイシマカの飛行範囲が制限されることなどが考えられる。以上のことから、ネッタイシマカの産卵活動は、工業用地において活発化し、人口密度の高い条件において低下することが示唆された。

## 第 282 回雑誌会

(Nov. 28, 2017)

### (1) A highly specific *Escherichia coli* qPCR and its comparison with existing methods for environmental waters

Walker, D. I., McQuillan, J., Taiwo, M., Parks, R., Stenton, C. A., Morgan, H., Mowlem, M. C., and Less, D. N.

Water Research, **126**, 101-110 (2017).

Reviewed by T. Ueda

多くの腸内病原菌は、たとえ低濃度であってもヒトに対して重大な脅威をもたらす。そのため、水環境のふん便指標細菌である大腸菌は、低濃度に存在している場合においても正確かつ迅速に定量する必要がある。しかしながら、従来の大腸菌の定量手法は、100%の感度と特異度を有していない。そこで本研究では、大腸菌を定量するための新たな定量 PCR 法 (qPCR : *ybbW* 遺伝子) を開発し、従来の定量手法である培養法、qNASBA 法、および qPCR 法 (*uidA* 遺伝子) と比較することによって、本手法の感度、特異度、および定量精度を評価した。感度の評価は、大腸菌 87 株 (環境・動物由来) を各手法に供試し、その陽性率とした。また、特異度は、大腸菌以外の細菌 23 株 (大腸菌近縁種を含む) を各手法に供試し、その陰性率とした。次に、qPCR 法と qNASBA 法の定量精度を評価するために、イギリス南西部の 4 地点から 5 種類の水試料 (河口の水、海水、下水二次処理水、下水三次処理水 ; 紫外線処理前/後) を採取した。qPCR 法 (*ybbW* と *uidA*) と qNASBA 法で各水試料中の標的遺伝子コピー数を定量した後、両 qPCR 法については、遺伝子コピー数から大腸菌数を算出した。その後、それらの結果を培養法による測定値と比較した。

大腸菌 87 株を用いて各手法の感度試験を実施した結果、qPCR 法 (*ybbW*) と qNASBA 法の検出感度は、ともに 100% (87/87 株) であった。一方で、qPCR 法 (*uidA*) と培養法の検出感度は、それぞれ 98.9% (86/87 株) と 94.3% (82/87 株) であった。また、大腸菌以外の細菌 23 株を用いて特異度試験を実施した結果、qPCR 法 (*ybbW*) のみが特異度 100% (0/23 株) であり、すべての従来法は大腸菌以外の一部の菌種を陽性として判定した。次に、各手法の定量精度を評価した結果、qPCR 法 (*ybbw*) と qPCR 法 (*uidA*) において、遺伝子コピー数と培養法による大腸菌数との間に正の相関 (それぞれ  $R^2=0.673$  と  $0.639$ ) があった。一方で、qNASBA 法では培養法との相関関係は確認されなかった。さらに、遺伝子コピー数から算出した大腸菌数と培養法による測定値を比較した結果、qPCR 法 (*ybbw*) と qPCR 法 (*uidA*) とともに、正の相関 (それぞれ  $R^2=0.748$  と  $0.717$ ) を示した。以上のことから、本研究で開発された *ybbW* 遺伝子を標的とした qPCR 法は、従来法と比較して環境水中の大腸菌をさらに正確に定量できることが示唆された。

## 第 283 回雑誌会

(Dec. 1, 2017)

### **(1) Persistence and growth of faecal culturable bacterial indicators in water column and sediments of Vidy Bay, Lake Geneva, Switzerland**

John, P., Laurence, H., Regis, K., Vincent, S., Philippe, A. and Walter, W.

Journal of Environmental Sciences, **21**, 62-69 (2009).

Reviewed by R. Hashimoto

下水処理場 (STP) や雨水排水システムは、河川、貯水池、湖の底質における様々な汚染の主な原因と言われている。しかしながら、底質における微生物汚染に関する情報は未だに不足しており、培養可能な細菌指標 (CBI) の生残性と水域への放出に関する情報はほとんどない。そこで本研究では、Geneva 湖 (スイス、ローザンヌ市) の Vidy 湾において、以下の 3 つの調査を実施した：底質における CBI の流入と発生；底質と湖水における CBI の生残性；自然汚染された底質から湖水への CBI の再移動と湖水における増殖能力。底質試料 (0~6 cm) は、Vidy 湾、Creux, および Versoix から採取し、水試料は、Vidy 湾にある STP 排水と Versoix の湖水から採取した。試料採取後、MF 法を用いて、CBI である大腸菌群、大腸菌、腸球菌、および好中温性細菌 (AMB) を計数した。また、4 つのマイクロコズムを用いて、CBI の生残性を調査した：M1, Vidy 湾底質と STP 排水；M2, Vidy 湾底質と湖水；M3, Versoix 底質と STP 排水；M4, Creux 底質と STP 排水。各マイクロコズムは 10°C, 20°C, および 25°C の暗室で培養し、1, 5, 10, 20, 30, 40, および 60 日目に水試料と底質試料における CBI を計数した。

底質試料と水試料中の CBI を計数した結果、Vidy 湾底質と STP 排水で CBI 数が最も高くなった ( $10^3$ - $10^7$  CFU/100 g or 100 mL)。しかし、Creux と Versoix の底質試料と Versoix の湖水における CBI 数は、非常に低い、または未検出であった。4 つのマイクロコズムによって CBI の生残性を調査した結果、10°C で培養した場合、M1, M3, および M4 では、CBI 数は実験期間内において一定であり、大きな変化はなかった。これに対して、M2 では、実験初日に水試料中において底質からの CBI の再移動が観察された。また、5 日後から CBI 数が減少した。20°C と 25°C 培養した場合、M1, M2, および M4 では、底質中における CBI の生残率が水中と比較して高かった。一方で、M3 では CBI 数は水と底質中において大きな差は観察されなかった。また、M2 では、20 日後に底質中の腸球菌と AMB が減少した。しかしながら、底質と水試料において、すべての CBI が 60 日間にわたって生残した。以上のことから、Vidy 湾において CBI は底質から水中に再移動するだけでなく、永続的な細菌汚染が危惧され、レクリエーション活動中の人間の健康リスクが高くなることが示唆された。

## (2) Isolation of bacteria with antibiotic resistance from household cockroaches

### (*Periplaneta americana* and *Blattella germanica*)

Pai, H., Chen, W., and Peng, C.

Acta Tropica, **93**, 259-265 (2005).

Reviewed by H. Hiroki

ゴキブリは、ヒトと密接に関わりがある昆虫種の一つであり、その体内や体表面には細菌が生息していることが知られている。また、医療機関において捕獲されたゴキブリの中には、院内感染症を引き起こす病原性細菌や薬剤に高い耐性を示す細菌が存在する。このことから、一般家庭に生息するゴキブリにおいても同様の細菌を保有している可能性は否定できない。そこで本研究では、家庭から捕獲したゴキブリを対象として、ゴキブリが保有している細菌種を特定し、その病原性細菌について薬剤耐性の有無を調査した。試料は、2000年3月において、台湾の高雄市にある一般家庭40世帯からゴキブリを採取した。捕獲後に凍結固定化し、ゴキブリ種を同定した。その後、ゴキブリの体表面と消化管から tryptic soy agar blood 寒天培地, eosin methylene blue 寒天培地, および xylose lysine desoxycholate 寒天培地を用いて細菌を単離した。単離した細菌について、生化学性状試験によって、菌種同定を実施した。同定された7種類の病原性細菌について Kirby-Bauer ディスク拡散法によって、17種類の薬剤に対する薬剤感受性試験を実施した。

調査を実施した40世帯のうち、20世帯から2種類のゴキブリ (*Periplaneta americana* : 123匹, *Blattella germanica* : 103匹) が計226匹捕獲された。そのうち、222匹のゴキブリの体表面と消化管から少なくとも1種類の細菌が単離された。また、単離した細菌について菌種同定を行ったところ、6種類のグラム陽性菌と14種類のグラム陰性菌が検出された。検出されたグラム陽性菌は、体表面と消化管において細菌の検出率に有意差はなかったものの、ゴキブリの種類別では、*P.americana* が高い検出率を示した。一方で、グラム陰性菌は、体表面より消化管の方が細菌の検出率は高く、ゴキブリの種類別による細菌の検出率に有意差はなかった。*Pseudomonas aeruginosa* や *Acinetobacter* spp.を含むブドウ糖非発酵グラム陰性桿菌は、体表面と消化管からの細菌の検出率に有意差はなく、また、ゴキブリの種類別の細菌の検出率にも有意差がない結果となった。次に、検出された *Enterococcus* spp., *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* について薬剤感受性試験を行った結果、それぞれ3~8種類の薬剤に対して耐性を示した。以上のことから、ゴキブリは様々な細菌や薬剤耐性を示す病原性微生物を保持しており、これらを拡散させる可能性がある。

**(3) Enterococcus species diversity and molecular characterization of biomarker genes in *Enterococcus faecalis* in Port Blair Bay, Andaman and Nicobar Islands, India**

Meena, A., Andurajan, L., Sathish, T., Raghavan, R. V., Jah, D. K., Venkateshwaran, P., Das, A. K., Dheenana, P. S., Vinithkumar, N. V., Dharani, G. and Kirubakaran, R.  
Marine Pollution Bulletin, **94**, 217-227 (2015).

Reviewed by T. Matsuwaki

沿岸水域では、農業や工業活動に伴い、排水流入が原因となるふん便汚染が問題となっている。水域のふん便汚染を評価する際、哺乳類の腸管内に常在する腸球菌を用いたモニタリング調査が行われている。しかしながら、環境における腸球菌の動態や疫学的な知見は限られている。そこで本研究では、インドの Andaman 島に位置する Port Blair 湾を対象として、腸球菌の実態調査を行った。調査は、2013 年の 2, 5, 8, 11 月にかけて、以下の地点で行った：Flat Bay (FB) ; Minnie Bay (MB) ; Junglighat Bay (JB) ; Haddo Harbor (HH) ; Phoenix Bay (PB) ; Aberdeen Bay (AB) ; Open Sea (OS)。各調査地点から水試料を採取後、メンブランフィルター法によって腸球菌陽性株を計数するとともに菌株を単離した。単離菌株について、生化学性状試験によって菌種を同定した。そして、Multi Dimensional Scaling (MDS) によって系統樹を作成し、各調査地点における腸球菌数と構成菌種の類似度を評価した。次に、*E. faecalis* と同定された菌株について、PCR 法によって 8 つの病原性遺伝子 (*gelE*, *asa1*, *esp*, *hyl*, *cylA*, *ef0591*, *pbp4*, および *aadE*) を検出した。

全調査において、満潮時と比較して、干潮時に腸球菌が高濃度に検出される傾向を示した。Port Blair 湾の内湾に位置する FB, MB, JB において、腸球菌が高濃度に検出され ( $1.6\sim 17.8\times 10^3$  CFU/100 mL)、外湾に位置する AB, OS では、低濃度に検出された ( $0.3\sim 6.8\times 10^2$  CFU/100 mL)。しかしながら、外湾に位置する PB では、5 月と 11 月において腸球菌が高濃度に検出された ( $1.2\sim 1.8\times 10^4$  CFU/100 mL)。次に、単離菌株を同定した結果、1816 株中 1261 株が腸球菌として同定され、*E. avium*, *E. hirae*, および *E. faecalis* が優占種であった (*E. avium* : 362 株, 29% ; *E. hirae* : 338 株, 27% ; *E. faecalis*, 112 株, 9%)。そこで、MDS によって各調査地点の類似度を評価した結果、都市域に隣接する FB, MB, JB, PB, および AB は、同一のクラスターを形成し、HH と OS はそれぞれ単独のクラスターを形成した。また、*E. faecalis* と同定された菌株 112 株について、病原性遺伝子を検出すると、*gelE*, *asa1*, *pbp4*, および *aadE* が高い割合で検出された (46~63%)。以上の結果から、Andaman 島に位置する Port Blair 湾では、排水の流入に伴うふん便汚染を強く受け、病原性遺伝子を保有する腸球菌が拡散していることが明らかになった。

#### (4) Prevalence and antibiotic resistance of *Enterococcus* strains isolated from poultry

Dagmara, S., Agnieszka, M., Tomasz, B., Łukasz, A., Ewelina, P., Jarosław, W., and Stanisław, W.

Acta Veterinaria Hungarica, **64** (2), 148-163 (2016).

Reviewed by Y. Mizota

畜産分野において、家禽が感染症を発症した場合、飼料中に抗生物質を投与することで治療が行われる。しかしながら、家禽飼料への継続的な抗生物質の投与は、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、家禽の体内に常在する腸球菌を対象として、その存在実態と抗生物質に対する感受性を調査した。調査は、2013年10月から2014年9月にかけて、ポーランドにおける死亡したブロイラー群420頭、七面鳥80頭、採卵鶏・種鶏73頭、ガチョウ7頭を含む580頭の家禽群を対象として実施した。サンプル週齢は生後1日から60週間であり、サンプルの心臓、肝臓、脳、骨髄、卵管スワブを採取し、腸球菌を単離した。菌株を単離した後、エタノールとギ酸を用いたタンパク質の予備抽出を行い、MALDI-TOF MSを用いて菌種を同定した。更に、世界的にブロイラーの感染症の原因菌として関心が高まっている *Enterococcus cecorum* について、系統樹解析を行った。その後、ディスク拡散法を用いて、畜産分野において頻繁に使用される9種類の抗生物質に対する薬剤感受性を評価した。

単離された911株の腸球菌について、MALDI TOF-MSによって菌種同定試験を実施した結果、*E. faecalis* (74.7%) が優占種として同定された。続いて、*E. faecium* (10.1%)、*E. galinarum* (5.5%)、*E. hirae* (4.6%) および *E. cecorum* (4.1%) が同定された。なかでも、*E. faecalis* は若い家禽から多く検出され、*E. cecorum* は一部の週齢のブロイラーから高い割合で検出された。同定された *E. cecorum* 37株について、系統樹解析を実施した結果、ブロイラーと種鶏由来の4株から形成されるクラスター I とその他の株から形成されるクラスター II に分類された。クラスター II について、異なる種類の家禽から検出された *E. cecorum* が同一のクラスターに分類されたことから、類似のマススペクトルを保有していると推察された。次に、薬剤感受性試験を実施した結果、全ての腸球菌が2種類以上の抗生物質に耐性を示した。しかしながら、バンコマイシン耐性腸球菌 (VRE) は、ブロイラー由来の *E. cecorum* 1株と、*E. faecalis* 1株と *E. faecium* 2株が中度耐性を示したのみであった。以上のことから、*E. faecalis* と *E. cecorum* の保持率は家禽の週齢が関連していることが推察された。また、抗生物質の使用は家禽における多剤耐性菌の発生に寄与するが、VRE の発生は低い割合 (0.11%) であることが示唆された。

## 第 284 回雑誌会

(Dec. 8, 2017)

### (1) Soil clay mineralogy as a key to understanding planation and formation of fluvial terraces in the South African Lowveld

Rozanov, A., Lessovaia, S., Louw, G., Polekhovsky, Y., and Clercq, W. D.

Catena, **156**, 375-382 (2017).

Reviewed by T. Itakiyo

河川作用によって形成された平原地帯の粘土鉱物は、地質環境や物質の風化・輸送の複雑さを反映している。また、風化過程で生成された粘土鉱物は、母岩との関連が高く、物質源の指標となる。南アフリカの地形区である Lowveld は、国立公園、果物の主要生産地、小規模農家の大規模なコミュニティなどが存在している。近年、この地域では Limpopo 川の洪水によって、浸食や土砂崩れが発生している。しかしながら、南アフリカの河川流域の土壤粘土鉱物に関する研究は未だに不足している。そこで本研究では、Limpopo 川の支流である Letaba 川 (Groot Letabe 川と Klein Letaba 川はその支流) 流域を対象に、土壤特性と土壤粘土鉱物を調査した。調査は、河岸段丘のうち 2~4 層の地層断面を有する段丘 9 地点 (Pit 3, 5, 6, 11, 24, 29, 30, 31, 36) を選定し、各地点の地層断面から合計 27 試料を採取した。採取した試料は、2 mm ふるいで区分し粒度分布を分析した。また、岩片は光学顕微鏡を用いて薄片を観察した。さらに 1  $\mu\text{m}$  未満の微細粒子は X 線回折 (XRD) 分析によって鉱物組成を分析した。

全ての段丘における粒度分布は類似しており、主に砂質壤土によって構成されていた。光学顕微鏡観察の結果、Klein Letaba 川側の段丘に位置する Pit 3, Pit 5 および Pit 6 では、緑泥石 (10%~15%)、石英 (25%~35%)、絹雲母 (45%~55%) が多く存在した。また、XRD 分析によって鉱物組成を比較すると、Groot Letabe 川側の段丘に位置する Pit 30 と Pit 31 ではカオリナイトが、Pit 3, Pit 5 および Pit 6 ではスメクタイトがそれぞれ支配的であった。このことから、Groot Letabe 川側の河岸段丘における粘土鉱物は、カオリナイトを多く含有する花崗岩および花崗岩質片麻岩が主な供給源であった。一方、Klein Letaba 川側の河岸段丘における粘土鉱物は、緑泥石、石英、絹雲母、スメクタイトに関連する緑色岩が主な供給源であった。さらに、滑石は、Groot Letabe 川の左岸側に位置する段丘に存在したが、右岸側の段丘では存在しないことから、左岸と右岸のそれぞれを流れる小河川や支流が、段丘の形成に重要な物質を供給することが考えられた。以上のことから、河川環境における粘土鉱物の分析は、河岸段丘の形成に関わる物質源および輸送の指標となることが示唆された。

## (2) Potential for gulls to transport bacteria from human waste site to beaches

Alm, E. W., Daniels-Witt, Q. R., Learman, D. R., Ryu, H., Jordan, D. W., Gehring, T. M., and Domingo, J. S.

Science of the Total Environment, **615**, 123-130 (2018).

Reviewed by K. Sugita

カモメは、レクリエーションビーチにおける重要なふん便汚染源として知られている。また、ヒトの廃棄物（ごみ、排泄物）を摂食することから、ヒト由来の細菌を獲得し、それをビーチに運ぶ可能性がある。そこで本研究では、カモメがヒト由来の細菌をレクリエーションビーチへ運ぶ可能性を調査した。調査は、2013年5月から8月において、アメリカのミシガン湖に位置する North Beach (NB) と Grand Haven City Beach (GHCB) で実施した。各調査地点から以下の試料を採取した：湖水、カモメの総排出腔とふん便、下水の一次処理排水貯留槽 (MWM) の水試料、埋立地 (ML) の土壌試料、農業埋立地 (CL) の水試料。各試料から DNA を抽出した後、9つのプライマーを用いた定量 PCR 法によって、ふん便指標細菌、ヒト、およびカモメに特異的な遺伝子を検出した（ふん便指標細菌：EC23S857, Enterol1, Faecalis1, Faecium1；ヒト：GenBac3, HF183；カモメ：Gull4, Gull2, Camp2）。また、2つのビーチで捕獲したカモメ 27羽に対して、ラジオテレメトリを装着し、カモメの動態を追跡した。その後、カモメを再び捕獲し、上記と同様の実験方法によって、カモメのふん便と総排出腔から各遺伝子を検出した。

MWM, ML, および CL から採取した試料には、様々な遺伝子が混在していた。そのうち、カモメに特異的なプライマーである Gull4 と Gull2 の陽性割合は 20-75% であり、カモメが廃棄物施設に飛来していることが推察された。そこで、カモメのふん便と総排出腔から各遺伝子を検出したところ、ヒトに特異的なプライマーである HF183 の陽性率は、それぞれ 27% と 19% であった。また、レクリエーションビーチと廃棄物施設間で移動が確認されたカモメ 5羽のうち、2羽の総排出腔においても HF183 が陽性であった。このことから、カモメは廃棄物施設からヒト由来の細菌を獲得していることがわかった。次に、湖水から各遺伝子を検出したところ、HF183 の陽性割合は、50-60% であり、廃棄物施設における検出割合と同等であった。また、湖水における Gull4 と Gull2 の陽性率は、それぞれ 100% と 85% であり、Gull4 が陰性であったサンプルは HF183 も陰性であった。以上のことから、カモメは、廃棄物施設からヒト由来の細菌を獲得し、レクリエーションビーチへ運ぶ媒介動物であることが示唆された。

## 第 285 回雑誌会

(Dec. 15, 2017)

### (1) Virulence Genes among *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* Isolated from Coastal Beaches and Human and Nonhuman Sources in Southern California and Puerto Rico

Ferguson, D. M., Talavera, G. N., Hernández, L. A. R., Weisberg, S. B., Ambrose, R. F. and Jay, J. A.

Journal of Pathogens, doi:10.1155/2016/3437214, (2016).

Reviewed by T. Matsuwaki

腸球菌 (*Enterococcus*) は、ヒトを含む温血動物の腸管内に常在する細菌である。中でも、*Enterococcus faecalis* と *E. faecium* は、院内感染の原因菌として挙げられる。そのため、病原性遺伝子を保有する *E. faecalis* と *E. faecium* がレクリエーション水域に拡散し、利用客に対して感染症を引き起こす可能性は否定できない。そこで本研究では Southern California (SC) と Puerto Rico (PR) を対象に *E. faecalis* と *E. faecium* が保有する病原性遺伝子の実態調査を行った。各調査地点について、以下の試料を採取した：環境試料（水、浜砂、海草・海藻、都市河川水、下水流入水、下水処理水、下水処理槽の汚泥）、ヒトふん便（臨床、非臨床）、動物ふん便（イヌ、トリ）。各試料について、メンブレンフィルター法によって腸球菌陽性株を単離した。単離した菌株について生化学性状試験と 16S rRNA に基づく遺伝子解析を実施し、*E. faecalis* と *E. faecium* を同定した。そして *E. faecalis* と *E. faecium* に同定された菌株について、Multiplex PCR 法によって病原性に関連する 5 つの遺伝子を検出した (*gelE*, *asa1*, *esp*, *cylA*, および *hyl*)。

腸球菌陽性株について菌種同定試験を実施した結果、*E. faecalis* が 265 株 (SC : 91 株 ; PR : 174 株) 同定され、*E. faecium* が 152 株 (SC : 79 株 ; PR : 73 株) 同定された。そこで、病原性遺伝子の検出を実施した結果、*E. faecalis* は 3~5 種類の病原性遺伝子が検出され、調査地点と試料にかかわらず *gelE* と *asa1* が高い割合で検出された (*gelE* : 59.6~95.0% ; *asa1* : 15.4~78.4%)。その一方で、*hyl* は PR の環境試料のみ低い割合で検出された (5.3%)。このことから、*E. faecalis* は SC と PR において多様な病原性遺伝子を保有し、環境にかかわらず拡散していることがわかった。次に、*E. faecium* は SC と PR の環境試料からそれぞれ 2 種類の病原性遺伝子が検出されたが、いずれも低い割合で検出された (SC : *gelE* (13.3%), *asa1* (12.5%) ; PR : *gelE* (18.8%), *hyl* (1.3%))。その一方で、SC と PR のヒトふん便と動物ふん便から *esp* が高い割合で検出された (27.2~47.8%)。以上の結果から、*E. faecalis* は環境にかかわらず多様な病原性遺伝子を保有しており、*E. faecium* は環境によって異なる病原性遺伝子を保有していることが明らかになった。

## **(2) Understanding the roles of high salinity in inhibiting the molybdenite flotation**

Qiu, Z., Liu, G., Liu, Q. and Zhong, H.

Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, **509**, 123-129 (2016).

Reviewed by B. Maralmaa

Flotation recovery of molybdenite ( $\text{MoS}_2$ ) that is the most important molybdenum (Mo) source. Besides, flotation for sea water becomes a very important issue due to sea water, which is the one of the most essential high salinity water resources covers 97% of whole water resources on earth. In this study, flotation performances of molybdenite ( $\text{MoS}_2$ ) in the de-ionized water (DI water) and simulated sea water were investigated in order to understand the roles of high salinity in inhibiting molybdenite flotation. As flotation performances of molybdenite, chemical equilibrium calculation and zeta potential measurements were examined after micro flotation process at pH 2-12. Furthermore, scanning electron microscopy (SEM), auger electron spectrum (AES), X-ray photoelectron spectrum (XPS) and time of flight secondary ion mass spectrometry (ToF-SIMS) were used to investigate the interactions between precipitated components and molybdenite surfaces that conditioned in DI water and simulated sea water at pH 11.

Flotation recovery of molybdenite was sharply reduced to about 40% in simulated sea water at pH above 9.5. To find out the exact mechanisms of depression, several advanced apparatuses were applied for surface characterization. Based on the measurements by SEM, two kinds of precipitates (colloidal precipitates and crystallized precipitates) were observed on the molybdenite surface which was immersed in the simulated sea water during flotation. It was found that the colloidal precipitates overspread on the surface while the crystallized precipitates randomly scattered on the surface. With the detection by AES, it was found that magnesium and calcium were the main components in the colloidal precipitates and crystallized precipitates, respectively. According to the XPS tests, the colloidal precipitates were  $\text{Mg}(\text{OH})_2$  and the crystallized precipitates were  $\text{CaCO}_3$ . In addition, result of the XPS tests was confirmed by ToF-SIMS results. These precipitated  $\text{Mg}(\text{OH})_2$  and  $\text{CaCO}_3$  particles on the molybdenite surfaces play an important role in inhibiting the flotation of molybdenite in the simulated sea water. As these results, the depression of molybdenite flotation recovery can be occurred mainly due to the colloidal  $\text{Mg}(\text{OH})_2$  adsorbed onto the micro-edges on faces and edges of molybdenite particles which reduce the hydrophobicity of molybdenite.

### **(3) Benthic invertebrate communities in regulated Mediterranean streams and least-impacted tributaries**

David, A., Raqual, M. A. and David, G. A.

*Limnologia*, **43**, 34-42 (2013).

Reviewed by K. Shirasaka

水力発電等による流況の改変は、河川生態系のかく乱要因として世界的に問題となっている。そこで本研究では、流量制御河川と非流量制御河川を比較し、流量制御が底生動物に及ぼす影響を評価することを目的とした。さらに、夏季の干ばつなどの過酷な環境下では、むしろ流量制御河川において底生動物へのストレスが小さいという仮説を実証するために、底生動物の形態学的特徴を調査した。調査をスペイン中部の Guadiana 流域における Bullaque 川とその支川 (Tamujar, Piedrala, Alcobilla および Bullaquejo) において、2010 年の各季節 1 回 (合計 4 回) 実施した。調査地点を 1~2 km 間隔で、Bullaque 川において 15 地点、支川においてそれぞれ 6 地点 (合計 24 地点) 設定した。なお、Bullaque 川は Torre Abraham ダムによって流量制御されているが、支川は非流量制御河川である。調査項目は、底生動物、水深、流速、河床材料の組成、採取場所から最短距離の岸までの距離および植生被覆率とした。底生動物は可能な限り同定した後、総個体数、分類群数、 $\beta$ -多様性の指標である MVDISP 等を算出した。加えて、底生動物の左右の足について長さの差を測定し、左右対称性 (FA) を計測した。取得したデータは、ANOVA 等を用いて Bullaque 川と支川の間において比較を行った。

Bullaque 川と支流の流量を比較した結果、すべての季節において Bullaque 川の方が大きかった。また、流量と季節の間で交互作用 ( $P < 0.0001$ ) が検出され、夏季において有意に流量の差が大きくなり、冬季において有意に流量の差が小さくなった。これは夏季の干ばつによって支流の流量が小さいことに起因する。MVDISP は季節に関わらず Bullaque 川において高く (1.056-1.169)、支流において低い (0.677-0.893) ことがわかった。これは、支流と比較して Bullaque 川が支流と比較して多様な生息場を有していることを意味している。支流の FA は、破碎食者、濾過食者、掃き取り食者および捕食者に分類される底生動物が、Bullaque 川よりも有意に高い数値を示した ( $P < 0.005$ )。これにより、底生動物は非流量制御河川において環境ストレスを強く受けている可能性が示唆された。以上のことから、Guadiana 流域における季節変動は、特に夏において顕著に発生し、底生動物に対して不利な環境条件を作り出していることが示唆された。

## 第 286 回雑誌会

(Dec. 22, 2017)

### (1) Next-generation sequencing identification of pathogenic bacterial genes and their relationship with fecal indicator bacteria in different water sources in the Kathmandu Valley, Nepal

Shrestha, R. G., Tanaka, Y., Malla, B., Bhandari, D., Tandukar, S., Inoue, D., Sei, K., Sherchand, J. B. and Haramoto, E.

Science of the Total Environment, **601-602**, 278-284 (2017).

Reviewed by A. Jikumaru

従来は、水環境における微生物汚染を評価する方法として、ふん便指標細菌 (FIB) を用いた調査が行われてきた。しかしながら、FIB と他の病原細菌の間には有意な相関が認められないことが報告されてきており、病原細菌による汚染を判定するには、FIB 検出のみでは十分でないことが認識されつつある。そこで本研究では、ネパールの Kathmandu 渓谷において、次世代シーケンシング (NGS 法) と qPCR 法によって、潜在的病原細菌 (PPB) の汚染状況を把握し、FIB 数と PPB 濃度の関係性を明らかにした。調査は、2014 年 8 月に、Kathmandu 渓谷において、合計 37 の水試料を以下の 6 つの水源から採取した：浅い掘井戸、深い掘抜き井戸、浅い掘抜き井戸、石の噴出口、湧水、および河川。試料採取後、Colilert を用いて FIB である大腸菌群と大腸菌を計数した。また、全試料から DNA 抽出後、16 試料を対象に、16S rRNA を標的とした NGS 法によって遺伝子解析を実施し、PPB の存在比を求めた。全 37 試料を対象に、細菌の 16S rRNA と PPB である *Acinetobacter* の *bla<sub>OXA23-like</sub>* 遺伝子を qPCR 法によって定量した。また、細菌の 16S rRNA のコピー数と PPB の存在比から、PPB の濃度を求めた。そして、得られた結果を基に FIB 数と PPB 濃度、および *bla<sub>OXA23-like</sub>* 遺伝子のコピー数との関係性を明らかにした。

全調査地点において、大腸菌群と大腸菌は、95%と 89%の割合で検出され、河川が最も高濃度であった (大腸菌群：7.2~7.4 log MPN/100 mL, 大腸菌：6.6~6.9 log MPN/100 mL)。NGS 法を行った 16 試料において、属レベルでは、PPB である *Acinetobacter*, *Arcobacter*, および *Clostridium* が比較的高い存在比で検出された。qPCR 法によって *bla<sub>OXA23-like</sub>* 遺伝子を検出した結果、37 試料のうち 13 試料 (35%) から検出され、濃度は 5.3~7.5 log copies/100 mL の範囲であった。さらに、FIB 数と PPB の濃度、および *bla<sub>OXA23-like</sub>* 遺伝子のコピー数との関係性には、有意な相関が認められなかった ( $P > 0.05$ )。以上のことから、FIB の検出のみでは、病原細菌の汚染を判定することは困難であり、さらなる研究が必要であることが示唆された。

## (2) Cultivation of the red seaweed *Kappaphycus alvarezii* with effluents from shrimp cultivation and brown seaweed extract: Effects on growth and secondary metabolism

La Macchia Pedra, G. A., Ramlov, F., Maraschin, M. and hayashi L.  
Aquaculture 479, 297-303 (2017).

Reviewed by K. Nakada

紅藻 *Kappaphycus alvarezii* は、世界で最も生産されている海藻の 1 種であり、カラギーナンや藻類コロイドを獲得できることから商業的価値が高い。また、ブラジルの海産養殖において、*K. alvarezii* は最も重要な水産生物である。そのため、低コストかつ生産性を高める養殖方法が求められている。そこで本研究では、バンナイ養殖排水 (BET) と富栄養海水における生長比較、生長における褐藻エキス (AMPEP) の影響評価、および栄養塩条件の違いによる *K. alvarezii* の第二代謝物生産について比較検討した。供試生物は、50% von Stosch (VS) 溶液で 35 日間培養した *K. alvarezii* の藻体 16 g を用いた。生長に及ぼす栄養塩の影響は、VS, BFT, AMPEP, VS+AMPEP, BFT+AMPEP の 5 条件における日間生長率から評価した。さらに、第二代謝物生産において生物活性物質を分析するため、総フェノール量、フラボノイド量、DPPH ラジカル活性消去試験、およびカロテノイド量について検討した。

コントロール区と比較して AMPEP を除く 5 条件において *K. alvarezii* の日間生長率は有意に高い値を示した ( $p < 0.05$ )。特に、VS 溶液で培養した場合の日間生長率は  $1.7 \pm 0.14$  %/day と最も高く、BFT 排水においても  $1.56 \pm 0.08$  %/day の高い日間生長率を示した。これは、VS 溶液および BFT 排水中における窒素 (N) とリン (P) の比が N/P=16/1 であったためと考えられる。次に、異なるサンプルの 5 条件における第二代謝物生産を検討した結果、BFT 排水で培養した場合の総フェノール量とフラボノイド量は、それぞれ  $92 \pm 22.4$   $\mu\text{g/g}$ ,  $18.8 \pm 0.6$   $\mu\text{g/g}$  となり、最も高い値を示した。また、DPPH ラジカル活性消去試験において、VS 溶液と VS+AMPEP 溶液における DPPH ラジカル阻害率は、それぞれ  $13.4 \pm 1.5$ %,  $13.4 \pm 0.6$ % となり、コントロール区や他の条件と比較して有意に高く、抗酸化活性が確認された。そして、カロテノイド量は、BFT+AMPEP の条件で  $293.3 \pm 9.3$   $\mu\text{g/g}$  となり、最も高い値を示した。一方で、AMPEP 溶液と VS+AMPEP 溶液におけるカロテノイド量は、それぞれ  $39.7 \pm 8.7$   $\mu\text{g/g}$ ,  $51.8 \pm 4.7$   $\mu\text{g/g}$  とコントロール区や他の条件と比較して有意に低い値を示した。これは、BFT+AMPEP 溶液中にカロテノイドが多く存在していることが要因であると考えられる。以上の結果から、BFT 排水を肥料として用いることが *K. alvarezii* の生長と第二代謝物生産に適していることが示唆された。

### **(3) Model analysis of check dam impacts on long-term sediment and water budgets in Southeast Arizona, USA**

Norman, M.,L., Niraula, R.

Echohydrology & Hydrobiology, **16**, 125-137(2016)

Reviewed by Y. Kanayama

土砂災害対策の一つである砂防ダムは河川の土砂を貯めることによって、浮遊物質の流下を防ぐ役割を担う。しかし、砂防ダムの設置が河川流量や土壌侵食量に与える影響を評価した研究は少ない。そこで本研究は、砂防ダムが約 2000 基設置されているアメリカアリゾナ州に位置する Turkey Pen 流域 (7.69 km<sup>2</sup>) を対象に SWAT モデルを適用し、砂防ダムが流域内の流量や土壌侵食に及ぼす影響を評価した。また、砂防ダムによる影響評価を行うための対照流域として、流域に近接する Rock Creek 流域 (24.05 km<sup>2</sup>) にも SWAT モデルを適用し、解析結果を比較した。降水量と気温のデータは、Turkey Pen 流域の周辺に位置する 2 つの気象観測所から取得した。デジタル標高モデル (DEM) を用いて、流域内の地形的特徴を定義した。土壌データは、NRCS (Natural Resource Conservation Service) のデータを用いた。土砂流出量は、SDR (Sediment Delivery Ratio) を用いて推定した。モデルによる流量予測精度の評価は、誤差率の指標である BIAS (Percent BIAS) を用いた。モデルの校正は、2013 年 6 月から 2013 年 10 月とした。モデルの検証期間は、2011 年 9 月から 2014 年 9 月とした。

SWAT モデルによる解析の結果、2 つの流域内の土壌侵食は、日降水量が 15 mm 以上となった場合に発生すると推測された。Rock Creek 流域と Turkey Pen 流域の PBIAS は、それぞれ  $\pm 2.34\%$  と  $\pm 119.76$  となった。この Turkey Pen 流域における計算値の不一致は、モデルにおいて流域内の砂防ダムによる河川流量への影響を考慮しなかったためと考えられた。また、砂防ダムの設置がない Rock Creek 流域において計算値が良好な一致を示したことから、砂防ダムの設置が河川の水循環に影響を与えていることが確認された。Turkey Pen 流域と Rock Creek 流域の土砂流出量は、それぞれ、178 ~ 242 t/year と 1428 ~ 1936 t/year と推定された。このことから、砂防ダムの設置が浮遊物質の流下を防ぐことを確認できた。さらに、検証期間中において砂防ダムに約 630 t の土砂が貯留され、流下する浮遊物質量が減少することから河川水質の向上が推測された。以上のことから、SWAT モデルは、砂防ダムによる長期的な影響の評価が可能であることを示した。

## 第 287 回雑誌会

(Jan. 19, 2018)

### (3) Genetic diversity of *Enterococcus faecalis* isolated from environmental, animal and clinical sources in Malaysia

Diane, S. D., Sui, M. L., Han, M. G., Gary, A. D. and Sadequr, R.

Journal of Infection and Public Health, **10** (5), 617-623 (2017).

Reviewed by E. Nishimura

*Enterococcus faecalis* は、ヒトを含む哺乳類の腸管内に存在する主要菌種であり、土壌、水環境、および植物からも検出される。一方で、院内感染症を発症させる病原菌種でもある。現在、動物由来株と環境由来株の腸球菌には、疫学的な強い関連があると考えられており、双方から分離した *E. faecalis* の遺伝子学的な関係性を調査することは重要である。そこで本研究では、動物、水環境、およびヒトから分離した *E. faecalis* を対象として、異なる宿主源における遺伝子学的関係性を検討した。調査は、2014年6月と12月において、マレーシアの Selangor 州と Sabah 州で実施した。試料は、家畜（鶏、牛）のふん便 120 試料、水試料 100 試料（家畜の飲料水 40 試料、河川水 30 試料、下水放流水 30 試料）、および病院患者 30 試料（病院から提供された *E. faecalis* 分離株）とし、合計 250 試料を試験した。試料採取後、1 試料から 1 株の *E. faecalis* 陽性コロニーを分離し、生化学性状試験と 16S rDNA に基づくシーケンス解析によって腸球菌種を同定した。同定された *E. faecalis* について、PFGE 法によって遺伝子型の類似性を評価した。また、PCR 法によって *E. faecalis* に関する病原性遺伝子 (*ace*, *asa1*, *cylA*, *esp*, *gelE*, *asa373*, *efaA*, *EF0591*, *EF2214*) を検出した。さらに、液体微量希釈法によって薬剤感受性試験を実施し、PCR 法によってバンコマイシン耐性遺伝子 (*vanA*, *vanB*) を検出した。

分離した *E. faecalis* 250 株について遺伝子型を調べたところ、類似度 90%において、63 パターンの PFGE 型が取得され、すべての宿主源において高い多様性が確認された。63 パターンの中には、畜産のふん便と水試料において、同一の PFGE 型を示す菌株が確認された（タイプ XLII）。その一方で、3つの宿主源の間において、同一の PFGE 型を示す菌株は確認されなかった。また、各宿主源から優占して検出された病原性遺伝子は異なっており（家畜のふん便と病院患者；*esp* 遺伝子、水試料；*asa1* 遺伝子）、同一の PFGE 型と病原性遺伝子には相関が確認されなかった。さらに、薬剤感受性試験を行ったところ、1 剤以上に耐性を示す菌株は 150 株（80%）存在し、*vanA* 遺伝子を保有している菌株は 24 株（9.6%）確認された。また、同一の PFGE 型と薬剤耐性遺伝子の間に特別な相関は確認されなかった。以上のことから、本研究で対象とした3つの宿主源の間には、病原性遺伝子や薬剤耐性遺伝子の拡散に寄与する遺伝子学的関係性はないことが示唆された。

## 第 288 回雑誌会

(Feb. 9, 2018)

### (1) Nutrients' removal from aquaculture wastewater using the macroalgae *Gracilaria birdiae*

Marinho-Soriano, E., Nunes, S. O., Carneiro, M. A. A. and Pereira D. C.  
Biomass and Bioenergy **33**, 327-331 (2009).

Reviewed by K. Nakada

ブラジルにおいて、エビ養殖は最も経済的価値の高い養殖産業である。しかしながら、エビ養殖は海洋生態系に悪影響を及ぼす原因となっている。特に、エビ養殖場の排水は窒素やリンなどの栄養塩が豊富に含まれていることから、沿岸域における富栄養化の原因として考えられている。一方で、商業的価値の高い海藻は、栄養塩を除去するためのバイオフィルターとして利用されることが多く、水産生物としても高い経済効果を与えている。そこで本研究では、エビ養殖排水を環境負荷としてではなく、栄養供給源として捉え、ブラジルの沿岸域に広く分布している紅藻 *Gracilaria birdiae* の生長に及ぼすエビ養殖排水の影響ならびにバイオフィルターとして利用するため栄養塩除去能力を評価した。エビ養殖排水の *G.birdiae* への影響は、週 1 回毎に湿重量（バイオマス量）を測定し、相対生長率（RGR）を算出した。また、*G.birdiae* の栄養塩の除去能力は、Strickland and Parsons 法によって栄養塩（ $\text{PO}_4^{3-}$ 、 $\text{NH}_4^+$ 、 $\text{NO}_3^-$ ）を週 1 回毎に分析し、検討した。試験は、10 L の水槽で 20 g の *G.birdiae* を用い、4 週間培養した。

エビ養殖排水による *G.birdiae* の生長に及ぼす影響を検討した結果、*G.birdiae* の湿重量、相対生長率ともに増加傾向を示した。この理由は、豊富な栄養条件下で *G.birdiae* を培養した場合、良好に生長するためであると考えられている。さらに、試験の全期間における *G.birdiae* の湿重量と RGR の平均値は、それぞれ  $23 \pm 0.61$  g、 $2.6 \pm 0.52$  %/day であった。また、*G.birdiae* の RGR は、エビの統合養殖でバイオフィルターとして利用される貝や他の海藻と同等の値であった。次に、*G.birdiae* による栄養塩の除去能力を検討した結果、 $\text{PO}_4^{3-}$ 濃度は  $1.85 \pm 0.03$   $\mu\text{mol/L}$  から  $0.10 \pm 0.02$   $\mu\text{mol/L}$  に減少し、 $\text{PO}_4^{3-}$ の除去率は 93%以上であった。これは、*Gracilaria* 属が高濃度の  $\text{PO}_4^{3-}$ を除去する能力を有するためと考えられる。また、 $\text{NH}_4^+$ 濃度は  $15.34 \pm 0.92$   $\mu\text{mol/L}$  から  $7.34 \pm 0.05$   $\mu\text{mol/L}$  に減少し、 $\text{NH}_4^+$ の除去率は約 52%であった。この  $\text{NH}_4^+$ の除去率の値は、統合養殖で利用される他の海藻の栄養塩除去率と同等の値であった。一方で、 $\text{NO}_3^-$ の除去率は 100%であった。以上のことから、*G.birdiae* は栄養塩の高い除去能力を有しており、エビ養殖場のバイオフィルターとしての利用、かつ水産資源としても期待できることが示唆された。

## (2) Study of the evolution of gravel beaches nourished with sand

Pagan, J. I., Lopez, M., Lopez, I., Abril, A.J., and Aragonés, L.  
Science of the Total Environment, **626**, 87-95 (2018).

Reviewed by A. Miyazono

海岸侵食の原因には、海岸構造物の建設などの都市開発や嵐による短期的なものや、気候の変化や堆積物の輸送による長期的なものがある。そのため、海岸線は絶えず変化しており、長期的な海岸の変化を研究するためには、海岸線の動態や堆積物の特徴を詳しく知る必要がある。また、海岸侵食の対策として行われている砂の養浜は、砂利のビーチに対して、土砂流出しやすくなることが知られている。そこで本研究では、土砂の養浜が行われている砂利のビーチにおいて、海岸侵食の原因を堆積物の特徴から分析した。調査は、スペインの Carrer de Mar beach (1,440 m), Centro beach (1,219 m), Arenal beach (1,380 m) を対象に、海岸線の変化について、プロファイルを作成した。このビーチは過去 2 回養浜が行われている。また、波データ（波高、周期、方向）と堆積物の平均中央粒径 ( $D_{50}$ ) から移動限界水深 (DoC) を求め、横断面のプロファイルを作成した。さらに、堆積物について摩耗試験、X 線回折分析 (XRD)、および走査型電子顕微鏡 (SEM) を用いて土砂特性を調査した。

ビーチプロファイルを作成した結果から、養浜後の数年間に Carrer de Mar beach で 12.8%, Carrer de Mar beach で 20.9%, Arenal beach で 8.9%の土砂が失われていることがわかった。また、二回目の養浜においても、Arenal beach と Carrer de Mar beach では、数年後、土砂は減少しており、全ての海岸において土砂流出が確認された。また、横断面プロファイルの結果から、Carrer de Mar beach と Arenal beach の DoC を求めると、それぞれ -6.09 m と -7.75 m であった。Carrer de Mar beach は、Arenal beach と比較して、DoC に達するまでの距離が約 100 m 長いので、同じ浜幅を得るためには、多くの養浜が必要であることが示唆された。摩耗試験の結果から、Centro beach と Arenal beach の土砂は、Carrer de Mar beach と比べて摩耗しにくいことがわかった。摩耗しやすい石英の割合は Centro beach で最も小さく、Carrer de Mar beach で最も大きくなった。また、Carrer de Mar beach では、摩擦力が大きいドロマイトの存在が確認されなかった。これらのことから、DoC に至るまでの距離が長く、摩耗しやすい鉱物が多く含まれる Carrer de Mar beach は、土砂流出を受けやすいことが示唆された。また、Carrer de Mar beach は、他の地点と比較して、砂粒子が均一ではなく、粒子数に違いがあるため、他の地点と異なることがわかった。以上の結果から、海岸侵食は、養浜土砂の粒径の大きさや鉱物組成と海岸土砂の粒径の違いに影響されることが明らかとなった。