第313回雑誌会

(**June**. 7th, 2019)

(1) Prevalence of antibiotics and antibiotic resistance genes in a wastewater effluentreceiving river in the Netherlands

Sabri, N.A., Schmitt, H., Van der Zaan, B., Gerritsen, H. W., Zuidema, T., Rijnaarts, H. H. M., and Langenhoff, A.A.M.

Journal of Environmental Chemical Engineering, xxx, xxx-xxx (2018).

Reviewed by H. Xie

Antibiotics are being used intensively for humans and livestock worldwide and have led to the presence of antibiotic resistance bacteria (ARB) and antibiotic resistance genes (ARGs) in the environment. Through the sewage system, wastewater treatment plants (WWTPs) receive the effluent that can contain a number of pollutants, including nutrients, metals, antibiotics, and chemicals from different sources. Once this effluent is discharged to the surface water, these contaminants enter the environment. ARGs are spread in the surface water by ARB, that possibly acquired these ARGs through horizontal gene transfer. The objective of this study was to investigate the occurrence of antibiotics (macrolides, sulfonamides, tetracyclines), ARGs (ermB, sul1, sul2, tetW), and class 1 integron (targeting the integrase gene) in a Dutch river that receives WWTP effluent. Sediment and water samples were collected during one year to identify correlations between ARGs and other environmental factors (pH, temperature, dissolved oxygen (DO), chemical oxygen analysis (COD), total phosphate (TP), ammonium (NH⁴⁺) and nitrate (NO³⁻)). The samples were analyzed for 52 antibiotics (18 sulfonamides, trimethoprim, 6 tetracyclines, 12 quinolones, and 15 macrolides) by LC-MS/MS.

The results show that only sulphonamides were found at the upstream with the highest concentration in the effluent, then remained stable along the river in October and slowly decreased in November. After statistical analysis revealed that there was no significant increase or decrease of ARGs along the river passage for both water and sediment, except for ermB that showed a slight decrease at the downstream. Standard parameters for detecting effluent water such as DO, nitrate, and phosphate are all below the allowable emission levels. ermB and tetW showed a positive correlation with NH⁴⁺, and all ARGs showed a negative correlation with DO. These water parameters showed no significant correlation with the prevalence of ARB. In contrast, the parameters were related to the concentration of selected ARGs. Once the antibiotics and ARGs enter the river, the concentration of antibiotics only slightly decreased, and ARGs show persistence until 20 km downstream in the water as well as in the sediment.

(2) Comparative analysis on floc growth behaviors during ballasted flocculation by using aluminum sulphate (AS) and polyaluminum chloride (PACl) as coagulants

He, W., Xie, Z., Lu, W., Huang, M. and Ma, J.

Separation and Purification Technology, 213, 176-185 (2019).

Reviewed by R. Kaku

バラスト凝集 (BF) は、従来の凝集沈殿に用いられる無機凝集剤に加えて、バラスト剤 (BA) と高分子凝集剤を併用する新たな処理法であり、従来法と比較して、非常に優れた処理性を有する。しかしながら、BF におけるフロック形成に関する詳細な情報は不足している。そこで本研究では、硫酸アルミニウム (AS) とポリ塩化アルミニウム (PAC) の異なる注入率 (0-100 mg/L) で形成されるフロックについて、成長、破壊および再形成の段階におけるゼータ電位とフロック径を比較・分析することによって、表面電位の変化と形成されるフロック特性の関係について検討した。さらに、処理水の残留濁度を測定し、凝集剤注入率がフロックの沈降性能に及ぼす影響についても調べた。原水は、カオリンを蒸留水に濃度 200 mg/L となるように調整した。また、BAにはマイクロサンド、高分子凝集剤にはアニオン性のポリアクリルアミド (PAM) を使用し、注入率をそれぞれ 2.5 g/L と 2.5 mg/L に固定して実験を行った。

各段階におけるゼータ電位とフロック径の測定結果から、異なる凝集剤注入率で形成されるマイクロフロックの表面電位特性がフロック径の大きさに影響を及ぼすことがわかった。フロックの成長の段階では、AS と PAC の注入率が高いほどゼータ電位は増加し、それに伴ってフロック径は減少した。フロック径の減少は、カチオン性 AI 加水分解物と PAM が強い架橋作用で結合され、マイクロサンド粒子がフロック内に取り込まれにくくなったためと推察された。フロックの破壊の段階では、AS と PAC の注入率がそれぞれ 60 mg/L と 40 mg/L 以上において、フロックをは増加する傾向を示した。これは、成長の段階で形成されたマイクロサンド含有量の少ないフロックが、高い撹拌強度において立体配座を形成したことに起因すると考えられる。フロックの再形成の段階では、AS と PAC の注入率の増加に伴って、フロック径の減少する傾向が確認された。さらに、処理水の濁度から評価すると、AS と PAC の注入率がそれぞれ 20 mg/L と 10 mg/L のときに最小値となった。一方で、AS と PAC の注入率がそれぞれ 60 mg/L 以上のとき、残留濁度は100 NTU を上回った。以上のことから、BF 処理では、過剰注入によってマイクロサンド含有量の低いフロックが形成され、処理性が低下することが示唆された。

第314回雑誌会

(June. 14th, 2019)

(1) Antibiotic resistance in *Escherichia coli* from pigs from birth to slaughter and its association with antibiotic treatment

Burow, E., Rostalski, A., Harlizius, J., Gangl, A., Simoneit, C., Grobbel, M., Kollas, C., Tenhagen, B and Kasbohrer, A.

Journal of Preventive Veterinary Medicine, 165, 52-62 (2019).

Reviewed by H. Hiroki

養豚場において、抗菌薬による豚の病気の治療は薬剤耐性菌を発生させる原因となる。ヨーロッパ諸国では、豚の食肉生産率が高く、抗菌薬の使用量も多い。しかしながら、豚の抗菌薬による治療と薬剤耐性菌の発生における関係性を調査した研究は少ない。そこで本研究では、豚の生涯にわたる抗菌薬の使用が、薬剤耐性菌の発生に及ぼす影響について調査した。試料は、2015年4月から2016年10月において、ドイツに存在する29の養豚場から選定された58匹の母豚と、その母豚から出生した子豚406匹を対象とし、直腸から滅菌綿棒を用いて、ふん便を採取した。子豚は、ふん便を各期間(乳児期間、離乳期間、肥育期間、最終肥育期間、および屠殺期間)において1回ずつ、合計5回採取した。採取したふん便を滅菌生理食塩水に希釈してBTB乳糖加寒天培地に塗布し、37°Cで24時間培養した。培養後、生育したコロニーを単離し、イオン化飛行時間型質量分析計(MALDI-TOF MS)を用いて細菌種を同定した。大腸菌と同定された株について、最小発育阻止濃度(MIC)法を用いて13種類の抗菌薬に対する薬剤感受性試験を実施した。さらに、得られた結果から、Fisher検定とロジスティック分析を用いて試料間の関係性を評価した。

1 剤以上に耐性を持つ大腸菌が検出された割合は、各期間において、それぞれ 93% (374/403 株)、100% (386/386 株)、99% (337/339 株)、99% (312/313 株)、および 98% (253/258 株) であった。 アンピシリンとテトラサイクリンにおける耐性菌は、子豚に治療を施す前に高確率で検出された ため、養豚場に普遍的に存在する可能性がある。さらに、 β -ラクタム系抗菌薬の耐性菌は、治療を受けた豚の方が、治療を受けていない豚と比較して、検出割合が有意に高かった(p < 0.05)。 また、各抗菌薬の投与経路(飼料、水、注射、ドレンチャー)と子豚における耐性菌の発生割合 について相関を確認した結果、Fisher 検定では、いくつかの経路で有意な相関を示した(p < 0.05)が、ロジスティック分析においては相関が認められなかった。次に、母豚と子豚における耐性菌の検出割合を比較した結果、母豚が耐性菌を保有していた場合、子豚も同様の抗菌薬に高確率で耐性を示した。以上のことより、抗菌薬による治療と耐性菌の関係性は示された。今後も更なる

(2) Multiplex PCR coupled with direct amplicon sequencing for simultaneous detection of numerous waterborne pathogens

Li, B., Saingam, P., Ishii, S. and Yan, T.

Applied Microbiology and Biotechnology, 103, 953-961 (2019).

Reviewed by H. Shimizu

水環境中に存在する病原微生物による水系感染症は、世界中で問題となっている。現在、水環境中の潜在的リスクを監視するため、ふん便指標細菌(FIB)が用いられている。しかしながら、病原微生物は種類が多く、FIB の情報のみではその存在実態を把握することは困難である。そこで本研究では、水試料から病原細菌を一斉検出することを目的として、細菌の DNA を基に複数の病原細菌を検出するマルチプレックス PCR (mPCR) 法と次世代シーケンシング (NGS) 法を組み合わせた mPCR-NGS 法を検討した。供試菌株は、9種類の病原細菌とし、16種類の病原遺伝子を標的とした。病原細菌を培養し、DNA 抽出後、濃度を 3.4 ng/μL に調整した試料を作成した。次に、それぞれの標的遺伝子に特異性を示すプライマーを設計し、mPCR 法における特異性と最適アニーリング温度を検討した。そして、PCR 増幅産物について、NGS 法で病原遺伝子を検出した。また、3 つの都市河川から試料 (SW1~3) を採取し、DNA 抽出後、mPCR-NGS 法によって、病原遺伝子を検出した。さらに、SW1~3 に以下に示す 3 つのグループの細菌の DNA を添加した試料 (SWG1~3)を用いて、mPCR-NGS 法を行い、病原遺伝子を検出した:G1 (Escherichia coli K12、E. coli O157:H7、Shigella flexneri)、G2 (Salmonella enterica、Campylobacter jejuni、Clostridium perfringens)、G3 (Legionella pneumophila、Listeria monocytogenes、Vibrio cholerae)。

設計したプライマーを用いて mPCR 法を行った結果,全ての標的遺伝子において DNA の増幅が確認され,最適アニーリング温度は 54℃ であった。PCR 増幅産物を NGS 法によって解析した結果 (mPCR-NGS 法), *L. pneumophila* の mip 遺伝子と *V. cholerae* の ctxA 遺伝子以外の病原遺伝子が検出され,その相対存在量は 0.006~21.5%であった。検出頻度の違いが確認され,PCR 増幅効率の相違が原因であることが示唆された。SW1~3 を mPCR-NGS 法によって解析したところ,標的遺伝子はほとんど検出されなかった。また,DNA 抽出した SWG1~3 について mPCR-NGS 法で解析したところ,それぞれ添加した病原細菌の標的遺伝子が検出され,その相対存在量は 0.03~9.6%,0.03~22.4%および 0.005~0.37%であった。以上のことから,mPCR-NGS 法によって水試料から水系病原菌を検出することが可能であることがわかった。しかし,PCR 増幅効率が異な

るといった問題も浮き彫りとなった。今後は、増幅効率を改善し、さらなる高感度検出を目指す 必要がある。

第 315 回雑誌会

(June. 21st, 2019)

(1) Hydroxyapatite powder cake filtration reduces false positives associated with halophilic bacteria when evaluating *Escherichia coli* in seawater using Colilert-18 Tsuchioka, H., Izumiyama, S., Endo, T., Wada, T., Harada, H. and Hashimoto, A. Journal of Microbiological Methods, **159**, 69-74, (2019).

Reviewed by M. Katafuchi

大腸菌は、水の微生物学的品質を評価するために使用される重要なふん便指標細菌である。 Colilert-18 法は、飲料水、入浴用水、および排水中の大腸菌を迅速かつ簡単に検出できるため、広く使用されている定量法である。しかしながら、Colilert-18 法は海水に対して偽陽性を示すため、信用度が低くなる。試料を希釈することで偽陽性を回避できるが、大腸菌の定量が困難になる。そこで本研究では、前処理としてヒドロキシアパタイト(HAP)粉末を使用したケーキ濾過を行うことによって、水試料を希釈することなく偽陽性を避ける方法を検討した。試料は、河川水試料として広島県の8つの河川、および海水試料として広島湾の9地点から採取した。採取した河川水試料と海水試料について、前処理としてケーキ濾過を行う場合と行わない場合について、Colilert-18 法で計数した大腸菌濃度を比較した。また、未希釈海水試料とケーキ濾過を行った海水試料のトレイから、それぞれ1枚につき5つのウェル(全45個)を無作為に選択し、DNA抽出後、PCR 法を用いて試料中の16S rRNA遺伝子から大腸菌を同定した。

河川水試料に対して Colilert-18 法で大腸菌を計数した結果, 前処理としてケーキ濾過を行った河川水試料の大腸菌濃度は, ケーキ濾過を行わない場合の濃度とほぼ同様の結果を示した。これに対して, 海水試料について, ケーキ濾過を行わずに未希釈海水試料の大腸菌を計数した場合には, 9つの試料全てが大腸菌陽性となり, 大腸菌濃度は 86.2~387.3 MPN/100 ml の範囲であった。そこで, 海水試料を 1/10 に希釈したところ, 9 つの試料のうちの 2 つのみから大腸菌が検出され, 濃度は 10~52 MPN/100 ml の範囲となった。ところが, ケーキ濾過を行い, 海水試料を判定した場合, 大腸菌が 9 つの試料のうちの 8 つから検出され, 濃度は 0.1~17.89 MPN/100 ml の範囲であった。次に, DNA 抽出物について, PCR 法で大腸菌の 16S rRNA 遺伝子を解析した結果, ケーキ濾過を行わなかった 9 つの未希釈試料では, ウェル 45 個において, 陽性を示した 39 個のウェルのうち, 3 つのみが大腸菌として同定された。これに対して, ケーキ濾過を行った海水試料では, ウェル 45 個において, 39 個の陽性を示すウェル全てが大腸菌として同定された。以上の結果から, 前処理としてケーキ濾過を行うことによって, 水試料を希釈せずに Colilert-18 法の偽陽性を避けられることがわかった。

第316回雑誌会

(June.28,2019)

(1)野生動物の保護管理における衛星リモートセンシング技術の適用

望月 翔太, 村上 拓彦 日本生態学会誌, **64**, 253-264 (2014).

レビュー: 宇都宮 将

現在、野生動物の生息地を評価するために衛星リモートセンシング技術が利用されている。一 方で、ニホンザルによる農作物への被害が深刻化しており、生息地の把握が求められる。そこで 本研究では、1978年と2007年でのニホンザル生息適地地図を構築し、29年間における生息適地 地図の変化を評価して、個体群管理や生息地管理に貢献することを目的とした。VHF-ラジオテレ メトリー法と GPS 発信機を用いてニホンザルの位置情報を取得した。1970 年代の土地被覆を分類 するために、オブジェクトベース画像分類(DI)と決定木(CART)により、1978年に得られた衛星画 像データ(Landsat/MSS:主に陸域を観測したもの) に対して画像分類を行った。また, 2000 年代の 土地被覆を分類するために、2007年に得られた衛星画像データ(ALOS/AVNIR-2)に対して同様に 画像分類を行った。1978年と2007年で土地被覆の変化が生じた部分のみを分類し、2007年の土 地被覆に変化箇所を反映させることで誤分類を抑えた。分類結果と空中写真の一致程度を Kappa 係数により算出し,分類精度を検証した。サルの在/不在情報を応答変数,14 項目の環境変数(e.g., 最大積雪深,農地からの最短距離)を予測変数として,集団学習の一種であるランダムフォレス トを用いて、ニホンザルの生息適地の予測モデルを構築した。14項目の変数の重要性を求め、重 要性の高い4変数を対象に、生息地推定への寄与方向を評価した。構築された1978年、2007年 それぞれの土地被覆情報を利用したニホンザルの生息適地の差分により、29年間のニホンザルの 潜在的な分布域の変化状況を評価した。

ニホンザルの生息地推定において重要性の高い上位 4 変数として、針葉樹林の面積割合、農地からの最短距離、農地の面積割合、最大積雪深が選択された。農地の面積割合と農地からの最短距離が小さいときに、ニホンザル潜在分布域推定への寄与率が高まる結果となった。また、最大積雪深が高い場合に寄与率が増加した。これらの結果から、ニホンザルは農地が多いオープンな環境を好まず、積雪の多い環境を好むことがわかった。また、1978年、2007年のニホンザルの潜在的な分布域および、29年間の潜在的な分布域の変化状況を示した図に基づくと、好適環境が減少した区域よりも増加した区域の方が多いことから、29年間でニホンザルの好適環境が増加したことがわかった。

(2) Precipitation softening: a pretreatment process for seawater desalination

Ayoub, G, M., Zayyat, R, M. and Al-Hindi, M.

Environmental Science and Pollution Research, 21, 2876-2887(2014).

Reviewed by T. Yadai

淡水資源の需要増加に伴い,新しい水供給方法が模索されている。その中でも,注目されているのが海水の淡水化である。海水を淡水化させる方法として逆浸透膜法がある。しかし,逆浸透膜法の欠点としてファウリングが挙げられ,その原因物質としては,カルシウム(Ca),マグネシウム(Mg),ケイ素(Si),ホウ素(B),鉄(Fe),および細菌などが挙げられる。そこで本研究では,海水を軟水化することによる原因物質の除去性能を検討した。アルカリ剤は,水酸化ナトリウム溶液と炭酸ナトリウム溶液を 2:1 の比率で配合し調整した。海水 2 L をビーカーにとり,ジャーテスターに設置し,アルカリ剤を加え,100 rpm で 1 分,30 rpm で 20 分撹拌した後,60 分静置させた。そして,上澄み水を採取した。実験各法は,pH 10.5,11,11.5,12,温度は 10° C, 15° C, 20° C, 30° C に変化させた。また,各原因物質は以下の方法で測定した:Ca と Mg,EDTA 滴定;Si,比色分析;B,分光測色法;Fe,原子吸光分析法;細菌,メンブレンフィルター法。統計解析には,ANOVA,F 検定,仮説検定,および回帰直線を用いた。

Ca, Mg, および Si は、海水を軟水化することによって、沈殿物 CaCO $_3$ 、 Mg(OH) $_2$ 、および MgSi 化合物に変化させ除去することができた。Ca と Mg の除去には、pH が関係するが、 温度は重要ではないことがわかった。また、Ca と Mg の沈殿は、pH が高いほど Ca 2 +と Mg 2 +がアルカリ剤と反応を起こす。その結果、CaCO $_3$ と Mg(OH) $_2$ の沈殿が生成され、Ca 2 +と Mg 2 +の除去を促進された。pH 11 の条件において、Ca と Mg の最高除去率はそれぞれ 100%と 99.6%であった。また、B の除去には温度 pH が関係し、温度が 20°C の時が最も除去率が高く、pH が上昇するとともに除去率が低下した。また、温度 20°C と pH 10.5 の条件において、B の最高除去率は 72%となった。海水中に Si と Mg が存在すると、MgSi 化合物が生成され、高アルカリにおいて B は、MgSi 化合物によって吸着されることが判明した。Si を加えることによって、B の除去率を 86%まで上昇させることができ、Si 自身は MgSi 化合物として完全に除去された。また、Fe は CaCO $_3$ や Mg(OH) $_2$ のフロックに吸着され、除去された。pH 10.5 の条件において、Fe の最高除去率は 99.2%となった。さらに、大腸菌群と糞便性大腸菌は、pH 10.5 のときに未検出となった。以上のことから、海水の軟水化は、ファウリングを起こす原因物質の除去に役立つことがわかった。

第317回雑誌会

(July.5th,2019)

(1) アンサンブル気候変動予測データベースを用いた洪水頻度解析による長良 川流域の温暖化影響評価

原田 守弘, 丸谷 靖幸, 児島 利治, 松岡 大祐, 中川 友進, 川原 慎太郎, 荒木 文明

土木学会論文集B1(水工学), 74,(4), 181-186, (2018).

レビュー:谷村 優仁

近年の相次ぐ記録的豪雨や災害被害の発生から、洪水による水害リスクへの影響予測と気候変動に対する適応策を検討する必要性が高まっている。しかし、洪水頻度解析は確実性に欠け、河川管理の一般的な手法との乖離が見られる。そこで本研究では、河川管理の場において用いられる流出解析モデルと水文観測データに洪水頻度解析を統合することによって、洪水頻度解析の結果の理解を促進する枠組みを構築することを目的とした。研究対象である長良川流域は、洪水調整施設を持たないため、気候変動の影響を受けやすいと考えられる。流出解析モデルに、貯留関数法を用いた。モデルの再現性の検討は、過去13洪水を対象とした。気候変動予測データベース(d4PDF)の領域気候モデル NHRCM20(水平解像度20km)による過去実験と4℃上昇実験を行った。そして、それぞれの実験から長良川流域の年最大降水イベントを抽出し、ハイエトグラフを作製した。ハイエトグラフを入力条件とした洪水頻度解析から、洪水ピーク流量を出力した。算出された年最大流量と国土交通省が観測した流量を比較し、過去気象による洪水頻度分布と観測値の RMSE(平均二乗誤差平方根)が最小となるような補正係数を求めた。求めた補正係数を4℃上昇実験に基づく洪水ピーク流量頻度分布に適用した。さらに、補正済みの累積分布から超過確率年数ごとの洪水ピーク流量を評価した。

洪水頻度解析における洪水ピーク流量は観測値で約7700 m³/s,解析結果では約8200 m³/s となった。観測値と解析結果との誤差が約10%であったため,実用的な精度で計算可能であると判断した。また,解析結果における頻度分布では,過去実験と4℃上昇実験のいずれにおいても,水文統計の最大値分布の表現に一般的に用いられるグンベル分布と類似した結果が得られた。双方の実験結果を比較すると,4℃上昇実験において,流量の多い洪水の発生頻度が増加していることがわかった。補正係数は,観測値と解析値の間に生じる誤差を最小にする値であるK=0.92と設定した。超過確率年数ごとの洪水ピーク流量の評価としては,d4PDF の過去実験では河川整備計画目標流量に到達する確率は,100年以上に1回であった。しかし,4℃上昇実験では30年に1回程度まで発生確率が増加する予測結果が得られた。

(2) The effect of filtration method on the efficiency of environmental DNA capture and quantification via metabarcoding

Li, J., Handley, L. L., Read, D. S. and Hänfling, B. Molecular Ecology Resources, **18**, 1102-1114 (2018).

Reviewed by S. Fukagawa

環境 DNA (eDNA) は、迅速で非侵襲的な生物多様性モニタリングのための有望なツールである。しかしながら、水環境サンプル中の eDNA 濃度は低く、ろ過による補捉・濃縮が必要となる。そこで本研究では、種類と孔径が異なるろ紙を用いることによって、eDNA 補捉効率とメタバーコーディング解析結果に与える影響の違いについて評価した。試料は、2015 年 8 月に英国ノッティンガムにおける 4 つの人工養殖池で採水した。各試料について、異なる孔径の混合セルロースろ紙(0.45 μm, 0.45MCE; 0.8MCE; 1.2MCE)、0.45 μm の Sterivex - HV PVDF ろ紙、プレフィルターとして 20 μm の定性セルロースろ紙(PF)を用いた PF_0.45MCE、および PF の 6 種類のろ過方法によって、それぞれ 300 mL を 5 反復で通水した。その後、PowerWater DNA Isolation Kits を用いて DNA 抽出を行い、NanoDrop ND-100 分光光度計によって総 DNA 濃度を測定した。また、メタバーコーディング解析を行い、養殖池に存在する魚類種を検出した。それぞれのろ過方法における反復間の変動を評価するために、魚類種の相対存在量に基づく Horn 類似度指数を計算した。その後、ろ過方法間におけるろ過処理時間と Horn 指数の違いを調べるため、Kruskal-Wallis の一元配置分散分析と Dunn 検定を行った。また、ろ過方法間における総 DNA 濃度の違いを調べるため、分散分析と Tukey 検定を実施した。リード数と魚の存在量またはバイオマスの間の線形相関の有意性は、ピアソンの積率相関係数によって評価した。

孔径の大きいろ紙を用いた場合には、ろ過時間が有意に減少した。一方、孔径が異なることによる DNA 濃度および検出される魚類種についての影響は認められなかった。6 種類のろ紙の中で、0.45MCE は、DNA 回収量や反復間において検出される魚類相対存在量の類似性の点で最も優れていたが、ろ過時間は 0.8MCE と比較して大幅に長くなった。このことから、ろ過時間を踏まえると 0.8MCE が最適なろ紙であると結論付けた。Horn 類似度指数は、孔経の増加とともに有意に減少したため、孔経の増加が反復間の類似性を減少させることが示唆された。反復測定の平均リード数は、魚類の存在量およびバイオマスとの間に正の相関関係を示した。本研究は、富栄養性かつ魚の密度が高い湖沼で得られた結果である。したがって、魚の密度が低い条件でのろ紙の違いによる eDNA 捕捉効率の影響について、さらなる研究が必要である。

第318回雑誌会

(July.19th,2019)

(1) Occurrence of antibiotics and antibiotic resistance genes in a sewage treatment plant and its effluent-receiving river

Jian, X., Yan, X., Hongmei, W., Changsheng, G., Huiyun, Q., Yan, H., Yuan, Z., Xiaochen, L., and Wei, M.

Chemosphere, 119, 1379-1385 (2015).

Reviewed by S. Yano

抗菌薬は、病院や畜産場で使用されており、自然環境においても検出されている。環境中に存在する抗菌薬の多くは下水由来であり、下水処理場(STP)では完全に除去されず、河川に放流される。そして、薬剤耐性菌(ARB)および薬剤耐性遺伝子(ARG)が生じる要因となっている。そこで本研究では、下水処理の過程における抗菌薬の除去率を調査し、STPと下水処理水が流入する河川における抗菌薬とARGの濃度の関係性を明らかにした。試料は、北京にあるSTPの処理過程における下水処理水を採取した。また、下水処理水が流入する河川において、上流と下流から水試料を採取した。試料から高速液体クロマトグラフィータンデム質量分析(HPLC-MS/MS)によって3種類のテトラサイクリン(TC)系抗菌薬、5種類のスルホンアミド(SA)系抗菌薬、および2種類のキノロン(QN)系抗菌薬の残留濃度を定量した。次に、qPCRによって13種類のARG(6種類のTC耐性遺伝子:tetA,tetB,tetE,tetW,tetM,およびtetZ,3種類のSA耐性遺伝子:sull,sul2、およびsul3、4種類のQN耐性遺伝子:gryA,parC,qnrC,およびqnrD)を検出した。その後、細菌の16SrRNAのコピー数に対するARGのコピー数からARGの存在割合を調べた。また、二変量相関分析によって抗菌薬の濃度とARGの存在割合の関係を明らかにした。

一次処理水の抗菌薬の TC, SA, および QN の除去率は,それぞれ 87%, 11%, および 18%であった。しかしながら, QN の濃度は、二次処理水において増加した。相関分析により、tetB と tetW の存在割合は、それぞれ OTC (p<0.05) と TC (p<0.01) の残留濃度に有意な相関を示した。さらに、qnrC とエンロフロキサシンの残留濃度に有意な負の相関が示された($r^2=-0.805$)。また、tetA と tetZ($r^2=0.859$, p=0.013)、tetB と tetW($r^2=0.991$, p<0.01)にそれぞれ相関が認められた。一方、sull、sul2、および sul3 と抗菌薬の間に有意な相関は認められなかった。STP における ARG の存在割合は、処理過程で変動が小さかった。また、河川の下流において tetE、tetW、sul2、sul3、qnrC、および qnrD の存在割合は、下水処理水の放流による影響を受けていなかった。しかし、STP の処理過程において、ARG は完全に除去されず放流されていた。以上のことから、一部の抗菌薬と ARG の間に相関が認められたので、tetE ないて、増加する可能性が示唆された。

第319回雑誌会

(July.25th,2019)

(1) Occurrence of seventeen veterinary antibiotics and resistant bacterias in manure fertilized vegetable farm soil in four provinces of China

Wei, R., He, T., Zhang, S., Zhu, L., Shang, B and Li, Z. Chemosphere, **215**, 234-240 (2019).

Reviewed by H. Hiroki

獣医用抗菌薬 (VA) は、家畜の疾病予防や成長促進を目的として使用される。また、VAを含む家畜のふん便は堆肥化され、肥料として農業土壌で使用される。中国食品薬品監督管理局の調査によると、中国の農業土壌における VA の残留濃度は、薬剤耐性菌の発現レベル (100 μg/kg) よりも有意に高いことが報告されている。このことから、薬剤耐性菌が農作物を介して人間の健康に影響を与える可能性が考えられる。そこで本研究では、農業土壌における VA の残留濃度の測定、ならびにヒトに対する健康リスクの評価を行うことを目的とした。試料は、2016年8月において、中国の河北省、河南省、四川省、および江蘇省に位置する農場から、合計53 (24:有機野菜農場、16:養鶏場の肥料を用いた農場、14:養豚場の肥料を用いた農場)の土壌を採取した。試料中におけるスルホンアミド系 (SA) 5種類、マクロライド系 (MAC) 3種類、アンフェニコール系 (AM) 1種類、フルオロキノロン系 (FQ) 4種類、およびテトラサイクリン系 (TC) 4種類の VA 濃度を液体クロマトグラフィータンデム質量分析 (LC-MS/MS) によって測定した。次に、試料からマッコンキー寒天培地で細菌を単離し、単離株からアルカリ熱抽出によって DNA を抽出した。そして、標的とした 20種類の薬剤耐性遺伝子 (ARGs)を PCR 法で検出した。また、抗菌薬による健康リスクをリスク指数 (RQ) によって評価した。

調査した土壌における VA の平均残留濃度は、SA、MAC、AM、FQ、および TC において 2.61 μg/kg、12.24 μg/kg、0.06 μg/kg、12.78 μg/kg、および 82.75 μg/kg であり、TC の残留濃度が最も高い値を示した。また、土壌から 6 種類の細菌が単離され、特に Escherichia coli と Klebsiella pneumonia が ARGs を持つ優占種であった。さらに PCR によって、8 種類の ARGs(tetA、tetB、qnrS、oqxA、sul1、sul2、ermA、floR)が検出された。その中において、tetA は最も検出率が高く、試料中の 20%の割合で検出された。次に、薬剤耐性菌の発現レベル(100 μg/kg)よりも高い残留濃度を示した抗菌薬についてリスク評価を行った結果、オキシテトラサイクリン、クロルテトラサイクリン、エンロフロキサシン、およびシプロフロキサシンは、土壌試料の 28%(15/53 試料)、26%(14/53 試料)、4%(2/53 試料)、および 4%(2/53 試料)でハイリスクと判断された。以上のことから、本研究は中国における VA の使用および農場の衛生管理のための重要な情報となり得る。

(2) Diversity and Transport of Microorganisms in Intertidal Sands of California Coast

Boehm, A.B., Yamahara, K.M., and Sassoubre, L.M.

Envrionmental Microbiology, **80**, 3942-3951 (2014)

Reviewed by Y. Takata

海水中の有機物は、潮流と波の影響を受け、浜辺の潮間帯を通過する際に、微生物によって無機化されて循環する。また、微生物は浜辺の栄養素循環において重要な役割を果たしている。しかしながら、潮間帯における砂中の微生物の移動や微生物群集の移動と多様性を調査した研究は少ない。そこで本研究では、潮間帯における砂中の微生物群集の移動と多様性を調査した。試料は、2009年10月16~29日において、カリフォルニアの海岸に属する49の浜辺を対象として、日当たりの良い満潮線上の乾燥した砂25 cm³を合計10 サンプル採取した。また、2013年3月19日において、49の浜辺のうち、ラバーズポイントビーチ(LPB)とコーウェルビーチ(CB)の浜辺から海水と砂を採取した。各試料10gから、Power Max 土壌 DNA キット(MoBio)を用いて DNA の抽出を行い、16SrRNA 遺伝子の V6-V4 領域を対象に、NGS 法によって微生物群集を解析した。次に、マンテル検定を用いて、各試料の微生物群集と浜辺間の距離の関係を調査した。また、類似度分析(ANOSIM)によって、砂の微生物群集の類似性を評価した。さらに、長さ3cm、直径2.5cmのポリ塩化ビニル浸透カラムに、LPBとCBから採取した砂を充填した。そして、濾過減菌した海水を流入し、カラムを通過した海水とカラム内の砂について、NGS 法によって微生物群集を調査した。また、どの微生物が海水によって運ばれたのか分析するために、字句解析を用いた。

NGS 法によって、49 の浜辺の砂から 42 の門に分類される微生物群集が確認された。マンテル検定の結果、浜辺間の距離が近いほど、類似した微生物群集を持つ傾向があった(p<0.01)。次に、ANOSIM 分析の結果、粒度、有機炭素含有量、腸球菌、波、および土地被覆の条件が類似した砂は、同様の微生物群集を持つ傾向があった(p<0.02)。また、カラム実験において、LPB と CB の海水と砂から確認された微生物群集のうち、約3分の2が海水中に存在していた。この結果から、海水によって砂の微生物群集が潮間帯に運ばれている可能性がある。次に、字句解析の結果、カラムを通過した海水において Alteromonas、Gramella、Phaeobacter、および Psychrobacter 属の微生物が最も多く検出された。この4属の微生物は、他のカリフォルニアの浜辺においても多く検出されており、どの浜辺においても海水によって微生物群集の運搬が行われている可能性がある。以上のことから、潮間帯には多様な微生物群集が存在し、潮流と波によって潮間帯に運ばれることが示唆された。

(3)Impacts of large dams on downstream flow conditions of rivers: Aggradation and reduction of the Medjerda channel capacity downstream of the Sidi Salem dam (Tunisia)

Yadh, Z., Abdelmajid, G. and Jean, A. Journal of Hydrology, **351**, 318-330 (2008).

Reviewed by R. Nakano

1981年にチュニジアの Medjerda 川において Sidi Salem ダムが開設されて以来,下流の河道容量減少が観測された。ダムのオーバーフローおよび小規模な灌漑計画などの人為的な影響は,ダム下流の河川流量と河道容量の減少をもたらした。さらに,ダム下流における河道容量の大幅な減少による洪水発生頻度の増加が問題となっている。本研究では、Sidi Salem ダム下流の Jeder da 観測所における河床の土砂量から、2003年に起きた洪水と河川下流における河道容量の減少の関連性を評価した。また、下流河床における土砂量およびオーバーフローによるダム内部の土砂処理効率について調査した。下流河床における土砂量は、ダムの稼働開始から15年間のオーバーフローによる水量と、水に対する土砂の平均濃度によって算出した。排出した土砂は海に到達せず、土砂の比重は1.6と仮定した。そして、土砂の質量と比重によってダムから海までの1mあたりの平均土砂量を算出した。また、オーバーフローによる土砂流出率は、ダム稼働開始から10年間で排出した土砂の総量、密度、および稼働年数を用いて、ダム内の土砂の年間残留量を算出した。

ダム建設前の 1976 年と建設後の 1996 年における水深測量の結果,下流河床の土砂量が増加し、河道容量は 20%減少した。また、2003 年の洪水は、1973 年と比較すると最大流量が低かった。さらに、2003 年と 1973 年の洪水による運搬水量は、それぞれ 9 億 4000 万 m³ と 9 億 9700 万 m³ であり、同程度であった。しかしながら、2003 年の洪水は、1973 年と比較して大きな被害を与えた。これは、Medjerda 川下流の河道容量の減少が原因であると考えられる。また、下流河床における土砂量の調査では、河床全体に堆積する土砂の平均土砂量は 3.5 m³/m であった。オーバーフローによる土砂流出率については、ダム内における土砂の年間残留量が約 22 万 m³/y であり、これはオーバーフロー前に堆積していた土砂の約 7%であった。オーバーフローをすることによって、下流河床全体に堆積する平均土砂量は増加し、下流の土砂撤去工事が必要であることが明らかとなった。したがって、ダムの保全には、オーバーフローよりも、上流域における侵食防止対策が貢献していると考えられる。以上のことから、Medjerda 川河道は、Sidi Salem ダム下流の土砂撤去工事、およびダムの上流域における侵食防止対策による回復が望ましい。

第320回雑誌会

(Aug.6th,2019)

(1) Global monitoring of antimicrobial resistance based on metagenomics analyses of urban sewage

Hendriksen, R. S., [...], Aarestrup F. M.

Nature Communications, **1124**, 1-12 (2019).

Reviewed by H. Xie

Globally, a rapidly increased proportion of the human population lives in urban areas and an increasing proportion is connected to a sewer system. Since antimicrobial resistance (AMR) is a serious threat to global public health, obtaining representative data on AMR for healthy human populations is difficult. In this research, domestic sewage was collected from 79 sample locations, covering 7 geographical regions from 74 sites in 60 countries. And used metagenomic analysis of untreated sewage to characterize the bacterial resistome from samples. From each location, on 2 consecutive days between 25 January and 5 February 2016, one representative, non-processed, unfiltered urban sewage sample of 2 L was collected from the respective main sewage pipeline(s) prior to the inlet of the wastewater treatment plant. For each DNA extraction progress, a DNA extraction blank control was processed in parallel with the sewage samples to monitor. Finally, whole-community sequencing was used to test the DNA sequencing data. In this study, metagenomics that benefit from the ability were used to quantify thousands of genes.

The data indicates that the collected urban sewage samples are more like chicken, pig or mouse animal feces microbiome than the human fecal microbiome. As a result, a total of 1546 genera were detected in all samples, which are typical feces such as *Faecalibacterium*, *Bacteroides*, *Escherichia*, *Streptococcus and Bifidobacterium*. A total of 1625 different AMR genes were identified, such as *msr*, *erm*, *mph* and *blaOXA*. AMR genes encoding resistance toward macrolides, tetracyclines, aminoglycosides, beta-lactams, and sulfonamides were the most abundant. Most samples from Europe and North America had a high relative proportion of macrolide resistance genes, while Asian and African samples had a large proportion of genes providing resistance to sulfonamides and phenicols. The total AMR gene abundances varied across sites and continents. The highest AMR gene levels were observed in African countries, and at the lower end of the spectrum were Oceania. These findings suggest that the diversity and abundance of global AMR genes vary from region to region. To reduce the global burden of AMR, it is necessary to improve sanitation environments for health.

(2) Treatment of paper mill wastewater using a composite inorganic coagulant prepared from steel mill waste pickling liquor

Yang, S., Li, W., Zhang, H., Wen, Y. and Ni, Y.

Separation and Purification Technology, 209, 238-245 (2019).

Reviewed by R. Kaku

鉄鋼の酸洗浄から生じる廃液(酸洗浄液)は、複合凝集剤を調整するための主原料として用いられている。また近年、製鋼工場の酸洗浄液から調整された複合凝集剤であるポリ硫酸第二鉄塩化アルミニウム(PFASC)が注目されている。そこで本研究では、PFASC の特性を明らかにするために、50℃の真空オーブン中で 20 時間乾燥させた PFASC 試料について、フーリエ変換赤外分光分析(FT-IR)と X 線回折分析(XRD)を行った。さらに、製紙工場廃水を対象に 3 つの凝集剤(PFAFC、ポリ塩化アルミニウム(PAC)およびポリ塩化第二鉄(PFC))の注入率を変化させて凝集試験を行った。凝集助剤には、アニオン性のポリアクリルアミド(PAM)を用いた。そして、処理水の COD 除去率と色度除去率によって、3 つの凝集剤の処理効果を比較した。また、凝集の各段階(凝集剤注入後、PAM 注入後)のフロック径とフロック個数は、収束ビーム反射測定法(FBRM)で測定した。さらに、ガスクロマトグラフィー質量分析法(GC-MS)によって、処理前後の廃水と処理水に含まれる有機物量の変化について調べた。

FT-IR 分析によって PFASC の分子構造を解析した結果, Fe-OH-Fe, Al-OH-Al, Fe-O-Fe, Al-O-Al, OH-, Fe-O, および Al-O の存在が確認された。また, XRD 分析の結果, Fe と Al を含む 7種類の水酸化物が同定された。これらの結果から, PFASC 中に Fe や Al を含む水酸化物が形成されることが明らかとなった。凝集試験において, PFASC の除去率 (COD 除去率, 色度除去率) は (65.3%, 71.2%) であり, PAC の除去率 (51.8%, 42.9%), PFC の除去率 (67.6%, 58.6%) と比較すると高い値を示した。なお, 処理に最適な注入率は, PFASC において 1.0 ml/L, PAC と PFC において 1.25 ml/L であった。また, FBRM 解析によって, PFASC は良好なサイズ (35 μm 以上)のフロックを形成することがわかった。フロック個数については, PAC と PFC 注入後に形成されるフロックが約 2800 個と 3300 個であるのに対して, PFASC 添加後に形成されるフロックは約 12000 個であった。GC-MS 分析では、廃水中に含まれる有機物は 66 種類であったが、凝集剤にPFASC を用いた場合、処理水中に含まれる有機物は 54 種類に減少した。除去された 12 種類の有機物は、分子量の大きな有機物であることがわかった。以上のことから、廃水処理に PFASC を用いることで凝集性が向上し、高い COD 除去率と色度除去率が得られることが明らかとなった。

(3) GIS を利用した原単位法による四万十川流域の全窒素 (TN) 排出負荷量の推定 小谷 英司

森林応用研究, 12, 99-107 (2003).

レビュー:三浦 直人

四万十川では、森林が河川の水質に影響を与える可能性がある。また、支流である広見川や畜産排水が流入することによる四万十川への影響も懸念される。そのため、森林や人為的活動などが河川に及ぼす影響を調査する必要がある。そこで本研究では、四万十川への負荷要因と流域ごとの負荷要因の特性を調査した。対象流域は四万十川の上流である梼原川流域、家地川ダム集水域、支流である広見川流域、唯一水質と水量の観測が行われている具同集水域、および四万十川全流域とした。家地川ダムの四万十川に流出する水量を GIS によって推定した。また、GIS を用いた原単位法によって、推定対象流域における生活排水、工場排水、畜産排水および農地(田、畑、果樹園)と森林の全窒素(TN)排出負荷量を推定し、河川への負荷要因を分析した。さらに、水質および水量のデータから算出した流達負荷量を TN 排出負荷量と比較した。

家地川ダムにおける流入水の64.9%が四万十川本流に流入した。また,原単位法によって,四万 十川全流域の TN 排出負荷量は、4.9 ton/day と推定された。TN 排出負荷量の割合は、それぞれ面 源負荷量 (森林 43%, 農地 14%), 畜産排水 (27%), 生活排水 (14%), 工場排水 (2%) であった。 支流域の TN 排出負荷量は, 梼原川流域, 家地川ダム集水域, 広見川流域, および具同集水域にお いて, それぞれ 0.67 ton/day, 1.0 ton/day, 1.4 ton/day, および 4.0 ton/day と推定された。梼原川流 域では、森林負荷の割合が 73%であった。また、家地川ダム集水域では、畜産排水負荷の割合が 60%を占めた。さらに、広見川流域では、農地負荷の割合が 24%であり、他の流域と比較して高 い値を示した。家地川ダム集水域、梼原川流域、広見川流域、および具同集水域における単位面 積当たりの排出負荷量を推定したところ、四万十川全流域に対して、それぞれ 1.2 倍、0.7 倍、1.7 倍,および1.0倍であった。また、TNの平均濃度は、広見川、広見川が合流する前の四万十川本 流, 広見川と四万十川本流が合流した地点において, それぞれ 0.56 mg/L, 0.26 mg/L, および 0.34 mg/L であった。このことから、広見川は、四万十川の水質に対して大きな影響を与えていないこ とがわかった。また、流量と流達負荷量の関係から算出された具同集水域における 4 年間の平均 TN 流達量は 4.66 ton/day であり、推定した TN 排出負荷量と比較して、同程度であった。以上の ことから、中流域および大流域の河川において、窒素負荷量を簡略に推定する場合に、GIS を用 いた原単位法は、十分に有効であることが明らかになった。

第 321 回雑誌会

(Aug.23rd,2019)

(1) Diversity and abundance of bacterial pathogens in urban rivers impacted by domestic sewage

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

Environmental Pollution, **249**, 24-35 (2019).

Reviewed by H. Shimizu

都市河川などの水環境に存在している病原微生物を原因とする感染症が問題となっている。そのため、水環境中の病原微生物による感染症のリスクを調査することは、非常に重要である。しかしながら、都市河川に存在する病原細菌の多様性と分布に関する情報は非常に少ない。そこで本研究では、都市河川と下水処理施設から採取した水試料について、NGS 法によって病原細菌の多様性を調べた。また、qPCR 法によって 13 種類の病原細菌の特異遺伝子を定量後、環境因子との関係を調査した。調査は 2016 年 4 月から 5 月において、中国の常州市に位置する 15 の都市河川と 2 つの下水処理施設(流入水と処理水をそれぞれ 1 試料ずつ)を対象に、合計 19 の水試料を採取した。DNA 抽出後、16S rRNA を標的とした NGS 法によって遺伝子解析を行った。次に、16S rRNA 遺伝子と 2 つの FIB (E. coli、Enterococcus faecalis)、3 つの腸内病原体(Salmonella、Campylobacter jejuni、Arcobacter cryaerophilus)、および 7 つの環境病原体(Acinetobacter johnsonii、A. lwoffii、Aeromonas spp.、Legionella pneumophila、Mycobacterium avium、Pseudomonas aeruginosa、Staphylococcus aureus)の特異遺伝子を qPCR 法によって定量した。さらに、相関分析によって環境要因との関係を明らかにした。

NGS 法で遺伝子解析を行った結果,75の病原細菌属と49の病原細菌種が検出された。下水流入水試料と処理水試料の病原細菌種の相対存在割合は、それぞれ8.30~9.73%と1.17~1.51%であり、A. cryaerophilus, A. butzleri、および Bacteroides spp.が主要な細菌種であった。また、都市河川水試料の病原細菌種の相対存在割合は、0.50~6.39%であり、主要な細菌種は、A. cryaerophilus, A. butzleri、Bacteroides spp., P. aeruginosa, A. johnsonii、および A. lwoffiiであった。特異遺伝子を測定すると、A. johnsonii、A. lwoffii、および Aeromonas spp.の特異遺伝子が全試料中から検出され、濃度の中央値はそれぞれ5.77-log10(copies/100 mL)、5.75-log10(copies/100 mL)、および5.13-log10(copies/100 mL)であった。さらに、病原細菌と環境因子の関係を評価したところ、A. johnsonii、A. lwoffii、および Aeromonas spp.は、それぞれ可溶性全リン(DTP)と溶存有機炭素(DOC)、DOCとSS、および NH3-Nと DTP に対して正の相関を示した。以上のことから、NGS 法と qPCR 法を用いることによって、水環境中における病原細菌の存在状況を包括的に把握することが可能である。

第 322 回雑誌会

(Aug.30th,2019)

(1) 焼却施設内たい積物の鉱物同定

原 雄, 半野 勝正, 依田 彦太郎, 根本 久志 廃棄物学会論文誌, **15**, 131-138 (2004).

レビュー:中野 里茄子

焼却施設内に堆積している焼却由来の物質は、ダイオキシン類によって汚染されている。また、焼却由来の物質には有害な金属類が高濃度で含まれている可能性が高い。そのため、焼却施設の改修や解体により発生する廃棄物の適正な処理が義務付けられている。しかしながら、堆積物の成分に関する情報はほとんどないため、適切な処理方法を選択することが困難である。本研究では、既設焼却施設の改修工事に伴って除去された堆積物について、鉱物種および化学種の同定を行った。試料は、千葉県に位置する東総塵芥処理組合焼却施設内で発生した堆積物を用いた。堆積物の種類は、排ガス処理施設の改修に際して取り除かれた焼却主灰(No. 0)、ガス冷却塔内堆積物(No. 1)、冷却塔出口付近ダクト内堆積物(No. 2)、電気集じん機入り口付近ダクト内堆積物(No. 3)、電気集じん灰(No. 4)、および誘引送風機内堆積物(No. 5)である。エネルギー分散型蛍光 X 線分析(EDXRF)装置を用いて、試料を構成する元素の定性定量分析を行った。また、粉末 X 線解析法 (XRPD) によって、鉱物種および化学種の同定を行った。さらに、熱分析法 (TG-DTA) によって、発熱、吸熱による基準物質に対する試料の重量変化および温度差の測定から、鉱物種および化学種の同定を行った。

元素分析の結果,全ての試料において Si, Ti, V, Al, Fe, Mn, Mg, Ca, Na, K, S, P, Cl, Br, Cu, Zu, Pbの 17 元素を検出した。また,No. 1~5の5 試料において,SiO2,TiO2,Al2O3,Fe2O3,P2O5の濃度は,焼却炉から離れるにしたがって減少したが,Cl の濃度は増加した。XRPD解析によって,全ての試料において岩塩と方解石,No. 0~No. 5 においてカリ岩塩と硬石膏,No. 0~4 において黄長石と石英,No. 0~No. 2 において灰長石と赤鉄鉱,No. 0 と No. 4 において石灰岩,そして,No. 4 のみからポルトランダイト,CaClOH および Ca(ClO)2・4H2O が同定された。さらに,熱分析法の結果から,No. 1,2,3,5 において CaSO4・0.5H2O もしくは CaSO4・0.62H2O,No. 0 においてハイドロカルマイト,No. 0,1,4,5 において方解石,No. 4 のみからポルトランダイト,CaClOH が同定されたポルトランダイト,CaClOH が同定された。電気集じん灰である No. 4 のみから同定されたポルトランダイト(Ca(OH)2)は,電気集じん機内の酸性ガスを中和するために吹き込まれたものである。Ca(OH)2 は,HCl と反応し,CaClOH および Ca(ClO)2・4H2O を生成することがわかった。

(2) A new adsorption-elution technique for the concentration of aquatic extracellular antibiotic resistance genes from large volumes of water

Wang, D., Liu, L., Qiu, Z., Shen, Z., Guo, X., Yang, D., Li, J., Liu, W. and Jin, M. Water Research, **92**, 188-198 (2016).

Reviewed by M. Katafuchi

細胞外薬剤耐性遺伝子(eARGs)は、環境中の菌に薬剤耐性を付与する可能性があるため、そのリスクを評価する必要がある。しかしながら、eARGsは水中に低濃度で存在するため、PCR法で検出することが困難である。そこで本研究では、拡散吸着分子(NAAP)を用いて、水試料から eARGs を濃縮し、除去するための最適な条件を検討した。まず、eARGsを添加した脱イオン水 10 L を作成し、通水量、溶出液、および沈殿時間を変化させることによって、NAAPの操作条件を検討した。次に、脱イオン水中のpH、CODMn、従属栄養細菌(HPC)濃度、水温、濁度、ウイルス濃度、および eDNA 濃度を変化させることによって、脱イオン水の水質が eARGs回収率に及ぼす影響を検討した。続いて、eARGsの形態と濃度をそれぞれ変化させることによって、脱イオン水中の eARGsの状態が eARGs回収率に及ぼす影響を検討した。さらに、天然水試料に eARGs を添加し、同様に eARGs を濃縮・回収し、脱イオン水の処理性と比較した。天然水試料は、中国の異なる6つの水試料(海河河川水、飲料水用原水、井戸水、金河川水、団泊湖水、雲橋貯水池水)をそれぞれ1回につき10 L、合計3回ずつ採取した。

eARGs を脱イオン水の平均通水量が 50 ml/min を下回った場合,eARGs の回収率は 95%以上 となった。また,試験に使用した溶出液のうち,グリシン($0.05 \, \mathrm{mol/L}$)と $3 \times \mathrm{broth} \, \epsilon$ 含んだも のが 95%と最も高い回収率を示した。さらに,溶出した eARGs を室温で 16 時間以上沈殿させた 場合,95%の回収率となった。これまでの条件を整理すると,eARGs の回収率が 95%以上とな る脱イオン水の条件は次のとおりである:pH6~9 の範囲,COD_{Mn} 値 11.32(mg-O₂/L)以下,濁度 13.7 NTU 以下,ウイルス濃度 10° PFU/L 以下,eDNA 濃度 $40 \, \mathrm{ng/L}$ 以下。この条件において,水温,HPC 濃度は eARGs 回収率に影響を及ぼさなかった。また,プラスミドと染色体に存在する eARGs は、どちらも 95%以上の回収率となった。脱イオン水の eARGs 濃度が $10^{2} \sim 10^{\circ}$ copies/L の範囲では,eARGs 回収率は 95%を超えたが, $10^{2} \, \mathrm{copies/L}$ 未満の場合,eARGs は検出 されなかった。天然水試料について調べたところ,eARGs 回収率はすべての試料について 95% 以上となった。以上のことから,NAAP を用いることによって,水試料中の eARGs を効率的に 濃縮し,回収できることが明らかとなった。

第323回雑誌会

(Sep.26,2019)

(1)鳥取砂丘海岸に生息する好砂海生菌の多様性と生態

藤原 沙耶,遠藤 直樹,早乙女 梢,前川 二太郎,中桐 昭 日菌報,**59**,25-37 (2018).

レビュー:高田 悠介

沿岸の砂浜には、砂地を好む好砂海生菌が生息している。好砂海生菌は、砂浜に打ち上げられた流木や海藻などを分解する役割を持ち、沿岸生態系において重要な役割を果たしている。しかしながら、好砂海生菌に限らず、海生菌に関する知見は不足している。そこで本研究では、鳥取砂丘の海岸に生息する好砂海生菌を対象に、多様性と生態を調査した。調査は、2015年4月から2018年1月において、鳥取砂丘オアシス広場周辺の海岸で実施した。試料は、汀線付近に形成される海泡を採取した。また、砂浜を前浜、中浜、後浜と区分して、3区間ごとに打ち上げられた流木(材・ヨシ)、海藻、羽毛、および海砂を採取した。試料採取後、海泡の胞子の形態観察を行い、海生菌における種の同定と単胞子分離を行った。さらに、種ごとの胞子数と確認した総胞子数から、胞子出現頻度を算出し、胞子の形成における季節的な消長を調査した。次に、生育温度試験によって、種ごとの温度特性の違いについて検討した。その後、単胞子分離した株を用いて、子実体形成試験を行った。また、菌種ごとの基質資化性を資化性試験によって調査した。基質は木材、海藻、羽毛、海洋汚染の原因となる重油類を想定して行った。採取した流木(材・ヨシ)、海藻、羽毛、および海砂の子実体形成を観察し、海生菌の種を同定した。その後、変温変光下の屋内で約9か月間培養した。

海泡中における海生菌の同定結果から、計 13 属 22 種 (子嚢菌: 12 属 21 種、担子菌: 1 属 1 種) の胞子が確認された。確認された海生菌の多くは、日本海沿岸域で確認された種と一致した。確認された海生菌のうち 9 属 15 種の海生菌は、季節よって出現傾向が異なり、通年型、温暖型、寒冷型に類別された。生育温度試験の結果から、通年型は 15-35℃の幅広い温度域で良好な生長を示した。または、温暖型は 20-35℃、寒冷型は 10-15℃の温度域で良好な生長を示した。各種基質の資化性について、Ar. trifurcatu は木材基質、Ast. cruciatus、C. angusta、C. gracilis は海藻基質を主な炭素源として利用していた。さらに、C. maritima は様々な基質を栄養源とする種であることがわかった。基質と海砂から同定された海生菌を培養した結果、5 属 10 種の海生菌の子実体、子嚢胞子、または分生子の形成が確認され、子実体形成頻度が各種基質と採取された区間で異なることが明らかとなった。以上のことから気温、土地の傾向、および基質嗜好性の違いによって、海浜に生息する好砂海生菌の種多様性に影響を与えると考えられた。

(2) Modelling macroinvertebrate and fish biotic indices: From reaches to entire river networks

Alvarez-Cabria, M., González-Ferreras, A, M., Peñas, F. J. and Barquín, J. Science of the Total Environment, **577**, 308–318 (2017).

Reviewed by M. Utsunomiya

近年、さまざまな人為的要因が河川生態系に影響を及ぼし、生物群集の構造と組成を変化させている。そのため、人為的要因が水質や河川生態系に及ぼす影響を評価することは重要である。そこで本研究では、大型無脊椎動物と魚類に関する生物指標をモデル化して、河川生態系への人為的影響について評価した。研究対象河川は、スペイン北東部を流れる河川とした。大型無脊椎動物と魚のサンプルは、キックハンドネット(φ =0.5 mm)とエレクトロフィッシング技術を用いて、2003 年から 2009 年の夏(7 月~10 月)に採取した。自然及び人為的要因に関連した 19 項目の環境変数(e.g.、平均年間気温、平均年間硝酸濃度)を予測変数として、ランダムフォレストを用いて大型無脊椎動物群集による 3 種類の水質・水文学的変化の評価指標(IASPT、EPT、LIFE)をモデル化した。同様に、22 項目の環境変数を予測変数として、魚類全体の存在量に対するサケ科の存在量の割合をモデル化した。さらに、4 つのモデルと各予測変数間の関係と各変数によって引き起こされる変化を部分依存グラフで表現した。また、各モデルの予測変数の重要性を定義するために、IncNodePurity 指標を用いて、各モデルを予測する上で重要な変数を決定した。

各モデルを予測する最も重要な3変数を評価した結果、IASPT と LIFE のモデルでは、平均年間 硝酸塩濃度および水生植生指標において負の相関を示し、流速において正の相関が確認された。 特に、平均年間硝酸塩濃度が4mg/Lを超えると、IASPT 値は顕著に減少した。EPT のモデルでは、平均年間硝酸塩濃度、水生植生指標、および平均年間水温において負の相関を示した。特に、平均年間水温が12℃を超えると、EPT 値は顕著に減少した。サケ科の生物量の割合におけるモデルでは、平均年間硝酸塩濃度と平均年間水温において負の相関を示し、流速において正の相関が確認された。特に、平均年間硝酸塩濃度が4mg/Lを超えると、サケ科の相対存在量が顕著に減少した。以上の結果と調査地域の上流に農地があることを踏まえると、人為的要因としての硝酸塩濃度の変動が河川生態系に影響することが示唆された。さらに、大型無脊椎動物とサケ科の群集構造は、主に水理・化学的条件(硝酸塩濃度と水温)と物理的生息場特性(流速と水生植物)によって形成されていることが示唆された。また、本研究で構築したモデルは、人為的要因が河川生態系に及ぼす影響を評価する有用なツールとなり得る。

第324回雑誌会

(Oct.4th,2019)

(1) Clearing muddied waters: Capture of environmental DNA from turbid waters

Williams, E, K., Huyvaert, P, K. and Piaggio, J, A.

PLOS ONE, 12 (7): e0179282. (2017).

Reviewed by S. Fukagawa

環境 DNA (eDNA) は生物多様性の評価や侵略的な種の検出・監視において効果的な方法である。しかし、濁水中における eDNA の検出は、フミン質等の PCR 阻害物質により困難なのが現状である。そこで本研究では、世界的に侵襲性の高い野生のブタを対象として、濁水からの eDNA 検出において最適な実験手順を提案することを目的とした。試料水として、雌の野生のブタを暴露した浴槽の濁水 2 L を用いた。eDNA の濃縮方法として、酢酸ナトリウム/エタノール沈殿、遠心分離、樹脂ビーズによる 3 手法を比較した。eDNA の抽出方法として、MagMAX-96 AI/ND Viral RNA 抽出キット、QIAamp DNA Micro キット、CTAB(セチルトリメチルアンモニウムブロミド)プロトコル、DNeasy mericon Food キット、および PowerBiofilm®DNA 分離キットの計 5 手法間の処理性を比較した。プライマーは、101 塩基対(bp)のイノシシ(NC00845、BLAST)のミトコンドリア D ループ領域のフラグメントを標的として、AlleleID(ver.7.0; Premier Biosoft)を使用して設計した。プライマーの特異性は、BLAST 検索によって評価した。その後、阻害物質除去(IRT)カラム(Zymo Research、Irvine、California、USA)を用い、従来の PCR(cPCR)と定量 PCR(qPCR)における eDNA 増幅の感度を比較した。eDNA の希釈系列は、10-1から 10-4に設定した。

濁水からの eDNA の検出確率は、濃縮を遠心分離、抽出を DNeasy mericon Food キットで行い、阻害物質除去は IRT カラム、eDNA 増幅に qPCR を用いる組み合わせにおいて、最高確率 p=0.70 が得られた。これは、遠心分離による濃縮方法は、目詰まりによる影響が無いことが理由と推察される。 IRT カラムの使用有無を比較すると、無しの場合 p=0.10、有りの場合 p=0.70 であり、濁水からの高確度な eDNA 検出に重要な工程であると考えられる。eDNA 増幅感度については、cPCR では 10^{-1} 希釈において p=0.10 未満を示し、感度が失われた。その一方で、qPCR では 10^{-2} 希釈まで p=1.00 を維持した。このことから、低濃度の eDNA 検出には、cPCR よりも qPCR による増幅が適していると考えられる。また、これら一連の手続きは 1 日以内に完了するため、eDNA 手法によって、野生のブタが農業や自然生態系へ影響を及ぼす前に、過剰な増加を防ぐための迅速な対応が可能となる。

第325回雑誌会

(Oct. 18, 2019)

(1) Impacts of climate change on streamflows under RCP scenarios: A case study in Xin River Basin, China

Zhanga, Y., You, Q., Chen, C. and Ge, J.

Atmospheric Research, 178-179, 521-534 (2016).

Reviewed by Y. Tanimura

近年の気候変動により複雑化した気象条件は、河川の流況に影響を及ぼしている。中国最大の淡水湖である八陽湖流域においても洪水や干ばつが頻繁に起こっている。そのため、気候変動が水文学的プロセスに及ぼす潜在的な影響を正確に評価することは重要である。そこで本研究では、八陽湖流域の北東部に位置する信江流域 (XRB) を対象に、統計的ダウンスケーリング法 (SDSM) と SWAT モデルを使用して、気候変動シナリオ下の河川流況の分析を行った。気温と降水量データは、SDSM により、代表濃度経路 (RCP) シナリオ下で3つの GCM (BBC-CSM1.1、CanESM2、NorESM1-M) から取得した。シナリオは RCP2.6、RCP4.5、および RCP8.5 の3つの将来期間 (2010年-2039年、2040年-2069年、2070年-2099年)で比較した。また、気象メッシュデータ(1961年-2013年)は、中国気象局のデータを取得し、SDSM を適用した。さらに、SDSM 適用後の気候データを用いて SWAT モデルによる流出解析を行い、気候変動が流況に与える影響を評価した。

ダウンスケール法適用後の将来気候をみると、気温は今後も増加し続け、毎年4月から6月にかけて著しく増加する結果となった。一方、降水量はさらに複雑になり、不確実な要素が多く見られた。また、BBC-CSM1.1と NorESM1-M の年間降水量は明瞭に増加するが、CanESM2の年間降水量は減少することが予測された。また、RCP2.6と RCP4.5では、平均降水量はわずかな増加傾向を示し、RCP8.5では世紀の半ばから後半にかけて大幅な増加を示した。流況に関しては、BBC-CSM1.1と CanESM2において雨季に流量が増加したが、NorESM1-Mでは比較的安定していた。さらに、RCP2.6と RCP4.5での将来の河川流量は、現在の河川流量と比較して、差が小さいことが示された。一方で、RCP8.5では河川流量が劇的な増加を示した。しかし、季節性、地形、および局所的な気候の複雑性の特徴に起因して SDSMの適切な予測変数の組み合わせを選択することが困難であることや、SWATモデルがサブ流域における流量の空間変動を正確に再現できないことに起因して、流量の将来予測は不確実性を示した。また、河川流況は水利施設や貯水池の運営などの人為的活動の影響も受ける。よって、気候変動による河川流域への影響をより正確に評価するためには、モデルの精緻化のみならず、気候変動が地域の流域管理に与える影響を考慮することが必要である。

(2) 霞ヶ浦底泥における脱窒速度の水平・垂直分布と窒素除去量の推定

北村 立実, 渡邊 圭司, 吉尾 卓宏, 戸田 任重, 内海 真生, 黒田 久雄 水環境学会誌, **41**(6), 213-221 (2018).

レビュー:三浦 直人

底泥は窒素等の栄養塩を溶出するため、汚濁負荷源の一つと考えられている。一方で、脱窒現象によって窒素を除去している側面もある。霞ヶ浦において、脱窒活性をもとに推計した脱窒速度と脱窒量の関係性について報告されている。しかしながら、脱窒活性を行っていない状態での脱窒速度を求めた例は少ない。そこで本研究では、霞ヶ浦全域の底泥を採取し、脱窒活性を行っていない状態における脱窒速度を求め、季節変動や底泥鉛直方向の特徴を調査した。さらに、霞ヶ浦全域における底泥の脱窒量を算出した。調査は、2011年8月~2012年8月において、霞ヶ浦の流入河川である桜川、恋瀬川、および鉾田川の下流3地点と、西浦6地点、北浦5地点で行った。採水は毎月1回、採泥は2か月に1回行った。採泥に関して、ゆ70mm×500mmのアクリルコアパイプを用いて実施した。底泥を遠心分離することで、間隙水を抽出した。河川水と湖水の水質分析項目は、溶存酸素(DO)および硝酸態窒素(NO3-N)とした。底泥における間隙水の水質分析項目は、NO3-N、亜硝酸態窒素(NO2-N)、アンモニア態窒素(NH4-N)、および溶存態有機物(DOC)とした。また、脱窒速度はアセチレン阻害法によって測定した。

各水質項目を測定した結果,DO 濃度は夏季に低く,冬季に高くなった。NO3-N 濃度は,流入河川と湖内において夏季に低く,秋季から冬季にかけて高くなった。また,湖の上流から下流に行くにしたがって低下した。これは湖水の希釈や底泥等の脱窒などによって,NO3-N が消費されたことが原因であると考えられた。底泥の間隙水の NO3-N 濃度は、多くの地点で 0.1 mg/L 未満であった。また,NH4-N 濃度や DOC 濃度は、霞ヶ浦全域において高濃度で分布した。底泥から算出した脱窒速度は、北浦の河川流入部や上流で大きく、下流に行くにしたがって小さくなった。また、水温が高い夏季において高い値を示した。鉛直方向の脱窒速度は、0~1 cm の層において 0~79.2 mg-N/m²·d の範囲であった。しかしながら、1~2 cm、2~5 cm の層では 0~0.5 mg-N/m²·d と極端に減少した。一日当たりの脱窒量は、西浦全域で 638 kg-N/d、北浦全域で 325 kg-N/d と推定された。また、流入負荷に対する窒素除去率は西浦で 5%、北浦で 6%となった。既往の研究では、西浦における合流前の地点で、脱窒量は 27 mg-N/m²·d、窒素除去率は 12~16%と見積もられている。しかしながら、本研究での脱窒量は 6.8 mg-N/m²·d、除去率は 2.8%であった。以上のことから、現場の脱窒速度と脱窒量は、脱窒活性をもとにした場合より小さい値を示すことがわかった。

(3) Mechanism studies of a CO₂ participant softening pretreatment process for seawater desalination

Zhao, Y., Cao, H., Xie, Y., Yuan, J., Ji, Z. and Yan Z. Desalination, **393**, 166-173 (2016).

Reviewed by T. Yadai

膜処理における海水中のカルシウムイオン(Ca^{2+})とマグネシウムイオン(Mg^{2+})の除去は,膜の無機物汚染を防ぎ,膜の取り換え回数,運転費,および管理費を減少させる。しかしながら,海水に軟化処理を用いた文献は少ない。そこで本研究では,水酸化ナトリウム(NaOH)と二酸化炭素(CO_2)を用いた軟化処理を行うことによって, Ca^{2+} と Mg^{2+} を除去することを目的とした。試料は,塩化カルシウム($CaCl_2$)と塩化マグネシウム($MgCl_2$)を蒸留水に溶解させたものを用いた。試料水に NaOH を添加し,10 分間撹拌させた後,スパージャーによって CO_2 を注入した。その後,一定時間静置させ,上澄み水を採取した。処理水中の Ca^{2+} と Mg^{2+} の濃度は,EDTA 滴定によって測定した。また,炭酸イオン(CO_3^{2-}),炭酸水素イオン(HCO_3^{2-}),および水酸化物イオン(CO_3^{1-})の濃度は,酸滴定によって測定した。さらに,実験で発生した沈殿物の解析には X 線回折(XRD)を用いた。

試料水 250 mL に NaOH を 2.5 g 添加し、10 分間撹拌させた直後の Mg^{2+} の濃度は 0 g/L となった。一方, Ca^{2+} の濃度は 0.36 g/L から 0.18 g/L に半減した。その後, CO_2 を 100 mL 注入したとき, Ca^{2+} の濃度は 0 g/L となった。 CO_2 を注入し続けると,水酸化マグネシウム $Mg(OH)_2$ が溶解し, Mg^{2+} の濃度は初期濃度に近づいた。XRD 解析の結果, CO_2 を注入し続けると, $Mg(OH)_2$ と水酸化カルシウム($Ca(OH)_2$)のピーク強度が弱くなることがわかった。 CO_2 を 800 mL 注入した場合, $Mg(OH)_2$ と $Ca(OH)_2$ は完全に溶解し,炭酸カルシウム($CaCO_3$)とネスケホン石が析出した。また, CO_2 を 1800 mL 注入した場合,ネスケホン石が溶解して $CaCO_3$ のみが析出した。OH の濃度は, CO_2 を 400 ml 注入した時に 0 g/L となった。さらに, CO_2 を注入し続けると, HCO_3 の濃度は増加し, CO_3 の濃度は減少することがわかった。また, Mg^{2+} の濃度が 0 g/L となる NaOH 添加量の限界値は 1.0 g であった。NaOH 1.0 g を添加した後に, CO_2 を注入すると,初めは Ca^{2+} の濃度は大幅に減少するが, CO_2 を注入し続けると,徐々に濃度が増加した。 Mg^{2+} の濃度は $Mg(OH)_2$ が溶解することにより急速に増加し,初期濃度付近に近づいた。また,XRD 解析の結果,NaOH 添加量が 1.0g の条件では,ネスケホン石が発生しなかった。以上のことから, CO_2 を沈殿剤として用いて Ca^{2+} と Mg^{2+} を除去する際には,アルカリ剤の添加量を調整することが重要である。

第326回雑誌会

(Oct. 25, 2019)

(1) Antimicrobial resistant *Escherichia coli* isolates detected in raw milk of livestock in pastoral areas of northern Kenya

Ngaywa, C., Aboge, O. T., Obiero, G., Omwenga, I., Ngwili, N., Wamwere, G., Wainaina, M. and Bett, B.

Food Control, 102, 173-178 (2019).

Reviewed by H. Hiroki

ケニア北部では泌乳動物を飼育しており、動物から得られる生乳や乳製品が主要な栄養源となる。しかしながら、ケニア北部では低温殺菌処理を行っていない生乳や乳製品が存在しており、食品安全上問題の生じる可能性がある。そこで本研究では、泌乳動物から得られた生乳における薬剤耐性菌の存在実態を調査した。また、薬剤耐性遺伝子(ARG)を検出した。調査は、2017年2月において、ケニア北部の一般家庭 76 世帯を対象とした。試料は、各世帯から3頭の泌乳動物を選択し、生乳をそれぞれ50 mL 採取した。また、家庭用容器に保存されている生乳を50 mL 採取した。試料を滅菌緩衝ペプトン水と混合し、37°Cで24時間培養した。培養後、エオシンメチレンブル一寒天培地を用いて、細菌を単離した。単離した細菌について、TSI 斜面培地、クエン酸塩斜面培地、および LIM 培地を用いた生化学的性状試験によって大腸菌を同定した。さらに、溶解性トランスグリコシラーゼ遺伝子を標的とするプライマーを設計し、PCR 法による大腸菌の再確認試験を行った。次に、大腸菌と同定された菌株について、11種類の抗菌薬に対する薬剤感受性試験をディスク拡散法によって実施した。さらに、カイ二乗検定によって、泌乳動物と家庭用容器の生乳における薬剤耐性菌の存在割合に関する有意差を確認した。また、テトラサイクリンおよびβ-ラクタム系抗菌薬に耐性を持つ大腸菌について PCR 法によって、ARG の存在を調査した。

合計 304 個の生乳試料から、大腸菌陽性コロニーが 13.8%(42/304 試料)単離された。また、生化学的性状試験と PCR 法による同定試験の結果、その全てが大腸菌であることがわかった。薬剤感受性試験の結果、95%(40/42 株)の大腸菌は 1 剤以上に耐性を示し、そのうち多剤耐性菌が6 株存在した。しかしながら、ナリジクス酸およびシプロフロキサシンに耐性を示す大腸菌は確認されなかった。統計解析によって、家庭用容器は泌乳動物よりも薬剤耐性大腸菌の検出率が有意に高いことが示された(p=0.008)。次に、PCR 法によって ARG を検出した結果、98%(41/42株)の大腸菌からテトラサイクリンおよびβ-ラクタム系抗菌薬に関する ARG が検出された。以上のことから、ケニア北部で消費される生乳や乳製品は、汚染されている可能性がある。本研究は、ケニア北部における薬剤耐性菌の管理において重要な情報となる。

第327回雑誌会

(Nov. 1, 2019)

(1) Diversity and antibiotic resistance among *Escherichia coli* populations in hospital and community wastewater compared to wastewater at the receiving urban treatment plant

Paulshus, E., Kühn, I., M€ollby, R., Colque, P., O'Sullivan, K., Midtvedt, T., Lingaas, E., Holmstad, R. and Sørum, H.

Water Research, 161, 232-241 (2019).

Reviewed by H. Xie

Antimicrobial resistance is an important and rapidly increasing global problem in both human and animal health care. Resistant bacteria are especially common in hospital environments where they can reach wastewater treatment plants (WWTP) through hospital wastewater. However, the further diversity of these bacteria is little known. The purpose of this study was to compare the diversities and the different antibiotic resistance levels in a hospital, a community, and in the total urban wastewater. Three sampling sites were selected to compare hospital effluents and non-hospital effluents. Hospital wastewater (HW) and community wastewater (CW) were collected from the outlet and urban wastewater collected from the inlet of the WWTP. Using the CHROMagar to cultivate *E. coli* which the pink to dark red colonies on the CHROMagar Orientation plates were regarded as presumptive *E. coli*. The phenotypes of *E. coli* colonies were analyzed by PhP-RE plates of the PhenePlate system and the resistant of *E. coli* were determined by Antibiotic Resistance Breakpoint (AREB) plates (PhPlate AB) of PhenePlate system. Antibiotics and final concentrations (mg/l) were ampicillin (32), cefotaxime (2), chloramphenicol (32), ciprofloxacin (4), gentamicin (16), nalidixic acid (32), cefpodoxime (3), tetracycline (16) and trimethoprim (16).

In total, 7862 pure *E. coli* from CHROMagar were subject to phenotyping and resistant determination. *E. coli* from CW samples were more diverse than those from HW samples, whilst *E. coli* in UW samples showed the highest diversity values. In total, 42% of all studied *E. coli* isolates were resistant to at least one of the nine antibiotics. HW isolates showed the highest rates of resistance to nine antibiotics, whilst the isolates from UW presented the lowest resistance rates. Only 53 of 7862 (0.7%) isolates were found to be simultaneously resistant to gentamicin and chloramphenicol. Multiple resistance to at least eight of the nine included antibiotics was found in only 73 isolates (0.9%). Extended beta-lactamase-producing *E. coli* (ESBL-EC) were more common in HW than in CW and UW. ESBL-EC in HW showed a lower diversity. Resistance to the ESBL-marking antibiotics cefotaxime and cefpodoxime showed the highest correlation (0.82).

(2) Antibiotic-resistance gene transfer in antibiotic-resistance bacteria under different light irradiation:Implications from oxidative stress and gene expression

Chen, X., Yin, H., Li, G., Wang, W., Wong, K, P., Zhao, H. and An, T. Water Research, **149**, 282-291 (2019).

Reviewed by S. Yano

薬剤耐性遺伝子(ARG)が拡散する要因に関心が集まっている。特に、光は日中の水中環境における腸内細菌に様々な影響を与える重要な要因の1つと考えられている。しかし、光が接合伝達頻度に与える影響、酸化ストレスを発生させるメカニズム、遺伝子発現を変化させるメカニズムに与える影響は解明されていない。そこで本研究では、異なる種類の光が水中環境におけるARG の接合伝達頻度と細菌ストレス条件に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。光は、可視光 (VL)、模擬太陽光 (SS)、および紫外線 (UV)の3つを用いた。そして、3つの光について、以下の4つの実験を実行した。①薬剤耐性菌(ARB)と薬剤感受性菌(ASB)の不活性化の調査をした。②細菌のストレス応答を調べるため、2'-7'dichlorofluorescin diacetate(DCFH-DA)を用いて細胞内の活性酸素種(ROS)を定量した。③RealTime-PCRを用いて、酸化ストレス、細胞修復、DNA 修復、および接合に関連する遺伝子を定量することで mRNA の発現を調べた。④ARGの接合伝達頻度を調査した。異なる光照射下での接合伝達頻度における有意差を一元配置分散分析(ANOVA)によって求めた。

①の結果では、VLにおいて不活性効果は確認されなかった。UV および SSにおいて細菌の不活性化が確認された。また、不活性化速度の差から ARBは、ASBよりも外部ストレスに対して耐性があることが確認された。②の結果では、VLにおいて ROS 濃度を変化させなかったことから、酸化ストレスは発生しなかったと考えられる。一方、UV および SSは、ROS 濃度を増加させ、細胞を損傷させた。また、ASBと比較して、ARBの方が細胞内の ROS 濃度が高かった。③の結果では、VL照射された遺伝子はわずかに減少した。SS照射中の ASB内における遺伝子は、減少したが、ARB内の遺伝子は増加した。UV照射中の ASB内の遺伝子が細胞の修復中に減少した。しかしながら、ARB内の遺伝子は増加した。④の結果では、VL照射中の接合伝達頻度が増加しなった。しかし、SSとUVにおいて、接合伝達頻度の増加が確認された。これは、細菌の受けたストレスと遺伝子の発現が関係していると考えられる。光による強い刺激およびストレスを細菌に与えることによって、高い遺伝子発現性と ARGの接合伝達頻度の増加に影響を及ぼしていた。これらの結果から、ARGの水平伝播は、UVによって促進することが示唆された。

第 328 回雑誌会

(Nov. 8, 2019)

(1) Modified biosand filters enriched with iron oxide coated gravel to remove chemical, organic and bacteriological contaminants

Sizirici, B., Yildiz, I., Alali, A., Alkhemeiri, A., Alkhoori, A., Bufalasa, F. and Alawadi, R.

Water Process Engineering, 27, 110-119 (2019).

Reviewed by M. Katafuchi

世界保健機関(WHO)の報告によると、世界中の 1 億 5900 万人が未処理の地表水を使用している。家庭で水を処理する方法として、修正バイオサンドフィルター(MBSF)を用いるものがある。しかしながら、現在 MBSF についての文献は少なく、MBSF の処理能力を評価するためには不十分である。そこで本研究では、MBSF に追加の吸着剤層として、酸化鉄被膜砂利(IOCG)を組み込み、従来の MBSF の通水結果と比較した。そして、MBSF の処理能力を調べるとともに、IOCG が汚染物質の除去率に及ぼす影響を検討した。試料水は、1 L の水道水に、1 ml の活性汚泥を添加し、Cu、Zn、Ni、Fe について、2 つの濃度区(2 mg/L および 5 mg/L)となるよう調整したものを用いた。通水前と通水後において、試料水の流量、DO、COD、TOC、大腸菌と大腸菌群の濃度、pH、電導度、濁度および金属濃度の変化を測定した。また、フィルターの再利用の可否を調べるため、フィルターを洗浄し、再度同様の条件で実験を行い、1 回目の結果と比較した。

平均流量は、従来の MBSF において 0.78 m/h, IOCG を組み込んだ MBSF (MBSF-IOCG) において 1.05 m/h であった。また、COD の平均除去率は、MBSF 通水後の水試料が 46.3%、MBSF-IOCG 通水後の試料水が 49.3%となった。TOC の平均除去率は、MBSF 通水後の水試料が 48.4%、MBSF-IOCG 通水後の試料水が 49.7%となった。さらに、大腸菌の平均除去率は、実験開始後 0 日目から 20 日目までは、MBSF 通水後の試料水が 49.8%、MBSF-IOCG 通水後の試料水が 61.0%であった。しかし、20 日目以降は MBSF 通水後の試料水の 94.2%、MBSF-IOCG 通水後の試料水の 95.3%が除去された。同様に、大腸菌群の平均除去率は、実験開始後 0 日目から 20 日目までは、MBSF 通水後の試料水が 94.2%、MBSF-IOCG 通水後の試料水の 95.4%となり、20 日目以降は MBSF 通水後の試料水が 95.4%となり、20 日目以降は MBSF 通水後と、MBSF-IOCG 通水後の試料水はいずれも 99%を上回った。DO、pH、電導度、濁度、金属濃度において、両フィルター間に大きな差は見られなかった。フィルター洗浄後の実験では、すべての項目で除去率の大きな変化は見られなかった。以上のことから、MBSF は水の前処理として効果的であり、また、MBSF の吸着材層として IOCG を組み込むことで、COD、TOC、大腸菌、大腸菌群、Cu および Ni の除去率をより向上できることが明らかになった。

第 329 回雑誌会

(Nov. 22, 2019)

(1) Fouling control in reverse osmosis membranes through modification with conductive carbon nanostructures

Ahmeda, F. E., Hashaikeha, R. and Hilala, N. Desalination, **470** (2019).

Reviewed by T. Yadai

Networked Cellulose (NC) は、カーボンナノチューブを組み込むことによって調製された導電性素材であり、逆浸透用のポリビニルアルコール(PVA)膜に使用されている。また、NCとカーボンナノストラクチャー (CNS)を併用することで、膜処理効率が向上し、電気分解による膜表面の洗浄が可能となる。そこで本研究では、PVA-NC-CNS の潜在的能力を検討することを目的とした。膜には、CNS 濃度が 0 wt%の PVA-NC-0CNS、3 wt%の PVA-NC-3CNS、5 wt%の PVA-NC-5CNS、および 7 wt%の PVA-NC-7CNS を用いた。膜の測定項目は、水和性、伸張性、熱耐性、塩除去性能、および電気洗浄能力とした。水和性は、接触角試験によって測定した。伸張性は、引張試験によって測定した。熱耐性は、熱重量分析と示差走査熱量測定によって測定した。また、膜の塩除去性能は、25,000 ppm の NaCl 溶液を膜に 60 分間通水した後、通水前後の塩分濃度を比較することによって評価した。さらに、膜の電気洗浄能力については、塩除去率が最も高かった膜にフミン酸を添加した後、NaCl 溶液を電解液として用い、7.5 mA の電流で電気洗浄を行った。その後、実体顕微鏡によって洗浄前後における膜の汚れを観察した。

水和性は、PVA-NC-0CNS の接触角が 58°であり、最も水和性が高いことがわかった。また、全ての膜において接触角は 80°以下の値を示した。引張強度とヤング率は、PVA-NC-7CNS において 42 Mpa と 18%で最も高く、PVA-NC-0CNS において 17 Mpa と 3%で最も低いことがわかった。伸脹率は、PVA-NC-3CNS が 200%となり、最も高かった。熱耐性は、温度が 205°C 以下の場合、全ての膜が分解されず性能を維持した。しかし、温度が 205°C 以上になると、膜中の水分が蒸発した後、PVA と NC が分解されることによって、質量が低下した。また、膜の融点は 223°C から 225°C の範囲であった。さらに、膜の塩除去性能については、PVA-NC-7CNS において、99.9%であった。そこで、塩除去率の最も高い PVA-NC-7CNS を電気洗浄能力の検討に用いた。実体顕微鏡で電気洗浄前後における膜の汚れを観察すると、膜の汚れが除去されていることがわかった。以上のことから、 CNS 濃度 7 wt%の PVA-NC を用いることによって、膜の処理能力を上昇させることができ、電気分解で膜を効率良く洗浄できることが実証された。

(2) Dissemination of antibiotic resistance genes (ARGs) by rainfall on a cyclic economic breeding livestock farm

Huang, L., Xu, Y., Xu, J., Ling, J., Zheng, L., Zhou, X. and Xie, G. International Biodeterioration & Biodegradation, 138, 114-121 (2019).

Reviewed by H. Hiroki

畜産場から発生する薬剤耐性遺伝子(ARGs)は、周辺の水環境における公衆衛生上の問題に繋がる。また、公衆衛生の向上を図るには、降雨による ARGs の拡散にも注目する必要がある。しかしながら、畜産場周辺の水環境における ARGs の存在実態とその季節変化に関する研究は少ない。そこで本研究では、養豚および養殖が行われている地域とその周辺の水環境を対象とし、ARGsの存在割合の季節変化を調査した。試料採取は、中国の中山市において乾季(3月~4月)と雨季(5月~10月)に実施した。中山市に位置する養豚場の排水とバイオガス消化槽の水を採取した。また、養豚場に隣接する2つの養殖場、小川、池、および3つの井戸から水を採取した。採取した水から高速液体クロマトグラフィータンデム質量分析(HPLC-MS)によって、テトラサイクリン(TC)とスルファニルアミド(SUL)の残留量を測定した。また、各水質項目(COD、pH、TP、NH4+-N)を測定した。次に、全試料から DNA 抽出後、 qPCR 法によって細菌の 16S rRNA、18 種類のテトラサイクリン耐性遺伝子、2 種類のスルホンアミド耐性遺伝子を定量した。さらに、ピアソンの相関係数によって、対象とした遺伝子量と各水質項目の関係、試料採取地点における相互関係を調査した。

3つの井戸において、sul2を除く全ての遺伝子が定量された。総 ARGs 濃度は、乾季(4.0×10^4 - 4.7×10^4 copies/mL)と比較して、雨季(4.0×10^5 - 5.1×10^5 copies/mL)の方が高かった。tetB の存在量は、他のテトラサイクリン耐性遺伝子の存在量と相関を示した。養豚排水、バイオガス消化槽の水、および池の水において、COD、TP、NH4 $^+$ -N、TC、SUL が高濃度で検出された。TC 濃度は、乾季(3.2- $7.2\,\mu$ g/kg)の方が雨季(2.5- $5.6\,\mu$ g/kg)よりも高かった。SUL 濃度についても、乾季(2.9- $5.6\,\mu$ g/kg)の方が雨季(2.9- $3.7\,\mu$ g/kg)よりも高かった。この結果は、降雨による希釈効果が原因と推察された。養殖場と小川において、全種類の ARGs が検出された。養殖場における ARGs の存在量は、乾季と比較して、雨季の方が 8.3 倍高かった。また、小川における ARGs の存在量は、乾季と比較して、雨季の方が 2.2 倍高かった。試料採取地点における ARGs 検出率の相関を調べた結果、井戸は養殖場および小川と相関があった。以上のことから、畜産場の ARGs は降雨によって移動し、周辺の水環境を汚染する原因となる。

(3) Microbial ecology of full-scale wastewater treatment systems in the Polar Arctic Circle: *Archaea, Bacteria* and *Fungi*

Gonzalez, M. A., Sihvonen, M., Muñoz, P. B., Rodriguez, S. A., Mikola, A. and Vahala, R. Scientific Reports, **8**, 2208 (2018).

Reviewed by H. Shimizu

現在,下水処理施設(WWTP)において,活性汚泥システムが広く用いられている。そのため,活性汚泥中の微生物群衆についての情報は,WWTP を運用していくうえで重要である。しかしながら,北極圏といった極端な運用条件の WWTP に存在する微生物群衆についての情報は少ない。そこで本研究では,WWTP から採取した水試料について NGS 法と qPCR 法によって古細菌,細菌,および真菌の微生物群衆の多様性を調べた。また,古細菌,細菌,および真菌と WWTP の運用条件における関係を調査した。調査は 2016 年 11 月下旬において,北極圏に位置する 7 つの WWTP を対象とした。試料は,各 WWTP の流入水とバイオリアクターから 1,000 mL ずつ採取した。各試料から DNA 抽出後,古細菌の 16S rRNA 遺伝子の V1-V3 領域,細菌の 16S rRNA 遺伝子の V4-V6 領域,および真菌の rRNA 遺伝子の ITS 領域を標的とした NGS 法によって遺伝子解析を行った。次に、古細菌と細菌の 16S rRNA 遺伝子,および真菌の 18S rRNA 遺伝子のコピー数を qPCR 法によって定量した。さらに、多変量冗長分析によって、古細菌、細菌、および真菌と WWTP の各水質項目に対する除去率や温度との関係を明らかにした。

NGS 法で遺伝子解析を行った結果、古細菌の主要な属として、Methanobrevibacter や Methanosarcina といったメタン生成古細菌が検出された。細菌の主要な属は、Trichococcus や Polaromonas であり、Methylorosula はバイオリアクターの処理温度が 3℃以下の WWTP において 優位に検出された。真菌の主要な科は、Trichosporonaceae であった。また、qPCR 法で定量した古細菌と細菌の 16S rRNA 遺伝子、および真菌の 18S rRNA 遺伝子のコピー数と除去性能との関係を評価した結果、古細菌は BOD、COD、リン、および SS の除去率と正の相関を示し、NH3-N(アンモニア態窒素)と窒素の除去率に対して負の相関を示した。真菌はすべての項目において負の相関を示し、細菌と除去性能との明確な相関は見られなかった。さらに、古細菌、細菌、および真菌の微生物群衆と温度との関係を評価した結果、古細菌の Methanobacteriaceae 科、細菌の Carnobacteriaceae 科と Leptotrichiaceae 科、および真菌の Trichosporonaceae 科が温度と正の相関を示した。以上のことから、NGS 法、qPCR 法、および多変量冗長分析を用いることによって WWTP に存在する古細菌、細菌、および真菌の微生物群衆構造を解明することが可能である。

第330回雑誌会

(Nov. 29, 2019)

(1) Antibiotic resistance of *E. coli* isolated from a constructed wetland dominated by a crow roost, with emphasis on ESBL and AmpC containing *E. coli*

Sen1, K., Berglund1, T., S., Marilia A., Babak, T., M., Khalil1, Y., Fridge, M., Lu, J. and Turner, R. J.

Frontiers in Microbiology, 1034, 2019.

Reviewed by H. Xie

Environment is increasingly regarded as a reservoir of antibiotic-resistant bacteria (ARB) and antibiotic-resistant genes (ARG). The overall antibiotic resistance pattern of the crow isolates was not reported. In this study, a constructed wetland inhabited by 15,000 crows was collected at the Bothell campus of the University of Washington to detect the presence of antibiotic-resistant *E. coli*. 61 crow fecal samples were collected between August 2014 and April 2015, and 20 water samples were collected altogether during this period. Altogether 98 isolates from the fecal samples and 184 isolates from the water samples were analyzed by the Disk Diffusion method with 13 antibiotics. All isolates that showed antibiotic resistance by phenotypic methods were tested for the respective genetic determinant. Strains that showed ESBL phenotype by the double disc method were tested for bla_{ctx-M} by a qPCR method. In addition, the q-PCR method was used to assign the phylo-group the *E. coli*. And finally, a total of 39 isolates, 23 fecal and 16 water were selected for Maximum Likelihood method (MLST).

Thus, the number of *E. coli* isolated from the crow habitat area is an order of magnitude higher than that of *E. coli* isolated from areas not directly affected by crow habitat. The 65% and 70% of the isolates from water and crow fecal samples, respectively, were resistant to one or more antibiotics. Multiple drug resistance was found in 40% of the water isolates as well as the crow fecal isolates. Only 2 ESBL of the 49 isolates were isolated from the water samples, and 9 of the 98 isolates carried ESBL among the fecal isolates. MLST types showed high diversity. Thirteen different sequence types (STs) were obtained for the fecal isolates and 10 for the water isolates. ST131 was the sequence type with the highest occurrence rate, and the second was ST58. All the ST131 isolates had the bla_{ctx-M} gene. The largest percentage of *E. coli* isolates from both crow fecal and surface water (37% in fecal and 39% in water) samples belonged to the non-pathogenic, commensal phylo-group B1, followed by the pathogenic B2 group. Therefore, crows are potential vectors for transmission of the multiple drug resistant strains (as well as non-virulent and non-AR ones) to various or further places during foraging, perching or migrating.

第331回雑誌会

(Des. 6, 2019)

(1) Prevalence of Arcobacter and Other Pathogenic Bacteria in River Water in Nepal

Shrestha, R. G., Tandukar, S., Bhandari, D., Sherchan, S. P., Tanaka, Y., Sherchand, J. B. and Haramoto, E.

Water, **11**(**7**), 1416 (2019).

Reviewed by H. Shimizu

水環境中に存在する病原細菌を原因とする水系感染症が、世界中で問題となっている。 Arcobacter は食品媒介病原体の一つであり、河川水中から高頻度で検出されることが報告されている。したがって、河川水中に存在する病原細菌の多様性の調査と Arcobacter の定量は重要である。そこで本研究では、ネパールの河川から採取した水試料を対象に、NGS 法によって病原細菌の多様性を調査した。また、qPCR 法によって Arcobacter の存在量を確認した。調査は、2015 年11 月から 2016 年 9 月において、ネパールに位置するバグマティ川を対象に行った。試料は、二カ月ごとに上流、中流、および下流の 3 地点から河川水試料を 100 mL ずつ採取した。各試料から DNA 抽出後、16S rRNA 遺伝子を標的とした NGS 法によって遺伝子解析を行った。次に、16S rRNA遺伝子と Arcobacter の特異遺伝子を qPCR 法によって定量した。さらに、相関分析によって、定量された Arcobacter の特異遺伝子と大腸菌、ヒトふん便マーカー(BK polyomaviruses、JC polyomaviruses、Human Bacteroidales)、および植物ウイルス(Tobacco mosaic virus、Pepper mild mottle virus)との関係を調査した。

NGS 法で遺伝子解析を行った結果、111 属の病原細菌が検出された。主要な病原細菌は Arcobacter, Acinetobacter, および Prevotella であった。その中でも Arcobacter は最も優位に検出され、その存在比(Arcobacter の OTU 数/検出された全病原細菌の OTU 数)は、上流、中流、および下流でそれぞれ 28.6%(n=1)、31.3±15.8%(n=6)、および 31.8±17.2%(n=6)の範囲であった。上流における Arcobacter の存在比が最も低いことから、中流と下流に比べて、上流域は人為的汚染の影響を受けていないことが示唆された。16S rRNA 遺伝子と Arcobacter の特異遺伝子を定量したところ、それぞれ $7.1\sim10.5$ \log_{10} copies/100 mL と $6.7\sim10.7$ \log_{10} copies/100 mL の濃度で検出された。相関分析を行ったところ、Arcobacter の特異遺伝子と大腸菌、ヒトふん便マーカーのBK polyomaviruses と Human Bacteroidales、および植物ウイルスの Pepper mild mottle virus と有意な正の相関を示した(<math>p<0.05)。以上のことから、NGS 法と qPCR 法を用いることによって、バグマティ川に存在する病原細菌の多様性および Arcobacter の定量を行うことが可能であった。今後は、公衆衛生の向上のためにも、バグマティ川における河川管理対策を講じる必要がある。

(2) Ceramic-Based Composite Membrane with a Porous Network Surface Featuring a Highly Stable Flux for Drinking Water Purification

Zhu, L., Rakesh, P. K., Xu, M. and Dong, Y. Membranes, **102**, 173-178 (2019).

Reviewed by M. Katafuchi

膜を用いて飲料水中から細菌を除去する技術は、その安定性や装置設計の柔軟性などの利点から、世界中で広く使用されている。特に、カーボンナノチューブ(CNT)を材料とした膜は、強力な抗菌活性や優れた吸着特性を示し、細菌の除去に効果的である。しかしながら、CNT 膜は強度が低く、膜の圧縮、変形、および破壊によって、ろ過性能が著しく低下することから、長時間のろ過処理には適さない。そこで本研究では、強度に優れたセラミック膜と CNT 膜を複合することで、CNT 膜の強度を高める方法を検討した。試料は、0.9%NaCl 溶液に、それぞれ大腸菌、黄色ブドウ球菌を懸濁させたものを用いた。懸濁させた大腸菌と黄色ブドウ球菌の濃度は、それぞれ 9.0×10⁷ bacteria/ml と 6.4×10⁶ bacteria/ml に調製した。ろ過実験は、0.1 MPa の膜貫通圧力下で、48時間行われた。膜透過流束は、2時間毎に記録した。次に、膜透過液について、LB 寒天培地を用いて細菌を培養し、プラーク形成単位(PFU)法に基づいて、膜透過液中の細菌の有無を調べた。また、複合膜の環境リスクを評価するため、膜透過液中の CNT 濃度、ならびに Ni と Al 金属濃度について、それぞれ走査電子顕微鏡(SEM)と誘導結合プラズマ質量分析(ICP-MS)を用いて測定した。最後に、複合膜の抗菌活性を評価するため、ろ過実験後、複合膜上の大腸菌と黄色ブドウ球菌をフローサイトメトリーで測定した。

大腸菌懸濁液の初期透過流束は 9.5 L/m²h, 黄色ブドウ球菌懸濁液の初期透過流束は 5.4 L/m²h であった。その後,流束は穏やかな減少傾向を示した。48 時間後の透過流束は,大腸菌懸濁液が 7.9 L/m²h, 黄色ブドウ球菌懸濁液が 4.4 L/m²h であった。また, PFU 法の結果,大腸菌と黄色ブドウ球菌は検出されず,細菌は 100%除去された。さらに,膜透過液中の CTN 濃度を測定した結果, CNT は検出されなかった。同様に膜透過液中の Ni と Al 金属濃度を測定した結果, Ni 金属濃度は検出されず, Al 金属濃度は 0.07 mg/L であった。金属濃度は,どちらも世界保健機関(WHO)の飲料水基準値を下回った。複合膜上の大腸菌と黄色ブドウ球菌は,どちらも細菌の不活化率が 1%未満であった。以上の結果から,セラミック膜と CNT 膜を複合することで,高いろ過性能を保持しつつ,CNT 膜の強度を高めることができた。しかしながら,CTN 膜本来の強力な抗菌活性は失われることがわかった。