

第 370 回雑誌会

(May. 11, 2022)

(1) *Escherichia coli* belonging to ST131 rarely transfers *bla*_{CTX-M-15} to fecal *Escherichia coli*

Thingholm, R. K., Hertz1, B. F., Løbner-Olesen, A., Frimodt-Møller, N., Nielsen, L. K.
Infection and Drug Resistance, **12**, 2429–2435, 2019.

Reviewed by H. Xie

大腸菌は健康なヒトの腸内細菌叢の一部であり、世界で超広範囲 β-ラクタマーゼ (ESBL) に対する耐性レベルが上昇中である。デンマークで報告された尿路感染症原因の調査では、配列型 ST131 に属する大腸菌が ESBL 産生菌の多くを占め、そのほとんどが血清型 O25 に属し、他の地域と同様に *bla*_{CTX-M-15} を最も多く保有していることが判明した。本研究では、DNA 接合伝播における制限修飾系 (R/M システム) の影響を検討した。また、健康なヒトの糞便叢から単離された大腸菌に対して、*bla*_{CTX-M-15} を有するプラスミドとの接合率を調べ、ST131 が他の大腸菌クローンと比較して ESBL 耐性獲得・供与の可能性が高いかどうかを明らかにすることを目的とした。接合伝播実験は、ドナー株とレシピエント株を LB ブロスで培養し、それぞれ 1:1 で混合した。100μL の混合菌液を滅菌フィルターで濾過し、5%血液寒天培地で 24 時間培養した。その後、フィルターを 0.9%食塩水に懸濁し、リファンピシン (100 mg/L) /ストレプトマイシン (100 mg/L)、アンピシリン (1000 mg/L) およびリファンピシン (100 mg/L) を含む寒天培地に複式スクリーニングした。さらに、ドナー1株 (Hvi15) とレシピエント3株 (KTE72, KTE144, KTE168) で、アンピシリン (0.75 mg/L) を含む寒天培地で、プラスミド導入実験を繰り返した。

本研究では、異なる *bla*_{CTX-M-15} を持つドナーからレシピエント株への接合能力を調べた結果、3つのドナーとも接合率は非常に低いことが示された。ドナー株 Hvi15 (O28/ST10) はレシピエント株と 10^{-7} ~ 10^{-10} の範囲で接合し、他の O 型および ST 型のレシピエント株に比べて、O25/ST131 (KTE49, Hvi138) ではレシピエント株の接合率が低かった。また、アンピシリンを加えた圧力下の条件では、レシピエント株 KTE72 (O2/ST141) への接合率が、アンピシリンを含まない場合に比べて 100 倍も高くなることがわかった。しかし、レシピエント株 KTE144 (O120/ST2797) および KTE168 (O2/ST141) にはその影響が見られなかった。レシピエント株のゲノム解析により、少なくとも 2 つの R/M システムを保有していたため、受容体における R/M システムの存在は、細菌接合に対する完全な防御にはならないことを示唆している。一方、すべての臨床糞便レシピエント株に R/M システムが存在するため、多くの接合は検出限界以下にとどまり、接合率は極めて低い可能性がある。

第 371 回雑誌会

(May. 24, 2022)

(1) Multiple antibiotics distribution in drinking water and their co-adsorption behaviors by different size fractions of natural particles

Peng, Z., Yuwei, Z., Limin, C., Yimei, T., Zhe, Z., Qiqi, Z. and Weigao, Z.

Science of the Total Environment, **775**, 145846 (2021).

Reviewed by Y. Ito

近年、飲料水中の天然粒子が抗菌薬を吸着することが注目されている。しかし、異なるサイズの粒子に極低濃度の複数の抗菌薬が吸着する挙動は明らかにされていない。そこで本研究では、浄水場における 17 種類の抗菌薬濃度の調査、ならびに天然粒子に対する 4 種類の抗菌薬 {ナリジクス酸 (NAL), トリメトプリム (TMP), ロキシスロマイシン (ROX), ペニシリン G カリウム塩 (PG)} の吸着実験を行った。浄水場の水試料は、天津 (中国) の浄水場の 4 地点 (流入原水, 凝集沈殿後のろ過前水, 砂ろ過後のろ過水, 塩素消毒後の最終放流水) から採取した。それぞれ 1 L の水試料を採取し、0.7 μm のガラス繊維フィルターでろ過した。その後、固相抽出を行い、HPLC-MS/MS を用いて抗菌薬を測定した。吸着実験では、浄水場の原水を 50 L から 1 L まで濃縮した試料 (天然粒子濃度 ; 0.01453 g/L) を用いた。始めに、4 種類の抗菌薬を 2 つ 1 組 (二成分系) にして、濃縮した 1 L の水試料に 1000 ng ずつ添加した。次に、水試料を遮光した状態で 300 rpm の速度で 25°C, 7 時間振とうさせた。続いて、振とうした試料を 1 μm のポリカーボネート膜でろ過し、1 μm 以上の粒子 (大粒子) を回収した。さらに、0.05 μm のフィルターを使用して、0.05~1 μm の粒子 (小粒子) を得た。回収した粒子は、抗菌薬検出の前にマイクロ波抽出を行った。ろ過後に残った溶液は、固相抽出で前処理した後、HPLC-MS/MS を用いて抗菌薬を測定した。また、比較のため、抗菌薬 1 種類 (単一成分系) でも同様に吸着実験を行った。

浄水場の原水、ろ過前、ろ過後、放流水の抗菌薬の濃度範囲は 0~69.24 ng/L であった。17 種類の抗菌薬の中では、チアンフェニコールが最も濃度が高く、次いでスルファメラジンが高かった。また、吸着実験の結果、吸着後の溶液中の抗菌薬濃度に対する全粒子への抗菌薬吸着量の比 (K_{p-w}) は、単一成分系では、1.13~1.78 であったが、二成分系では、0.57~0.84 であった。これは、抗菌薬二成分系では、抗菌薬間の競争と相乗効果によって、単一成分系と比較して水に溶ける割合は大きいことが示唆された。また、抗菌薬の大粒子への吸着量に対する小粒子への吸着量の比は 1 より大きく、1.07~1.61 の範囲となった。以上のことから、飲料水中の小粒子の存在は、抗菌薬の吸着に重要な役割を果たすことがわかった。また、単一成分系と比較して二成分系では、水相への抗菌薬の移行が多くなり、水環境中の抗菌薬のリスクを高めると考えられる。

第 372 回雑誌会

(Jun. 1, 2022)

(1) **Metagenomic profiling and transfer dynamics of antibiotic resistance determinants in a full-scale granular sludge wastewater treatment plant**

Calderon-Franco, D., Stella, R., Christou, S., Pronk, M., van Loosdrecht, M.C.M., Abeel, T. and Weissbrodt, D.G.

Water Research, **219**, 118571, (2022).

Reviewed by S.Tamai

下水処理場は公衆衛生を向上させ、水資源を保護する重要な役割を担っている。しかし、下水処理場には細菌、薬剤耐性遺伝子 (ARG), および抗菌薬が流入することから、薬剤耐性菌 (ARB) の拡散を防止する効果は不明である。下水処理場での ARB を対象とした研究では、これまで細胞内 DNA (iDNA) 中の ARG に焦点が当てられており、溶存遊離 DNA (exDNA) の存在は考慮されていない。そこで本研究では、排水中の iDNA と exDNA を回収し、その組成と挙動を追跡した。好気グラニュール汚泥処理を採用しているオランダの下水処理場を調査対象とし、①流入地点、②汚泥処理地点 (曝気前後を採取)、③処理水放流地点の 3 地点から 1 L の試料を採取した。試料中の exDNA は、0.45 μm 、および 0.2 μm のフィルターを用いてろ過した後、陰イオン交換カラムに通水して吸着させ、溶出バッファーによって回収した。回収した exDNA は、エタノール沈殿と Proteinase K 処理後、キットを用いて精製した。続いて、試料中の iDNA は、ろ過後のフィルターから、キットを用いて抽出を行った。その後、qPCR 法によって標的遺伝子の定量と、HiSeq sequencer を用いた遺伝子解析を行った。

シーケンシングの結果、iDNA と exDNA の両画分から 2548 属の細菌が同定された。同定された個体群のうち、*Acidovorax* (3.5%), *Rhodoferrax* (3.5%) などの薬剤耐性関連遺伝子を保有する細菌が高い割合で存在した。また、両画分から 2840 reads の ARG が検出された。最も多く検出された *aac-3* 遺伝子 (58 reads) は全 ARG の 2.0 % であり、exDNA 中には多様な ARG が存在した。放流水中から検出された 478 reads の ARG のうちの 89 % が exDNA 画分に存在した。このことから、exDNA は環境に拡散され、放流水域の細菌の形質転換を招く可能性がある。さらに、両画分から 55344 reads の可動遺伝因子 (MGE) が検出された。500bp 以上の contig (遺伝子解析で得られた遺伝子配列断片を繋ぎ合わせた遺伝子) に ARG と MGE の共局在解析を行ったところ、312 の contig 中に ARG と MGE が共局在していることが確認された。ARG と MGE の共局在は、細菌間の ARG の伝播を促進させる可能性が高いことを示している。以上のことから、環境中における薬剤耐性のサーベイランス、リスク評価には exDNA の考慮が必要である。

第 373 回雑誌会

(June. 22, 2022)

(1) Persistence of wastewater-associated antibiotic resistant bacteria in river microcosms

Mahaney P. A., and Franklin B. R.

Science of the Total Environment, **819**, 1, (2022)

Reviewed by Y Kato

水生生態系における薬剤耐性菌 (ARB) および薬剤耐性遺伝子 (ARG) の蔓延は、公衆衛生上の懸念事項となっている。これまで、処理済み、未処理の排水および河川などの受入水域から高濃度の ARB および ARG が発見されているが、排水後の受入水域における ARB の生残性と増殖についてはほとんど知られていない。そこで本研究では、河川内の土着細菌群集の生物学的相互作用による排水 ARB の増殖と生残性に及ぼす影響を検討した。河川水試料は、バージニア州リッチモンド市の中心部を流れるジェームズ川の上流から採取し、排水試料は、リッチモンド排水処理施設 (WWTF) から未処理排水と処理排水を採取した。河川水と排水を様々な組み合わせ (河川水のみ、河川水+排水、濾過滅菌河川水+排水) で混合し、シプロフロキサシン (CIP)、バクトリム (SMZ/TMP)、エリスロマイシン (INN) 耐性菌 (従属栄養細菌) の生存数について、72 時間モニタリングする一連の微小生態系実験 (マイクロコズム実験) を行った。従属栄養細菌は、 $t=0, 12h, 24h, 48h, 72h$ に 3 種類の抗菌薬をそれぞれ添加した R2A 寒天培地で培養・計数した。次に、従属栄養細菌については、生存数データ (CFU/mL) を用いて、各抗菌薬に対する薬剤耐性率 (%) を算出し、ARB の生残性を比較した。

河川のみの場合、河川内の土着微生物群集の存在数と薬剤耐性率は低く、CIP に対する耐性は 2%未満であり、SMZ/TMP (~5%) と INN (~8.5%) に対する耐性率は少し高かった。未処理排水を添加した場合、河川水+排水および濾過滅菌河川水+排水の組み合わせにおいて、3 種類の耐性菌における初期の菌数が有意に増加し ($p < 0.03$)、その中で INN 耐性菌が最も増加した。処理排水を添加した場合、未処理排水の場合と比較して、ARB の初期増加は小さく、少なくとも 12 時間のタイムラグを経てから菌数が急増した。SMZ/TMP 耐性菌の割合は 3.8% ($t=0$) から 14.1% ($t=72h$)、INN 耐性菌は 10.0% ($t=0$) から 22.3% ($t=72h$) へとそれぞれ増加し、ARB が経時的に増殖することがわかった。濾過滅菌河川水と各種排水を混合した微小生態系では ARB が激的に多くなり、濾過滅菌していない河川水と各種排水を組み合わせた場合よりも数が 1~2 桁増加した。この結果から、河川内の土着細菌群集と排水由来の微視物群集との生物学的相互作用が ARB の生残性や増殖性に重要な役割を果たすことが示唆された。

(2) Long-Term Persistence of *bla*_{CTX-M-15} in Soil and Lettuce after Introducing Extended-Spectrum β -Lactamase (ESBL)-Producing *Escherichia coli* via Manure or Water

Gekenidis, M. T., Rigotti, S., Hummerjohann, J., Walsh, F., Drissner, D.
Microorganisms 2020, 8, doi:10.3390/microorganisms8111646 (2020).

Reviewed by T. Horita

細菌感染症の治療を目的として、大量の抗生物質に使用されるようになって以来、薬剤耐性菌 (ARB) および薬剤耐性遺伝子 (ARG) は、あらゆる環境下で検出されるようになった。その中でも生鮮野菜は、生食される頻度が高く、ARB および ARG がヒトに直接伝播すると考えられる。しかしながら、生鮮野菜の栽培過程で播種から収穫に至るまでの ARB および ARG について追跡した研究は少ない。そこで本研究では、レタスの栽培過程において、灌漑水や堆肥を介してレタスに侵入した ESBL 産生大腸菌とそのプラスミドが保有する *bla*_{CTX-M-15} 遺伝子について調査した。調査は、レタスの苗および蒸気処理された土壌を用いてポット内で栽培を行った。プラスミド pEK499 を保有する ESBL 産生大腸菌を混入させた水道水と堆肥をレタス苗に散布した。ESBL 産生大腸菌を、水道水に、低濃度 (10^4 CFU/mL)、高濃度 (10^6 CFU/mL) で添加し、堆肥に 10^8 CFU/mL で添加した。各ポットから、植え付け後 0, 1, 3, 7, 14, 21, 28 日に、土壌とレタスの葉の採取をそれぞれ 3 回行った。さらに、ESBL 産生大腸菌を含む堆肥を散布したポットでは、苗の植え付け 6 週間前に施肥を行い、施肥日から苗の植え付け日まで 1 週間毎に土壌の採取を行った。採取した土壌とレタスの葉は、リン酸緩衝食塩水 (PBS Buffer) で懸濁液を作成し、CHROMagar™ ECC 培地上で 37°C, 24 時間培養後、生育した青色コロニーを大腸菌性陽性株として計数した。培養したコロニーについて、マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析計 (MALDI-TOF MS) を用いて、同定を行った。また、DNeasy PowerSoil Kit と DNeasy PowerWater Kit を用いて、土壌とレタスの葉から単離された大腸菌の DNA 抽出物をそれぞれ生成し、*bla*_{CTX-M-15} のコピー数を算出した。

ESBL 産生大腸菌を含む水道水を散布したポットでは、低濃度と高濃度のいずれにおいても植え付け 28 日後までレタスの葉と土壌から *bla*_{CTX-M-15} が検出された。ESBL 産生大腸菌を含む堆肥を散布したポットでは、土壌において、施肥日から植え付け 21 日後まで *bla*_{CTX-M-15} が検出された。一方、レタスの葉からは、植え付け 7 日目以降、*bla*_{CTX-M-15} が検出されなかった。

以上のことから、ESBL 産生大腸菌が灌漑水および堆肥によって生鮮野菜が汚染された後、長きに渡って残留することを示している。

第 374 回雑誌会

(July. 6, 2022)

(1) Sustainable iron-grafted cellulose fibers enable coagulant recycling and improve contaminant removal in water treatment

Kurusu, R. S., Lapointe, M., Tufenkji, N.

Chemical Engineering Journal, **25**, 132927 (2021) .

Reviewed by K. Takahashi

微細粒子の凝集に用いられるミョウバンやポリアクリルアミド (PAM) は、凝集フロックの沈降促進剤として優れた機能を有する。しかしながら、これらの原料である Al やアクリルアミドモノマーによる環境への悪影響が懸念されている。そこで、本研究ではミョウバンと PAM の使用量削減のために、架橋作用を持つセルロースに鉄水和物をグラフトすることで凝集作用を付与した Fe グラフト繊維による汚染物質の処理性能を検討した。試料は、カナダのケベック州を流れるブレイリー川から採取した河川水 (濁度: 8 ± 2 NTU, DOC: 6.0 ± 1.0 mg-C/L) と合成廃液 (5.0 ± 0.5 mg-P/L) を実験用の原水とした。なお、無機凝集剤にはミョウバン (注入率 30 mg/L) を使用し、PAM の注入率を 0.1-0.5 mg/L, Fe グラフト繊維の注入率を 10-500 mg/L としてジャーテストを行った。測定項目は静置開始 20, 60, 180 秒後の処理水の濁度, フロック径, DOC, リンの濃度とした。さらに、河川水にミョウバン (30 mg/L), Fe グラフト繊維 (100 mg/L), および PAM (0.4 mg/L) を注入してジャーテストを行い、形成されたフロックを回収した。そして、回収したフロック, ミョウバン (10 mg/L), および PAM (0.4 mg/L) を用いてジャーテストを行い、フロックの再利用による濁度除去能力を評価した。

ミョウバン (注入率: 30 mg/L) と PAM (注入率: 0.3 mg/L) に Fe グラフト繊維 (100 mg/L) を加えて使用することによって、フロック径は Fe グラフト繊維を含まないフロックの約 10 倍となった。また、全ての Fe グラフト繊維注入率において、静置開始 60 秒後の上澄み水の濁度が 1 NTU 未満であった。ミョウバン 30 mg/L と Fe グラフト繊維 100 mg/L を用いた場合と繊維を用いずにミョウバン 40 mg/L のみを用いた場合の DOC 濃度は、ほぼ同一値であった (2.5 mg/L)。したがって、DOC の除去に 100 mg/L の Fe グラフト繊維を使用した場合、25% の凝集剤の削減 (40 mg/L から 30 mg/L) が可能であった。合成廃液に Fe グラフト繊維のみを注入した場合、Fe グラフト繊維注入率 100 mg/L あたり平均 0.4 mg/L のリンが除去された。これは、負の電荷をもつ DOC とリンが、繊維の表面にある正電荷を持つ鉄の水和物と荷電中和によって凝集されたと考えられる。また、フロックの再利用に関する実験では、3 回の再利用まで濁度が 1 NTU 未満に維持された。以上のことから、Fe グラフト繊維の注入と再利用によって凝集剤と PAM の注入量を削減でき、良好な処理が可能となることが明らかとなった。

第 375 回雑誌会

(July. 13, 2022)

(1) Evaluation of a virus concentration method based on ultrafiltration and wet foam elution for studying viruses from large-volume water samples

Fores.E., Rusinol.M., Itarte.M., Puchol.S.M., Calvo.M., Mas.S.B

Science of the Total Environment, 829, 154431, (2022).

Reviewed by R.Nakamura

ウイルス感染症の多くは、未処理または不適切に処理された下水放流水との曝露によって生じる。ウイルスは、水環境中に極低濃度で存在する。そのため、検出・定量のために大量の水を高濃度に濃縮することが必要である。本研究では、多様な水環境中からウイルスを高濃度に濃縮することを目的として、Wet Foam Elution 技術を利用した、LVC(large volume concentration)法の特性を評価した。LVC 法とは、デットエンド限外濾過(DEUF)と、溶出液中にあらかじめ CO₂ を注入しておく Wet Foam Elution 技術を組み合わせたもので、微生物の抽出過程で CO₂ が粘性の強いマイクロバブルを形成し、マイクロバブルとフィルター表面との接触面積が液体のみの場合と比較して、著しく向上するため、数秒で高濃度の溶出液を得ることができる技術である。また、LVC 法の二次濃縮には、遠心限外濾過(CeUF)を行った。回収率はウイルス(HAdV, PhiX174, MS2, CVB5)をスパイクすることで、プラーク法と PCR 法によって評価した。最適溶媒の決定後に海水 (50 L)、地下水 (100 L)、および河川水 (10 L) に対して本法を適用した。

LVC 法における最適な溶媒を決定するために、Tris 溶出液と PBS 溶出液を比較した。Tris 溶出液の各ウイルス回収率は、HAdV:19.2%, CVB:155.9%, PhiX174:270.9%, MS2:106.0%であった。また、PBS 溶出液の各ウイルスの回収率は、HAdV:2.1%, CVB:135.7%, PhiX174:27.2%, MS2:107.3%であった。そして、平均回収率から Tris 溶出液を最適な溶媒として選択した。LVC 法によって、原水 10L を 20~75mL に濃縮することが可能であった。次に、LVC 法後に二次濃縮(LVC+CeUF)を行い、既存のスキムミルク凝集法(SMF 法)と比較をした。LVC+CeUF における MS2 の回収率は、 $22.91 \pm 12.47\%$ であった。SMF 法では MS2 の回収率は $8.97 \pm 0.07\%$ であった。LVC+CeUF は、SMF 法よりも高い MS2 回収率を示した。LVC+CeUF 法によって、原水 10L を 200~300 μ L に濃縮することが可能であった。海水、地下水、河川水に対して LVC+CeUF 法を適用したところ、HAdV が、海水で $2.14 \sim 2.39 \times 10^2$ Genome Copies/L, 地下水で $4.67 \sim 4.67 \times 10^2$ GC/100L, 河川水で $2.33 \times 10^1 \sim 3.47 \times 10^3$ GC/L で存在した。実環境中に存在するウイルスを検出することが可能であった。本法で得たウイルスゲノムは、遺伝子解析にも適用可能であり、環境サンプルから多数のウイルスが確認された。以上のことから LVC 法は、ウイルスゲノムを高感度に検出・定量することが可能である。

(2) 塩分と太陽光が下水由来の指標微生物の消長に及ぼす影響評価

鈴木元彬, Chomphunut Poopipattana, 古来弘明

土木学会論文集 G(環境), Vol.76, No.7, III_411-III_421, (2021).

レビュー:石丸剛士

東京港沿岸地域では、降雨時に未処理下水がそのまま公共用水域に流出する可能性があることから、合流式下水道雨天時潮流水 (Combined Sewer Overflow) が問題となっている。CSO による糞便汚染を測る指標として、主に大腸菌や腸球菌、糞便性大腸菌群が使用されており、太陽光や塩分濃度は、指標微生物の消長に影響する。しかし、下水由来の指標微生物の塩分と太陽光による不活化影響について国内での調査研究事例がない。そこで本研究では、東京港に処理水を放流する下水処理場の流入下水を対象に 3 種類の指標細菌類 (大腸菌、糞便性大腸菌群、腸球菌) と 2 種類のウイルスの指標 (F 特異大腸菌ファージ、体表面吸着ファージ) について塩分と太陽光による不活化影響を調査した。明条件では、0, 5, 10, 20PSU の 4 段階の塩分濃度を設定した。暗条件では、0, 10, 20PSU の 3 段階の塩分濃度を用意した。そして、各条件において、24 時間おきに計 6 回採水し、指標微生物濃度を測定した。光は、太陽光に近いメタルハライドランプ (波長域 300-800nm) を一定の強さで照射した。大腸菌と腸球菌はクロモカルトコリフォーム培地法、糞便性大腸菌群はデソキシコーレート培地法で 24 時間培養後、コロニーを計数した。F 特異大腸菌ファージは *Salmonella typhimurium* WG49 を用いた単離法で計数した。体表面吸着ファージは、*E.coli* WG5 を用いた重層法で、プラークを計数した。また、不活化影響については、不活化係数を算出し、各細菌、条件ごとの実験結果を用いた重回帰分析を行って、判断した。

その結果、光のない暗条件では F 特異大腸菌ファージのみ、塩分濃度の増加とともに濃度が減少した。一方で、大腸菌や糞便性大腸菌群は濃度の増加傾向も見られ、植種源とした下水に含まれる溶存有機物などの基質による増殖の影響も観察された。また、明条件での実験では、体表面吸着ファージを除く 4 つの指標微生物で太陽光による不活化が確認された。中でも大腸菌や糞便性大腸菌群、F 特異大腸菌ファージは、塩分濃度が高いほど不活化の影響が大きかった。今回の実験によって、塩分影響下での太陽光による不活化の影響の大きさは、大腸菌>糞便性大腸菌群>腸球菌>F 特異大腸菌ファージ>>体表面吸着ファージであることがわかった。指標ごとに塩分や太陽光による不活化影響が異なることから、糞便汚染の把握において複合して指標を測定する意義が示唆された。CSO の影響を大きく受けた沿岸水域では、不活化だけでなく有機基質濃度に依存した増殖も考慮する必要性が考えられる。

第 376 回雑誌会

(July. 20, 2022)

(1) Prevalence of enteric opportunistic pathogens and extend-spectrum cephalosporin-carbapenem-resistant coliforms and genes in wastewater from municipal wastewater treatment plants in Croatia

Puljko, A., Milaković, M., Križanović, S., Kosić-Vukušić, J., Babić, I., Petrić, I., Maravić, A., Jelić, M. and Udiković-Kolić, N.

Journal of Hazardous Materials, **427**, 128155, (2022).

Reviewed by K. Tsuda

臨床環境と非臨床環境の両方において、薬剤耐性菌 (ARB) とその薬剤耐性遺伝子 (ARG) の出現と拡散が加速しており、第 3 世代セファロスポリン (ESC) やカルバペネム系などの β -ラクタム系抗生物質に対する細菌の耐性が高まっていることが世界的に問題になっている。下水処理場 (WWTP) は、腸内日和見病原体 (EOP) や ARG の水平伝移のホットスポット、ならびに環境中にそれらを拡散させる供給源と考えられている。しかし、クロアチアの下水における ESC およびカルバペネム耐性 (CR) の蔓延に関連する ARG および EOP の情報は、ほとんど得られていない。そこで本研究では、クロアチアの 7 都市の WWTP の流入・放流水中の ARB/ARG および EOP を 2 シーズン (冬と夏) にわたって比較した。採取したサンプルは、0.85% NaCl で連続的に希釈し、滅菌済みフィルター (0.22 μm) でろ過した。次に、フィルターを Rapid' *E. coli* 2 寒天培地で培養し、非耐性大腸菌群 (*E. coli*, 非 *E. coli*) を計数した。また、セファタキシム (CTX) を 4mg/L 添加した Rapid' *E. coli* 2 寒天培地を用いてセファタキシム耐性 (CTX-R) 大腸菌群も計数した。CR 大腸菌群は、CHROMagar mSuperCARBA 寒天培地を用いて計数した。加えて、qPCR により、2 種類の ESBL 遺伝子 (*bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M-32}), 5 種類の CP 遺伝子 (*bla*_{KPC-3}, *bla*_{NDM}, *bla*_{OX4-48-like}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}), 総菌数のマーカーとして 16S rRNA 遺伝子のコピー数を測定した。さらに、EOP (*yccT*: *E. coli*, *gltA*: *K. pneumoniae*, *secE*: *A. baumannii*, 23SrRNA: *Enterococcus* spp.) の遺伝子のコピー数も測定した。

非耐性大腸菌群, CTX-R および CR の大腸菌群は、ほとんどの WWTP において従来の処理で有意に減少したが、 10^2 CFU/100 mL 以上で存在した。*K. pneumoniae* や *A. baumannii* などの EOP は、ほとんどの WWTP で効率的に除去された。一方で *E. coli* と *Enterococcus* spp. は減少したものの、放流水中に比較的高濃度で存在した。ESBL 遺伝子 (*bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M-32}) は、処理後にわずかに減少または増加した。CP 遺伝子のうち *bla*_{KPC-3}, *bla*_{NDM}, *bla*_{OX4-48-like} は散発的に検出された。*bla*_{IMP} と *bla*_{VIM} は処理後増加し、処理場の規模、集水域の病院の数または規模、放流水の化学的酸素要求量と相関していた。この結果は、廃水処理技術の改善が必要であることを示唆している。

(2) Detecting genes associated with antimicrobial resistance and pathogen virulence in three New Zealand rivers

Davis, M., Midwinter, A.C., Cosgrove, R., and Death, R.Z.

Science of the Total Environment, **775**, 145846 (2021).

Reviewed by R. Matsuyama

薬剤耐性菌による感染症は世界的な衛生問題となっているが、環境中に放出された細菌に対する情報は少ないのが現状である。特に畜産場を流域に持つ河川においては、病原性大腸菌や薬剤耐性大腸菌などの流出が懸念されるため、微生物の分析が必要である。しかしながら微生物の分析は、培養する方法に依存しているため、調査に時間や費用を要する。そこで本研究では、代替手段としてニュージーランドに位置する3河川から環境DNA (eDNA) を抽出し、PCRによって病原性遺伝子と薬剤耐性遺伝子を評価した。対象河川は、畜産場が流域に存在する3河川とし、秋(5月)と春(9月)にわたって2季に分けて、畜産場の上流と下流の2地点において水試料1Lと底質堆積物25gを採取した。水試料中のeDNAは、試料500mLを通水後、Nucleospin soil kitを用いて抽出した。同様に、堆積物中のeDNAは、試料0.5gを1サンプルとしてNucleospin soil kitを用いて抽出した。その後、抽出したeDNAは、qPCR法によって定量した。qPCRの対象とした遺伝子は、大腸菌普遍遺伝子である *uidA*, 病原性に関連する遺伝子である *stx1*, *stx2*, *eae*, 血清型に関連する遺伝子である O157 *rfbE*, O26 *wzy*, β ラクタマーゼに関連する遺伝子である *bla*_{CTX-M} の7つとした。

大腸菌の普遍的遺伝子である *uidA* はすべてのサンプルから検出されたが、その他の遺伝子は、季節や基質によって異なった。春と秋の調査では、病原性遺伝子 (*stx1* か *stx2* および *eae*) が3河川において、上流と下流合わせてそれぞれ66%と25%の検体から検出された。*bla*_{CTX-M} は、春の調査時のみに、33%の検体から検出された。この結果は、周辺農家における抗生物質の使用量を反映している可能性がある。いずれの河川においても、下流のサンプルから対象遺伝子が全体的に多く検出された。また、水試料よりも堆積物から検出された対象遺伝子の方が多かった。しかしながら、河川によっては、検出される遺伝子の変動している場合も見受けられた。以上の結果から、水試料のみによるモニタリングでは、河川の利用者に対する微生物の曝露リスクは、評価できない可能性があることが示唆された。環境DNAによる遺伝子評価は、細菌の培養による分析の代替手段となり得る。

第 377 回雑誌会

(July. 27, 2022)

(1) Distribution of antibiotics in water, sediments and biofilm in an urban river (Cordoba, Argentina, LA)

Valdes, E. M., Santos, H.M.L.M. L., Castro, C. R. M., Giorgi, A., Barcelo, D., Rodriguez-Mozac, S. and Ame, V. M.

Environment Pollution, **269**, 116133 (2021).

Reviewed by Y. Ito

近年、世界中の都市河川において、抗菌薬による河川汚染が問題となっている。また、抗菌薬に汚染された河川に生息するバイオフィームは、水中の抗菌薬を濃縮する可能性が高い。しかし、都市の河川バイオフィームに存在する抗菌薬の情報は少ない。さらに、多種多様な抗菌薬および代謝物を対象としたフィールド研究も非常に少ない。そこで本研究では、アルゼンチンのスキア川から河川水、バイオフィーム、堆積物を採取し、43種類の抗菌薬と4種類の代謝物の濃度を測定した。サンプリングは、2016年の乾季（5月）と雨季（10月）に、スキア川の上流から下流における5地点から河川水、バイオフィーム、堆積物を2試料ずつ採取した。河川水、バイオフィーム、堆積物の前処理には、それぞれ固相抽出（SPE）、ビーズビーティング（Beads Beating）＋SPE、加圧液体抽出（PLE）＋SPEを適用し、その後、UPLC-ESI-MS/MSで抗菌薬を測定した。

43種類の抗菌薬と4種類の代謝物を調査した結果、全体で12種類の抗菌薬が検出された。全試料において、検出された抗菌薬の濃度範囲は、河川水で0.003～0.29 mg/L（最大：セファレキシン）、バイオフィームで2～652 mg/kg d.w.（最大：シプロフロキサシン）、堆積物で2～34 mg/kg d.w.（最大：オフロキサシン）であった。したがって、河川中の抗菌薬は、堆積物よりもバイオフィームに優先的に蓄積すると考えられる。また、3つの環境要素（河川水、バイオフィーム、堆積物）から検出された主な抗菌薬は、フルオロキノロン系、マクロライド系、トリメトプリム系であった。しかし、河川水ではセファレキシンが最も多く検出された。スキア川における抗菌薬の検出頻度や濃度は、河川の下流に行くに従い増加し、特に、下水処理場を境目とした上流と下流では著しい差が見られた。また、河川水の場合、雨季と乾季における抗菌薬の検出頻度および濃度は、ほぼ同程度であった。しかし、バイオフィームと堆積物の場合、雨季の方が抗菌薬の検出頻度および濃度が高かった。以上のことから、本研究は都市河川における抗菌薬汚染の動態と分布の理解に貢献するとともに、バイオフィームへの抗菌薬の蓄積が重要な環境因子であることを明らかとなった。また、抗菌薬による河川汚染の主な原因は、下水処理場の放流水であることが示唆された。

(2) Persistence of Fecal Indicators and Microbial Source Tracking Makers in Water Flushed from Riverbank Soils

Calderon, J. S., Verbyla, M. E., Gil, M., Pinongcos, F., Kinoshita, A. M., and Mladenov, N. Water, Air, & Soil Pollution, **233**, 83, (2022).

Reviewed by W. Sugiyama

豪雨時の下水道の氾濫や老朽化した下水管からの漏出によって、下水中の病原体が水域に拡散すると考えられる。下水道から漏出した病原体は河岸土壌中に浸透し、将来の降雨イベントまで生残する可能性がある。しかし、水域流出後に河岸土壌に流出した微生物の持続性は明らかになっていない。そこで本研究では、未処理の下水に汚染された河岸土壌中のふん便指標細菌や汚染源追跡マーカーを用いて降雨や乾燥による持続性を評価した。実験で使用する土壌試料は、カリフォルニア州サンディエゴのアルバラード川河岸で収集した。また、土壌浸漬に用いる未処理の下水試料は、San Elijo 水再生場で収集した。はじめに、乾燥させた土壌試料 50 mg に下水 5 mL を添加して 24 時間乾燥させた。次に、合成雨水の浸漬を 20 回繰り返す、降雨による土壌中の微生物の生残率を評価する「連続浸漬実験」と、長期間（14 日、28 日、60 日、121 日）の乾燥後に合成雨水に浸漬させ、乾燥による微生物の生残性を評価する「乾燥後浸漬実験」を行った。土壌試料を合成雨水 45 mL に浸漬させた後に、上澄み液を回収して試料液とした。各試料液について、ふん便指標細菌である大腸菌・腸球菌の細菌数を Colilert-18 と Enterolert-18 を用いて計数した。また、試料液中から DNA を抽出し、汚染源追跡マーカーである HF183 と PMMoV（トウガラシ微斑ウイルス）をデジタル PCR 法で定量した。

下水中の大腸菌と腸球菌の濃度はそれぞれ 2.7×10^7 MPN/100 mL と 3.0×10^6 MPN/100 mL であった。また、HF183 と PMMoV は、それぞれ 5.9×10^6 GC/100 mL と 3.4×10^3 GC/100 mL で検出された。土壌に下水を添加して 1 日後の試料液中の大腸菌と腸球菌の細菌数は、それぞれ 5.5×10^7 MPN/100 mL と 3.4×10^6 MPN/100mL になった。さらに、HF183 と PMMoV は、それぞれ 5.1×10^3 GC/100 mL と 3.3×10^2 GC/100 mL になった。連続浸漬実験を行うなかで、各微生物の検出数は減少し、大腸菌は 10 回目の浸漬以降、PMMoV は 5 回目以降検出されなかった。一方で、腸球菌と HF183 は 20 回目の浸漬後も検出された。乾燥後浸漬実験では、4 か月間の乾燥後、乾燥前と比較して PMMoV は約 10% 生残していたほか、大腸菌や腸球菌、HF183 も検出された。本研究から、下水から土壌へ流出した微生物は降雨による洗い流しや長期間の乾燥後も生残すること、また、河岸土壌が未知の微生物汚染源となる可能性が示唆された。

第 378 回雑誌会

(August. 3, 2022)

(1) Phage-mediated Shiga toxin (Stx) horizontal gene transfer and expression in non-Shiga toxigenic *Enterobacter* and *Escherichia coli* strains

Khalil, R., Skinner C., Patfield S. and He X.

Pathogens and Disease, **74**, 2429–2435, 2016.

Reviewed by H. Xie

志賀毒素産生性大腸菌 (STEC) は、溶血性尿毒症症候群などのヒト疾患を引き起こす食品由来の主要な病原体である。STEC 株の毒性および重症化する能力は、志賀毒素転換ファージ (Stx ファージ) がコードする Stx 遺伝子の活性に関連している。近年、臨床的に重症化しやすい Stx2 ファージが Stx1 ファージよりも多く研究されている。そこで本研究では、大腸菌 O157:H7 株 RM8530 および M12X01451 株の Stx1a と Stx1e の転換ファージが、それぞれ複数の *Escherichia coli* および *Enterobacter cloacae* に感染する能力を検討した。形質導入実験のドナー株として、Stx1e 陽性の *Ent. cloacae* M12X01451 株と Stx1a 陽性の *E. coli* O157:H7 RM8530 株を使用した。レシピエントとして Stx 陰性の *Ent. cloacae* (ATCC 13047), *E. coli* (ATCC 25922), *E. coli* K12 (ATCC 29425), *E. coli* DH5 α , *E. coli* 465-97 を使用した。まず、精製高力価のドナー菌を作り、LB 培地上に置いて一晩培養し、ファージのプラーク数を数えた (PFU/mL⁻¹)。その後、スポット試験法を用いてレシピエント株への Stx1e と Stx1a の感染範囲を確認し、光学密度 (OD) 法により感染有無を検査した。形質導入実験については、100 μ L の CaCl₂ と 500 μ L のドナー株を含む 3mL の LB ブロスに 100 μ L レシピエント株を添加し、37°Cで一晩培養した。混合液は遠心分離で回収し、沈殿物を 3 mL の LB ブロスに懸濁し、0.1%滅菌 PW で 10 倍に連続希釈して LB 培地に広げ、37°Cで一晩培養した。単独のコロニーを単離し、PCR によって Stx1e と Stx1a 遺伝子を確認した。また、形質導入実験後の感染菌の安定性を判断するため、コロニーを LB 培地で継代し、T0, T10, T20 後に回収した感染菌について PCR 解析と酵素結合免疫吸着測定 (ELISA) を行った。実験に使用・回収したすべての株は、DNA シーケンスによって解析した。

レシピエント株は、2 つのドナー株に対する感受性が大きく異なり、Stx1e と混合したレシピエント株は Stx1a と混合したレシピエント株よりも感受性が低いことがわかった。Stx1e および Stx1a に最も感受性が高かった宿主は *Ent. cloacae* 13047 と *E. coli* 465-97 であった。Stx1e 遺伝子は形質導入した大部分の継代細菌で安定的に維持されたことが PCR によって確認されたが、*E. coli* DH5 α では T20 後に欠落した。Stx1a と混合し形質導入したコロニーでは、PCR で Stx1a 陽性であることが確認されていたにもかかわらず、DNA シーケンスでは Stx1a が検出されなかった。この結果から、Stx の保有株間で水平伝播が起こる可能性が高く、病原体に変化する可能性がある。

第 379 回雑誌会

(Oct. 2, 2022)

(1) Chlorine disinfection promotes the exchange of antibiotic resistance genes across bacterial genera by natural transformation

Jin, M., Liu, L., Wang, D., Yang, D., Liu, W., Yin, J., Yang, Z., Wang, H., Qiu, Z., Shen, Z., Shi, D., Li, H., Guo, J. and Li, J.

The ISME Journal, **14**, 1847-1856, 2020.

Reviewed by S.Tamai

次亜塩素酸ナトリウムによる消毒は病原微生物を死滅、不活化させ、飲料水の安全を確保するための手段として広く用いられている。しかし、塩素消毒後の下水処理放流水中に、塩素消毒前と比較して高濃度の細胞内薬剤耐性遺伝子と細胞外薬剤耐性遺伝子が存在していることが確認されている。さらに、塩素消毒後の水中には、塩素耐性を有するものの塩素処理によって可逆的な損傷を受ける塩素損傷菌が存在する。細菌は、選択圧下で遺伝子の伝播率が上昇することが確認されているが、塩素損傷菌が薬剤耐性の伝播とどのように関連するかは不明である。そこで本研究では、薬剤耐性プラスミドを持つ細菌 (*Escherichia coli*, *Salmonella aberdeen*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*) から放出されたプラスミドと塩素損傷菌を使用して形質転換実験を行い、塩素損傷菌の形質転換能を検討した。さらに、水質パラメータ (pH, COD, 温度, NH_4^+ , K^+ , および Ca^{2+}) と形質転換頻度の関連を検討した。

ヒートショック法によって、塩素損傷菌、コンピテントセル、および未処理菌にプラスミドを伝播させ形質転換頻度を比較したところ、塩素損傷菌の形質転換頻度は、3 群の中で有意に高かった ($p < 0.01$)。塩素損傷 *E. faecalis* では、未処理菌とコンピテントセルと比較して、形質転換頻度がそれぞれ 550 倍と 27 倍に上昇した。さらに、*E. coli*, *S. aberdeen*, および *P. aeruginosa* から放出されたプラスミドを塩素損傷 *E. faecalis*, または未処理の *E. faecalis* と共に培養して、自然形質転換頻度を比較した。塩素損傷菌の形質転換頻度は未処理菌と比較して有意に高く、形質転換頻度は 37~134 倍に上昇した ($p < 0.01$, 形質転換頻度: $8.8 \times 10^{-6} \sim 1.7 \times 10^{-5}$)。また、自然形質転換頻度の検討と同様の手法で、塩素損傷菌の形質転換に影響する水質パラメータを検討したところ、COD, NH_4^+ , K^+ , および Ca^{2+} は、塩素損傷菌の形質転換頻度を促進することが確認された ($p < 0.05$)。特に NH_4^+ では、 NH_4^+ 濃度の増加に伴い形質転換頻度が上昇し、 $\text{NH}_4^+ : 5 \text{ mg/L}$ の時 *E. faecalis* の形質転換頻度は未処理の *E. faecalis* と比較して 55 倍に増加した (形質転換頻度: 7.9×10^{-4})。これらの結果は、塩素消毒が遺伝子の伝播を促進し、塩素損傷菌の自然形質転換によって、水環境中において薬剤耐性菌を拡散させるリスクがあることを示唆している。

第 380 回雑誌会

(Sep. 9, 2022)

(1) Prevalence of integrons in multidrug-resistant *Escherichia coli* isolates from waters and vegetables in Nsukka and Enugu, Southeast Nigeria

Chinyere, C. B., Ibangha, I. I., Nweze, N.O., Onuora, V. C., Ozochi, C. A.

Environmental Science and Pollution Research **18**, doi.org/10.1007/s11356-022-20254-6

(2022).

Reviewed by T. Horita

汚染された淡水源を用いた灌漑水を農作物に散布することは、薬剤耐性遺伝子の拡散に加えて、汚染された農作物による食中毒につながる可能性がある。しかしながら、薬剤耐性遺伝子に関する研究が世界で行われる中で、国境を越えて広がる薬剤耐性遺伝子についての研究は少ない。そこで本研究では、下水場処理排水、水道水、農場から収集された野菜、および 2 都市で販売されている野菜から単離された多剤耐性大腸菌について、インテグロンの存在を検討した。調査は、ナイジェリアのヌスカとエヌグで実施された。サンプルは、ナイジェリア大学の下水場処理排水、水道水、温室で栽培された野菜、農場で栽培された野菜、およびヌスカとエヌグで販売されている野菜をそれぞれ採取した。野菜サンプル 1g を乳鉢ですり潰し、生理食塩水 9mL と混合して懸濁液を作成した。段階希釈をした懸濁液 1 ml をエオシンメチレンブルー (EMB) 寒天培地に直接塗布し、44°C で 18~24 時間培養した。水道水と下水場処理排水は、メンブレンフィルターでろ過し、EMB 寒天培地で培養した。培養した大腸菌は、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) で大腸菌の確認を行った。単離した大腸菌について、Kirby-Bauer ディスク拡散法を使用した薬剤感受性試験を実施した。また、マルチプレックス PCR 法によって単離株をスクリーニングし、クラス 1, 2 および 3 インテグロンに分類した。

下水処理場排水から 41 株、水道水から 10 株、温室野菜から 46 株、農場野菜から 55 株、市場野菜から 36 株、計 188 株の大腸菌が単離された。すべての大腸菌単離株はイミペネムに対する感受性を示した。また、単離株の 6.4% (12/188 株) がセファロスポリンに対して耐性を示した。すべての単離株が多剤耐性であり、3 剤から 7 剤耐性で検出された。188 個の大腸菌単離株のうち、クラス 1 インテグロンが 175 個 (93.1%)、クラス 2 が 5 個 (2.7%) 検出された。排水と野菜にクラス 1 のインテグロンが含まれていると、公衆衛生上のリスクが生じる可能性がある。したがって、野菜農場の灌漑用水を安全に使用するための対策を講じ、排水の微生物負荷を減らす必要がある。また、下水場処理排水で育った植物の危険性と収穫された野菜を適切に洗浄する方法について、農家と地域社会への教育が必要である。

(2) Plastic pollution fosters more microbial growth in lakes than natural organic matter

Sheridan, A., Fonvielle, J., Cottingham, S., Zhang, Y., Dittmar, T., Aldridge, D. and Tanentzap, A.

Nature Communications 13, 4175, (2022) .

Reviewed by T.Ishimaru

プラスチック汚染は、淡水域の広範囲に拡大している。プラスチックの分解時に発生するプラスチック浸出液は、従属栄養増殖に利用できる炭素系基質となりうるが、これらの炭素系基質が微生物代謝にどのように影響するかについての研究は少ない。そこで本研究では、世界の淡水域の大半を占める北半球の湖沼において、プラスチック浸出液が細菌の増殖に与える影響を検討した。湖沼水の試料は、スカンジナビアの北緯 59.1°から北緯 70.3°の間に位置している 29 の湖沼の底から採取し、0.2 μm の Sterivex フィルターユニット (Millipore) に通して、微生物群集の構成を調査した。低密度ポリエチレン (LDPE) 製のビニールを 1 cm^2 の正方形にカットし、蒸留水 150 mL にカットしたビニール 240 枚を 25°C で 7 日間浸漬し、これをプラスチック浸出液とした。また、細菌活性を測定するために、湖沼水 125 mL に対して①プラスチック浸出液を 4.6 mL 添加、②蒸留水 4.6 mL を添加、③添加無し、の 3 条件で 72 時間培養した後、1.5 mL の試料水に 17 nM の [^3H] -ロイシンを加え、2 mL の遠沈管に入れた。その後、1 つの試料にはトリクロロ酢酸を加え、もう 1 つの試料には何も加えずに、遠心分離を行い、細胞を沈殿させ上澄みを除去した。試料を風乾後、Triathler 液体シンチレーションカウンターを使用し、1 分当たりのカウント数 (CPM) を測定した。CPM は、各細胞の値から死滅細胞を差し引き、1 分当たりの崩壊数に変換し、これらの値を炭素摂取量に変換した後、細菌によるタンパク質生産量 (BPP) を推定した。また、BPP をもとに細菌増殖効率 (BGE) を計算した。さらに、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い、微生物群集構成が BPP と BGE の増減に与える影響を評価した。

プラスチック浸出液を自然環境の湖沼水に添加すると、添加前と比較して BPP が 2.29 倍増加した。浸出液添加によって溶存有機物が増加したことにより、BGE は 1.72 倍増加した。群集構成の多様性が高い場合には、BGE は 2.93 倍増加した。これに対して、多様性が低い場合は、BGE はプラスチック浸出液添加の影響がなかった。また、BPP と BGE は、それぞれ *Hymenobacter* 属と *Deinococcus* 属が存在する場合、増加の割合が大きかった。以上のことから、プラスチックの DOM は天然の DOM とは大きく異なり、細菌の増殖を大きく促進することがわかった。これは、プラスチック汚染が水圏生態系を刺激していることを示唆している。

第 381 回雑誌会

(Sep. 16, 2022)

(1) Responses of *Enterococcus faecalis* resistance and cytolysin up-regulation to nutrients in constructed mesocosms

Ali L., Mustafa M., Xiao Z., Islam W., Ara U. and Ajmal M.

Journal of King Saud University – Science, 34 (1), 2022

Reviewed by Y. Kato

多剤耐性菌の蔓延は、環境および健康に対する重大なリスクを与えている。特に、*Enterococcus faecalis* の抗生物質耐性菌 (ARB) / 遺伝子 (ARG) の増殖は、世界中で公衆衛生上の脅威となっている。しかし、抗生物質耐性菌の拡散や病原性の発現に寄与する栄養素などの環境変数に関する理解は十分ではない。本研究では、*E. faecalis* の生存率、抗生物質耐性、バイオフィーム形成、クオラムセンシングに及ぼす栄養塩 (硝酸 (N)、リン酸 (P)) の影響を探ることを目的とした。実験で用いるメソコスムは、中国の福建農林大学に設置され、5 L の水道水と福州国家森林公园の汚染されていない土壌で作成した。蒸発の影響を避けるため、水道水を毎日散布し、ほぼ元の水位に戻した。メソコスムと栄養塩の組み合わせは、T1 (N と P を補充しないコントロール)、T2 (N と P の低用量)、T3 (N と P の中用量)、T4 (N と P の高用量) とした。合計 8 回 (0, 1, 7, 14, 28, 40, 60, 96 日) のサンプリングで 96 日間にわたりメソコスムから腸球菌を分離し、DNA 抽出キットを用いて DNA を抽出した後、プライマー 72-F 及び 210-R を用いて *E. faecalis* 16S rRNA 遺伝子を同定した。分離された *E. faecalis* に対してブロス微量希釈法でアンピシリン (AMP)、オキシテトラサイクリン (OXY)、シプロフロキサシン (CIP)、バンコマイシン (VAN)、クロラムフェニコール (CHL)、エリスロマイシン (ERY) に対する耐性を判定した。また、マイクロプレートリーダーを用いてバイオフィーム生産を測定し、リアルタイム PCR (qPCR) で 2 ヶ月間、7 回にわたってクオラムセンシング関連遺伝子の存在量を測定した。

単離した *E. faecalis* 株のうち、AMP (188/382 株, 49%)、OXY (83/382 株, 21.7%) および CIP (21/382 株, 5.5%) に対してそれぞれ耐性を示した。60 日目と 96 日目の *E. faecalis* のバイオフィーム生産量は有意に増加した ($p < 0.01$)。また、クオラムセンシング関連遺伝子の発現は、栄養未処理 (T1) のメソコスムと比較して、栄養強化処理 (T2~T4) において転写レベルで有意に上昇 (10 倍) した。N と P 投入における関連遺伝子の発現は、硝酸イオンとリン酸イオンが *E. faecalis* のクオラムセンシング遺伝子の増幅に重要な役割を果たしていることが示唆された。以上の結果から、メソコスム中の N および P の存在は、時間の経過とともに *E. faecalis* に薬剤耐性を身に付けさせることが示唆された。

第 381 回雑誌会

(Sep. 16, 2022)

(2) Monitoring Carbapenem-resistant Enterobacterales in the environment to assess the spread in the community

Urase, T., Goto, S., and Sato, M.

Antibiotics, **11**, 917, (2022).

Reviewed by K. Tsuda

COVID-19 パンデミックの際に下水疫学 (WBE) の有用性が証明され、新興感染症の環境モニタリングの役割が認識された。一方で、化学療法におけるカルバペネムの重要性から、カルバペネム耐性腸内細菌科細菌 (CRE) は、新しい抗生物質が緊急に必要とされる極めて重要な細菌群として WHO によってリストアップされている。本研究では、WBE を CRE に適用し、環境株と臨床株を比較することによって環境モニタリングで検出可能な CRE を明らかにすることを目的とした。試料は、下水処理場の流入水 (1 地点)、塩素処理後の放流水 (4 地点)、河川水 (5 地点) から採取した。試料中の細菌をメンブレンフィルター (0.45 μm) で回収し、メロペネム (MPM) 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 添加・非添加の CHROMagar ECC 寒天培地で 37 $^{\circ}\text{C}$ 、42 $^{\circ}\text{C}$ で 24 時間培養した。これらの培地から推定 CRE を単離した。その後、推定 CRE に対して、ダブルディスクシナジー試験を用いて MPM 耐性とメタロ- β -ラクタマーゼ (MBL) 産生を確認した。また、MPM 耐性が確認された菌株の DNA を抽出し、16S rRNA を増幅した。増幅した 16S rRNA をキットにより精製し、サンガー法により菌種を同定した。さらに、カルバペネマーゼをコードする遺伝子 (IMP 型, NDM 型, VIM 型, KPC 型, OXA-48-like 型, GES 型) を検出するために PCR スクリーニングを実施した。

CRE 単離株から NDM 型カルバペネマーゼを保有する *Escherichia coli* (6/9 株)、IMP 型カルバペネマーゼを保有する *Enterobacter cloacae* complex (9/58 株)、*Klebsiella pneumoniae* complex (13/47 株) が検出された。また、GES 型カルバペネマーゼを保有する *Enterobacter* (27/58 株)、*Klebsiella* (24/47 株)、*Raoutella* (7/7 株) が臨床単離株と比較して頻繁に検出された。これらの菌種の CRE は WBE による適用が可能であることが示唆された。臨床環境の CRE は 732/1799 株 (40.7%) が *Klebsiella aerogenes* であるのに対して、下水から単離された *Klebsiella aerogenes* (3/47 株) は極めて少なかった。したがって、*Klebsiella aerogenes* は下水サンプルからのモニタリングが困難な種である可能性が示唆された。一方において、KPC 型, OXA 型, VIM 型のカルバペネマーゼは検出されず、病院内での保有率は低いことが示唆された。これらの結果は、WBE を CRE に適用することの可能性と限界を示している。

第 382 回雑誌会

(Sep. 30, 2022)

Differences in removal rates of virgin/decayed microplastics, viruses, activated carbon, and kaolin/montmorillonite clay particles by coagulation, flocculation, sedimentation, and rapid sand filtration during water treatment

Nakazawa, Y., Abe, T., Matsui, Y., Shinno, K., Kobayashi, S., Shirasaki, N., Matsushita, T.
Water Research, **203**, 117550 (2021).

Reviewed by K. Takahashi

凝集-沈殿-急速ろ過 (CSF) による水処理の目的は、粘土粒子からなる懸濁物質を除去して濁度を低減することである。しかし、CSF による活性炭 (AC) やマイクロプラスチック (MP)、ウイルス等、様々な種類の粒子が混在した状態での除去効率を比較した研究はない。そこで本研究では、CSF による粘土粒子、AC、MP、およびウイルスの除去率を明らかにすることを目的とした。実験に用いた原水は、河川水をメンブレンフィルターでろ過した水に各種の処理対象物質を添加して原水を作成した。各種の処理対象物質は以下の通りである：粘土粒子としてカオリンとモンモリロナイト、ACとして粉末活性炭 (PAC)、超微細 PAC (SPAC)、5種類の MP {ポリアミド (PA)、光化学的に風化させた PA (PA-pw)、機械的に風化させた PA (PA-md)、ポリエチレン (PE)、ポリシリコン (PSi) }、およびウイルス (PMMoV, MS2)。CSF 試験は、11 L の原水が入ったビーカーで行った。凝集沈殿実験 (CS) は、凝集剤としてポリ塩化アルミニウム 3.0 mg-Al/L 注入し、急速攪拌 (G 値 600 s^{-1} , 100 秒)、緩速攪拌 (G 値 12.5 s^{-1} , 2400 秒間) を行い、60 分間静置した後の上澄み水を採取した。さらに、ビーカー内の上澄み水をポンプで砂ろ過器へ送液し、急速砂ろ過を行った。砂ろ過液は 0 分から 50 分まで採取し、粒子の種類ごとに粒子濃度を測定した。ウイルスはリアルタイム PCR によって定量した。

CSF による各対象物質の除去率は、PAC と SPAC で $4.6 \pm 0.2 \text{ log}$ 、PMMoV と MS2 で $3.5 \pm 0.3 \text{ log}$ 、PA、PE、PSi で $2.9 \pm 0.3 \text{ log}$ 、カオリンとモンモリロナイトで $2.8 \pm 0.2 \text{ log}$ であった。また、CS による PA-pw の除去率は 1.7 log 、PA-md の除去率は 1.1 log であった。急速砂ろ過による PA-pw 除去率は 0.5 log 、PA-md 除去率は 1.5 log であり、機械的/光化学的風化によって除去率に違いが生じた。CSF 処理による AC 粒子の除去率が粘土粒子の除去率よりも 2 桁ほど高いため、処理後の懸濁物質の組成は粘土粒子が支配的であった。また、PA、PE、PSi の除去率 ($2.9 \pm 0.3 \text{ log}$) は粘土粒子と同程度であり、十分な濁度除去が達成できれば、MP も同程度に除去できると考えられる。以上より、CSF による粘土粒子、AC、MP、およびウイルスの除去率が明らかとなった。

第 383 回雑誌会

(Oct. 6, 2022)

(1) Flocculation-based methods of microalgae removal from the eutrophic pond enrichment culture

Melnikova, A. A., Komova, V. A., Vasilev, A. R., Namsaraev, B. Z., and Gorin, V. K.
Water Supply, **21** (8), 4254-4262, (2021)

Reviewed by M. Kanai

藻類の大量発生は、淡水域や人口の多い地域に隣接する沿岸地帯の大きな問題の一つである。この問題とバイオマスの収集ならびに経済的で効率的な利用は、富栄養化の抑制において重要である。現在、高分子凝集剤の使用は、光栄養微生物のバイオマスを安価に回収する方法として期待されている。本研究では、さまざまな凝集剤や凝集処理で沈降したバイオマスをバラスト材として使用することによる光栄養微生物群集の凝集の有効性を検討した。試料は、ロシアのチェルノイストチンスキー池から採取し、改変 BG-11 培地で濃縮培養したものを原水として実験を行った。無機凝集剤には塩化第二鉄 (10~50 mg/L) を用い、高分子凝集剤としてポリアクリルアミド (PAA) 由来のノニオン系 Superfloc N-300, アニオン系 Superfloc A-100, カチオン系 Superfloc C-492 (各 25 mg/L), ポリエチレンオキサイド (PEO) 由来のカチオン系 Sibfloc-718 (2.5~25 mg/L) を用いた。250 mL の三角フラスコに原水を取り、各凝集剤を注入して 200 rpm で 3 分間攪拌後、室温で 120 分間静置した。原水中の光栄養微生物のバイオマスと細胞数を計数し、処理後、分光光度計を用いて工学密度 (OD) を測定し、除去率を算出した。

濃縮培養液中の光栄養微生物の総バイオマスは 29×10^{-3} g/L (乾燥重量) であり、このときの細胞数は 337×10^6 cells/L であった。総バイオマスの 91.8% は、*Acutodesmus* 属の単細胞緑藻で支配されていた。次に、凝集剤の有効性を確認するために、凝集実験を行ったところ、どの凝集剤においても、単一の使用では効果が得られなかった。しかし、塩化第二鉄 (注入率 50 mg/L) と Sibfloc-718 (注入率 25 mg/L) を組み合わせることによって、最初の 5 分でバイオマスの 90% が沈降し、120 分では 96% 以上が沈降した。さらに、最適注入率を検討したところ、塩化第二鉄が 30 mg/L, Sibfloc-718 が 2.5 mg/L の条件において凝集効率は 95.5% となった。最後に、塩化第二鉄が 15 mg/L, Sibfloc-718 が 2.5 mg/L の条件で沈降したバイオマスをバラスト材として処理体積の 1.7% 添加し、バラスト凝集実験を行った。その結果、塩化第二鉄と Sibfloc-718 の組み合わせの最適注入率は、それぞれ 15 mg/L と 1.25 mg/L となった。以上のことより、カチオン系凝集剤と無機凝集剤を併用することはバイオマス凝集に効果的であることがわかった。さらに、沈降したバイオマスをバラスト材として用いることで、凝集剤使用量を減らすことができ、コストの削減にもつながる。

第 384 回雑誌会

(Oct. 14, 2022)

(1) Transferability of ESBL-encoding IncN and IncI1 plasmids among field strains of different *Salmonella* serovars and *Escherichia coli*

Dorr M., Silver A., Smurlick D., Arukha A., Kariyawasam S., Oladeinde A.,
K. Cook and Denagamage T.

Journal of Global Antimicrobial Resistance, **30**, 88–95, 2022.

Reviewed by H. Xie

ESBL（基質特異性拡張型 β ラクタマーゼ）産生腸内細菌科、ESC（基質特異性拡張型セファロスポリン）産生腸内細菌科を含む薬剤耐性菌による感染症は、世界の公衆衛生にとって大きな脅威となっている。食用されている動物は、多くの薬剤耐性菌、耐性プラスミド、耐性遺伝子の主要な貯蔵庫であると考えられる。また、薬剤耐性菌は、異なる細菌属間や動物・ヒトの腸内でプラスミド交換によって伝播される可能性がある。本研究では、複数の *Salmonella* 属および *E. coli* の野外株間で、ESBL 遺伝子 *bla*_{CTX-M-I} 型保有する IncN および IncI1 プラスミドの伝播率を明らかに検討した。接合伝播実験のドナー株として、*bla*_{CTX-M-I} 型保有する ESBL 産生 *E. coli* 18 (IncN)、ESBL 産生 *S. Heidelberg* 18 (IncN)、ESBL 産生 *S. Heidelberg* 26 (IncI1) を使用した。レシピーとして *S. Enteritidis*、*S. Heidelberg*、*S. Saintpaul*、*S. Cero*、*S. Infantis*、*S. Braenderup*、*E. coli* 50 と *E. coli* 2010 を使用した。まず、ドナー株のプラスミドの塩基配列を解析した。次に、ドナー株とレシピーエント株を 1:10 の比率で、ブロスレーティング実験とフィルターメーティング実験を行った。伝播された株を用いて PCR および薬剤感受性試験により、ESBL プラスミドの伝播の有無を確認した。実験に使用・回収したすべての株は、DNA シーケンスによって解析した。

*bla*_{CTX-M-I} 型保有するレシピーエント菌への接合伝播は、*S. Heidelberg* 18 (IncN) と *Salmonella* 属の間で最も高い伝播率で接合され、伝播率は 10^{-4} か 10^{-5} の範囲で見られた。*E. coli* 18 (IncN) と *Salmonella* 属/*E. coli* のレシピーエント株が次に高い伝播率を示し、その範囲は 10^{-4} から 10^{-9} であることが分かった。*S. heidelberg* 26 (IncI1)、*S. Heidelberg* 18 (IncN) から *E. coli* レシピーエント株への接合における伝播率は 10^{-9} から 10^{-13} と低かった。*E. coli* 18 (IncN) と *E. coli* レシピーエント株への伝播率も 10^{-3} から 10^{-9} の範囲で低くなった。IncN プラスミドの平均伝播率は IncI1 プラスミドと比べて高く、伝播率はドナー株の種類によって大きく異なっていることが確認された。*Salmonella* 属のレシピーエント株は IncN 保有するドナー株からのプラスミドの接合に最も伝播しやすい傾向があったが、*E. coli* レシピーエントで低い率で接合伝播することが見られた。

(2) Annual trends and health risks of antibiotics and antibiotic resistance genes in a drinking water source in East China

Yaru, H., Lei, J., Yi, Z., Lei, J., Shijie, Y., Wang, Z., Kuangfei, L. and Changzheng, C. Science of the Total Environment, **791**, 148152 (2021).

Reviewed by Y. Ito

抗菌薬や薬剤耐性遺伝子 (ARG) の飲料水への混入が世界的に問題視されている。これまで飲料水源における抗菌薬及び ARG の汚染に関する研究が行われてきたが、比較的短期間の汚染に焦点を当てており、部分的な特徴を明らかにしただけであった。そこで本研究では、中国東部の飲料水源において、2015年から2017年の4季節にかけて抗菌薬と ARG の逐次モニタリングを実施した。試料採取は、飲料水源 27 地点の流入水と流出水から 4L ずつ採取した (計 54 個)。抗菌薬分析の前処理として、試料 1 L を 0.7 μm のフィルターで真空濾過し、固相抽出を行った。ARG の前処理は、試料 1 L を真空濾過した後、0.22 μm のフィルターでろ過し、最終的に Fast DNA SPIN キットを用いて DNA 抽出を行った。前処理後、抗菌薬は、UPLC-MS/MS を用いて測定した。抽出後の DNA は、qPCR 法を用いて定量した。対象とした抗菌薬は、スルホンアミド、テトラサイクリン、キノロンの 3 つのクラスを含む 11 種類とした。また、ARG は、41 種類の ARG サブタイプと 4 種類のインテグラーゼ遺伝子を調査した。

11 種類の抗菌薬および 18 種類の ARG サブタイプとクラス I インテグラーゼ遺伝子 *intI1* が検出された。総抗菌薬濃度は 2015 年 (96.47 ng/L) から 2017 年 (90.17 ng/L) にかけて僅かに減少した。一方、総 ARG 濃度は年平均 0.25 桁の増加傾向にあり、2017 年の総 ARG 濃度は、 6.1×10^5 copies/mL であった。総 ARG 濃度の増加は、主に *sul1*, *sul2*, *sul3*, *tetA*, *qnrB*, *ermB* などの特定の ARG サブタイプに起因するものであった。季節間の比較では、春の総抗菌薬濃度が他の 3 季節に比べて、1.6~2.3 倍に高く、冬の総 ARG 濃度は他の 3 季節に比べて、0.11~0.23 桁高かった。また、飲料水源の流入水と流出水における総抗菌薬濃度は、それぞれ 126.49 ng/L と 101.80 ng/L であった。総 ARG 濃度も同様に減少傾向であり、流入から流出にかけて 0.1 桁減少することがわかった。また、ほとんどの ARG は *intI1* 遺伝子と正の相関があった ($r = 0.47 \sim 0.55$, $P < 0.01$)。さらに、抗菌薬と ARG の変動は、水質指標、特に COD, BOD₅, NO₂-N の値と関連していると判定された ($P < 0.05$)。以上のことから、中国東部の飲料水源における抗菌薬濃度は、2015~2017 年にかけて僅かに減少したものの、ARG 濃度は増加傾向にあったことから、飲料水源の ARG による汚染はさらに深刻化していることがわかった。

第 385 回雑誌会

(Oct. 20, 2022)

(1) Sub-lethal photocatalysis promotes horizontal transfer of antibiotic resistance genes by conjugation and transformability

Ji, H., Cai, Y., Wang, Z., Li, G. and An, T.

Water Research, **221**, 118808, (2022).

Reviewed by S.Tamai

薬剤耐性遺伝子 (ARG) は新興の汚染物質であり、河川、下水処理場、および浄水場など様々な環境中に存在している。ARG は水平伝播によって新たな薬剤耐性菌の拡散を招くため、適切な処理が必要である。光触媒は、紫外光の吸収によって活性酸素 (ROS)・過酸化水素を発生させ、細菌を酸化分解する。この処理プロセスは、下水処理等に応用されている高度酸化技術である。しかしながら、一部の細菌は、処理水の水質変動によって致命的な損傷から逃れ、抗酸化酵素が活性化される。抗酸化酵素の活性化は、接合伝達を促進させることから、酸化処理細菌の水平伝播能を明らかにすることは極めて重要である。そこで本研究では、ドナー細菌 (セフトキシム (CTX), またはポリミキシン (MCR) 耐性 *E. coli* DH5 α) とレシピエント細菌 (ストレプトマイシン (Sm) 耐性 *E. coli* C600) に光触媒と紫外線を利用した酸化処理を行い、損傷した細菌の接合伝達能と形質転換能を評価した。また、ROS, 抗酸化酵素, ATP の活性, および水平伝播関連遺伝子の発現量を測定し、水平伝播との関連を評価した。

ドナー細菌のみに酸化処理を行った場合、DH5 α (CTX) と DH5 α (MCR) の接合伝達頻度は 10 分後に最大となり、コントロール試料と比較して、それぞれ 3 倍と 6 倍に増加した。また、ドナー細菌 (DH5 α (CTX)) に 0~120 分間、レシピエント細菌 (C600) に 10 分間の酸化処理を行ったところ、接合伝達頻度は 90 分後に最大となり、コントロール試料と比較して 22 倍に増加した。ドナー細菌、ならびにドナー細菌とレシピエント細菌の損傷は接合伝達頻度を増加させた。一方で、レシピエント細菌のみに酸化処理を行った場合、処理時間の経過とともに接合完了体数は減少した。レシピエント細菌の損傷は接合伝達頻度を低下させることがわかった。続いて、ドナー遺伝子として、酸化処理によって DH5 α (MCR) から放出された細胞外プラスミド、レシピエント細菌として、DH5 α と酸化処理後の C600 を使用して形質転換実験を行ったところ、DH5 α のみで形質転換体が確認された。酸化処理された細菌は、レシピエントとしては機能しないが、放出されたプラスミドによる形質転換が可能であった。細菌の ROS 量, 抗酸化酵素, ATP 量, および遺伝子の発現量の傾向は、接合伝達頻度の傾向と一致しており、酸化処理は細菌の接合伝達を促進させた。これらの結果は、水環境中での水平伝播のリスク評価の改善に寄与する。

(2) Comparison of rhizosphere bacterial communities of reed and *Suaeda* in Shuangtaizi River Estuary, Northeast China

Zhang, X., Zhang, L., Zhang, L., Ji, Z., Shao, Y., Zhou, H., Bao, Y., Qu, Y., Liu, L.
Marine Pollution Bulletin, **140**, 171–178, (2019).

Reviewed by W. Sugiyama

湿地土壌中の微生物は、有機物の分解や栄養塩の循環などの生態学的に重要な役割を担っている。また、湿地に繁茂する植物の根圏は微生物の生息場として機能している。土壌の化学特性や植物種は、根圏微生物群集の構成に影響することが知られているが、湿地植物の植物種が根圏微生物群集の構成や機能に与える影響についての知見はほとんどない。そこで本研究では、湿地植物の根圏微生物群集を明らかにし、その構成と機能を植物種ごとに比較することを目的とした。中国北東部・双台子川河口の *Suaeda* 繁茂地帯 (*Suaeda*)、ヨシ繁茂地帯 (Reed)、*Suaeda*・ヨシ混生地帯 (Hybrids) の 3 地点から土壌試料と水試料を採取した。各試料について、化学特性 (pH, TOC, TP, TN, NO₃⁻-N, NO₂⁻-N, NH₄⁺-N) を測定した。さらに、土壌試料から DNA を抽出後、16S rRNA 遺伝子を標的とした次世代シーケンシング法によって微生物群集を解析した。また、PICRUST 解析によって微生物群集の代謝機能を予測した。

化学分析の結果、各試料の pH はいずれも 8.0 以上であり、Reed 土壌が最も高いアルカリ性を示した。次に、土壌試料の菌叢解析の結果、*Suaeda* は Reed よりも α 多様性指数 (Shannon-Weiner 指数, 均等性指数) が高かった。また、非計量的多次元尺度構成法によって試料間の微生物群集構造を解析した結果、各試料の微生物群集はそれぞれ異なっていた。さらに、微生物群集構造と化学特性の関係を評価するために正準対応分析を行った結果、水中の pH, TP, TN および NO₃⁻-N が微生物群集の構成に大きく影響する可能性が示された。門レベルでは、各試料で *Proteobacteria* 門 (45.7~58.0%) が最も優勢で、次いで *Bacteroidetes* 門 (7.1~12.4%), *Actinobacteria* 門 (6.1~8.5%) が多くみられた。また、*Suaeda* では Reed と比較して *Proteobacteria* 門が多く、*Actinobacteria* 門と *Firmicutes* 門は少なかった。属レベルでは、*Suaeda* と Hybrids では *Thiopfundum* 属が、Reed では *Exiguobacteria* 属が最も多く検出された。続いて、PICRUST 解析によって微生物群集の代謝機能を予測した結果、各試料において、アミノ酸代謝、炭水化物代謝、膜輸送に関する機能遺伝子が検出された。さらに、各試料から、安息香酸やナフタレンなどの汚染物質の分解に関連する機能遺伝子や、窒素代謝および硫黄代謝に関連する機能遺伝子が多く検出された。本研究の結果は、湿地植物における根圏微生物群集の構造や代謝機能の解明に寄与する。

第 386 回雑誌会

(Oct. 27, 2022)

(1) Pathogen and surrogate survival in relation to fecal indicator bacteria in freshwater mesocosms

Baker, A., Almeida, G., Lee, J. and Gibson, E.

Applied and Environmental Microbiology, **8**, 1-14, 2021.

Reviewed by Y Kato

灌漑用水を介して、ヒトの健康に害となる病原体が生鮮食品に混入する可能性をひめていることは、従来から認識されている。一般的な大腸菌と腸球菌は、病気を引き起こす病原体と同様の生存特性を持つとされ、健康リスクの予測因子となる糞便指標細菌 (FIB) として長い間採用されてきた。しかし、実際にヒトが感染している病原体の定量化の事例は少なく、病原体と FIB の関連研究は、淡水域およびその堆積物ともに限られているのが現状である。そこで本研究では、水および堆積物メソコスムにおける FIB (大腸菌, 腸球菌), 代替物質 (*Listeria innocua*, *Listeria seeligeri*, *Salmonella enterica serovar Typhimurium*, PRD1), 病原体 (病原大腸菌, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella serovars*) の生残時間の評価を目的とした。水サンプルは、アーカンソー州北西部のホワイト川とビーバー湖から、堆積物サンプルはウェディントン湖とイリノイ川からそれぞれ採取した。メソコスム実験については、採取した水と堆積物を混合し、各メソコスム内に 100 ml あたり 8 log CFU または PFU の微生物 (大腸菌, 腸球菌, 病原性大腸菌, *S. serovars*, *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. monocytogenes*) を任意の組み合わせで接種した。メソコスムにおける細菌の生残性実験は、春, 夏, 秋, 冬の各シーズンで 28 日間行われ、最初の 7 日間は毎日、その後は毎週サンプル (底質/水) を採取して菌数を計数した。なお、この実験は連続式で行われた。FIB 大腸菌・腸球菌に対する病原微生物の生存率を比較するために曲線下面積 (AUC) を求めた。

サンプルの種類と季節がすべての微生物の生存に影響を与えていることが確認された。湖沼と河川のメソコスムでは、生残率の差はほとんど見られなかった。しかし、水中と堆積物中での微生物の生残率を比較すると、堆積物中の微生物の方が水中よりも 2.2 倍ほど有意に長く生存した。FIB 大腸菌の生残期間は、この研究で評価した病原性細菌の生存期間よりも長く、FIB 腸球菌の生残期間は短かった。曲線下面積の差を用いて、FIB に関連する病原体および代替物質の生残率を比較すると、試料の種類や季節の影響にかかわらず、病原性 *Salmonella* 属菌の生残率は FIB 大腸菌と同様であり、*L. monocytogenes* と病原性大腸菌の生残率は FIB 腸球菌とも同様であった。以上より、堆積物中の病原体の蓄積と生存に関連する潜在的なリスク、ならびに生鮮食品の生産に使用される農業用水汚染の可能性が示唆された。

(2) Differential survival of potentially pathogenic, septicemia- and meningitis-causing *E.coli* across the wastewater treatment train

Daniel, Yu., Kanghee, Ryu., Simon, J.G. otto., Paul, Stothard., Graham, Bantng., Norma, Ruecher., Norman, F. Neumann., and Shuai, Zhi.

Npj clean water, 5, 33 (2022).

Reviewed by R. Matsuyama

下水処理は、水質保全や微生物による汚染を防止する上で重要な役割を持つ。しかしながら、一部の腸管外病原性大腸菌（ExPEC）は、下水処理プロセス後も生存可能であると予測されている。そこで本研究では、下水処理場に存在する大腸菌の ExPEC 毒性調査を行い、血液媒介性大腸菌（BBEC）と新生児髄膜炎性大腸菌（NMEC）の下水処理耐性の獲得について検討した。試料は、カナダの下水処理場の紫外線消毒後放流水から、排水処理耐性株を単離した。さらに、下水処理場から流入水を回収し、米国環境保護庁（EPA）の試験手順に従い、塩素消毒を行い、処理後の試料から塩素耐性株を単離した。回収された単離株は、菌種同定を行い、大腸菌と判定された株からゲノム DNA を抽出した。ゲノム DNA は PCR 試験に供し、 ExPEC 関連病原遺伝子保有を検査した。また *uspC-IS30-flhDC* マーカーを用いて帰化排水大腸菌を判定し、除外した。3 つ以上の ExPEC 関連病原遺伝子、新生児髄膜炎性大腸菌（NMEC）関連 *ibeA* 遺伝子、または ExPEC 関連 ST131 遺伝子を保有する株を推定排水 ExPEC 株とし、全ゲノムを解析した。血液由来菌血症、髄膜炎に関連する臨床 ExPEC（C-ExPEC）株とのコアゲノム SNP 解析、ペアワイズ全ゲノム比較を行った。また、推定排水 ExPEC 株と C-ExPEC 株との系統学的な分類を行い、推定排水 ExPEC 株と C-ExPEC 株の病原性遺伝子（VG）、薬剤耐性遺伝子（ARG）の組成を比較をした。

無作為に回収された排水大腸単離株 637 株のうち、247 株が ExPEC 関連遺伝子を少なくとも 1 つ以上保有していた。その中で最も一般的な病原遺伝子は、*fyuA* および *chuA* であった。推定排水 ExPEC 株は 86 株検出され、C-ExPEC 株とコアゲノム類似性を比較した結果、37 株の推定排水 ExPEC 株が高い類似性を示した。アクセサリーゲノムクラスタリングツリー解析による系統学的分類の結果、推定排水 ExPEC 株は、C-ExPEC 株とクラスター化された。推定排水 ExPEC 株は C-ExPEC 株と類似した VG を保有していた。さらに、推定排水 ExPEC 株は C-ExPEC 株と類似した ARG プロファイルも確認された。以上の結果から、髄膜炎や敗血症を引き起こす大腸菌は、下水処理プロセス後も生存し、下水処理場放流水中において病原性が伝播している可能性があることが示唆された。

第 387 回雑誌会

(Nov. 10, 2022)

(1) Occurrence of Extended Spectrum Cephalosporin-, Carbapenem- and Colistin-Resistant Gram-Negative Bacteria in Fresh Vegetables, an Increasing Human Health Concern in Algeria

Lotfi, L., Bendjama, E., Cherak, Z., Bendahou, M., Rolain, J.

Antibiotics, Volume 11, doi.org/10.3390/antibiotics11080988 (2022).

Reviewed by T. Horita

カルバペネムとコリスチンは、多剤耐性 (MDR) 細菌感染症の治療において、広く認識されている強力な抗菌薬である。これら抗菌薬の使用増加に伴い、カルバペネム耐性およびコリスチン耐性を持つ細菌が世界的に急速に増加している。これら耐性菌は、人間、水生環境、動物、食品など、多くの場所からの検出が、世界中の論文から報告されている。しかしながら、新鮮な野菜におけるカルバペネムおよびコリスチンの耐性遺伝子の保有に関する研究はほとんどない。そこで本研究では、新鮮な野菜からカルバペネム、およびコリスチン耐性のグラム陰性菌をスクリーニングし、耐性メカニズムを調査した。調査は、アルジェリアのベジャイアで実施した。サンプルは、アルジェリア 27 箇所の野菜市場から 9 種類の野菜を計 400 個収集した。各野菜サンプルを滅菌ナイフで細かく裁断し、滅菌生理食塩水と混合して懸濁液を作成した。段階希釈をした懸濁液を 64 $\mu\text{g/mL}$ バンコマイシンを含む Brain-Heart Infusion Broth に接種し、37°C で 18~24 時間培養した。培養液をマッコンキー寒天に画線し、37°C で 18~24 時間培養した。培養した菌株は、マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析法 (MALDI-TOF-MS) で菌種同定を行った。単離株について、Kirby-Bauer ディスク拡散試験を使用した薬剤感受性試験を実施した。また単離株の ESBL 産生菌のスクリーニングをダブルディスク法、カルバペネマーゼ産生の有無を Carba NP test で判定し、マルチプレックス PCR 法で遺伝子型を決定した。

野菜試料からブドウ糖発酵菌が 53 株、ブドウ糖非発酵菌が 14 株、計 67 株のグラム陰性菌株が単離された。得られたブドウ糖発酵菌の 37.7% (20/53 株) はコリスチンに対して耐性を示した。コリスチン耐性株のうちの 6 株は、固有の耐性表現型を示した。PCR 試験の結果、単離株の 38.8% (26/67 株) から β -ラクタマーゼ遺伝子が検出された。Carba NP test では、カルバペネム系抗菌薬に耐性を持つ 5 株でカルバペネマーゼ産生が確認され、カルバペネマーゼ遺伝子を保有することが確認された。この研究では、新鮮な野菜に拡張スペクトルのカルバペネム、およびコリスチン耐性を保有するグラム陰性菌の存在が確認された。したがって、食品の安全性と消費者の健康を確保するために、生鮮野菜中の薬剤耐性菌に関するさらなる調査を実施する必要がある。

(2) Influence of ballasted material properties in enhancing the separation of high concentration suspended solids in coal mining water

Zhang, X., Liu, Y., Wei, M., Tan, J., Yang, T., and He, X.

Process Safety and Environmental Protection, **157**, 458-465, (2022).

Reviewed by M. Kanai

近年、中国の石炭鉱業は持続的な技術の進歩と経済発展によって生産効率が向上している。その影響で炭鉱排水中の浮遊物質が増加している。浮遊物質はサイズが小さく、集中的に分布するため従来の凝集沈殿では排水水質の悪化や沈殿槽内の傾斜管でフロックが堆積するなどの課題が生じる。そこで本研究では、水圧と衝撃荷重に強いバラスト凝集プロセスに着目した。バラスト投入によるフロックの形状変化と沈降速度向上のメカニズムを探るため、石炭泥（中国河北省邯鄲市の炭鉱排水処理プラントから採取）と水道水を混合した試料水を用いて、最適条件（無機凝集剤、高分子凝集剤、バラスト材の注入率および各槽の攪拌速度）を検討し、各条件での処理能力を濁度除去率（TRR）とSS除去率（SRR）から評価した。また、フロックの沈降速度の理論式を導出し、実験的に検証した。無機凝集剤にはポリ塩化アルミニウム（PAC）、ポリ硫酸第二鉄、硫酸アルミニウム、塩化第二鉄、高分子凝集剤にはポリアクリルアミド系の3種類（アニオン性、ノニオン性、カチオン性）、バラスト材には磁性材（100～500 Meshes）を用いた。

4種類の無機凝集剤のうち、PAC（注入率 160 mg/L）において TRR は 75.5% となり、SRR も高かったことから、PAC を最適な凝集剤として選定し、最適条件は 60 mg/L とした。高分子凝集剤は注入率 0.6 mg/L 以上の場合、3種類ともに TRR 90%以上を推移していたことから、費用対効果に優れるアニオン性を最適な高分子凝集剤として選定し、最適条件は 2 mg/L とした。バラスト材は3種類のうち 100 Meshes が TRR, SRR ともに 95%以上を推移していた。よって、バラスト材は 100 Meshes とし、最適条件は 0.6 g/L とした。しかし、バラスト材の大きさや注入率によって TRR, SRR の有意差は確認されなかった。この結果は、バラスト材の大きさや注入率は他の材料と比較して TRR, SRR にほとんど影響を与えないことを示唆している。沈降時間はバラスト材なしの条件においても、長時間静置することで TRR, SRR ともに上昇するが、バラスト材ありの場合は 15 秒で TRR, SRR ともに 95%に達した。また、凝集槽、注入槽、フロック形成槽の攪拌強度については、徐々に回転数を減らすことが望ましいため、最適条件は 300, 200, 110 rpm とした。この最適条件において、得られた沈降速度と導出した式で計算した沈降速度はほぼ一致した。したがって、導出した式は最適条件下での沈降速度を正確に定量することが可能である。

第 388 回雑誌会

(Nov. 24, 2022)

Simultaneous powdered activated carbon and coagulant injection during ballasted flocculation for trace benzene removal from diesel and gasoline-contaminated surface waters

Okoro, O., Lompe, K., Papineau, I., Sollicc, M., Fradette, L., Barbeau, B.

Journal of Water Process Engineering, **40**, 101846 (2021).

Reviewed by K. Takahashi

石油流出事故後、表流水中には微量の溶存 BTEX (ベンゼン, トルエン, エチルベンゼン, キシレン) が残存することが予想される。一方で、凝集沈殿法によって BTEX のような溶解した芳香族化合物を除去するためには、吸着剤として粉末活性炭 (PAC) の添加が必要である。そこで本研究では、粉末活性炭 (PAC) とバラスト凝集の組み合わせによる微量 BTEX の除去効率を明らかにすることを目的とした。処理の対象とした試料水は、ケベック州で採取した河川水 2.74 L にディーゼル燃料 150 mL を添加したディーゼル汚染水 (BTEX 濃度: 60 $\mu\text{g/L}$, ベンゼン: 12 $\mu\text{g/L}$) および、ガソリン 4 mL を添加したガソリン汚染水 (BTEX 濃度: 60 $\mu\text{g/L}$, ベンゼン: 12 $\mu\text{g/L}$) とした。PAC の最適注入率は吸着等温線試験によって求めた。バラスト凝集試験は、PAC (0 mg/L または最適注入率) と凝集剤 (ミョウバン: 4.9 mg-Al/L, または硫酸第二鉄: 10 mg-Fe/L) を同時に注入し、212 rpm で攪拌し、2 分後にマイクロサンド (8 g/L) とカチオン性ポリアクリルアミド (PAM, 0.11 mg/L) を注入した。2 分間攪拌後に、さらに PAM (0.11 mg/L) を注入し、10 分間 212 rpm で攪拌し、3 分間静置した後の上澄み水を採取した。BTEX の分析はガスクロマトグラフ-質量分析計を使用した。

凝集剤にミョウバンや硫酸第二鉄のみを用いたバラスト凝集では、ディーゼル汚染水とガソリン汚染水のベンゼンをケベック州の規制値 (0.5 $\mu\text{g/L}$) 以下の濃度に除去することはできなかった。そこで、PAC とバラスト凝集の組み合わせによる処理を検討した。PAC の注入率は、吸着等温線の実験結果から、ベンゼンが 0.5 $\mu\text{g/L}$ 以下となる 80 mg-PAC/L に設定した。バラスト凝集に PAC と硫酸第二鉄を併用すると、2 つの汚染水においてベンゼンを 0.5 $\mu\text{g/L}$ 以下に除去できた。一方で、PAC とミョウバンの併用では、ベンゼン濃度を 0.5 $\mu\text{g/L}$ 以下にすることができなかった。この原因は、ミョウバンによって PAC の間隙が閉塞したと考えられる。以上の結果から、バラスト凝集による BTEX の除去には高濃度の PAC の注入が必要であり、BTEX の除去を改善するためには、凝集剤注入前に PAC を注入する必要がある。

第 389 回雑誌会

(Dec. 1, 2022)

(1) **The Efficient and Practical virus Identification System with ENhanced Sensitivity for Solids (EPISENS-S): A rapid and cost-effective SARS-CoV-2 RNA detection method for routine wastewater surveillance**

Ando, H., Iwamoto, R., Kobayashi, Y., Okabe, S., Kitajima, M.

Science of the Total Environment, **843**, 157101 (2021).

Reviewed by R. Nakamura

SARS-CoV-2 を原因とする COVID-19 が世界中で大流行し、1000 万人以上が死亡している。罹患者の多い地域の下水から SARS-CoV-2 RNA が検出されたと報告されている。しかし、罹患者が少ない地域の下水中から SARS-CoV-2 RNA を検出する為には、従来法では感度が不十分である。そこで、本研究では EPISENS-S 法と呼ばれる SARS-CoV-2 RNA 新規検出方法の開発を目的とした。下水試料は、札幌市内の下水処理場（A 処理場: n = 19, B 処理場: n = 18）から 2021 年 3 月 4 日～7 月 9 日の期間で各 1 L 採取した。下水試料 40 mL に対して遠心分離（10000×g, 10 min）を行い、その後、ペレットから直接 RNA を抽出し、逆転写 qPCR 法により検出・定量した。これを EPISENS-S 法と称し、コントロール試料として SARS-CoV-2 と同時に PMMoV も定量した。また、従来法の PEG-QVR-qPCR 法と比較した。初めに、5 つの RNA 抽出キットを用いて、ペレットから RNA を適切に抽出可能なキットを検討した。次に、下水試料 1 L に不活化 SARS-CoV-2 をスパイクし、異なる濃度（ $2.11 \times 10^3 \sim 10^6$ copies/L）の試料を作製した後、EPISENS-S 法と PEG-QVR-qPCR 法の検出感度の比較を行った。その後、下水処理場の実下水への EPISENS-S 法の適用、ならびに札幌市内の COVID-19 新規感染者数と実下水中の SARS-CoV-2 RNA の相関を確認した。

RNA 抽出キットは、コスト（10.54 \$/1 個）、処理時間（1~2 時間）、及び定量性（Ct=38.02）から、RNeasy PowerMicrobiome キットを選択した。PEG-QVR-qPCR 法は、SARS-CoV-2 RNA の濃度が 2.11×10^4 copies/L 以下では全く検出されなかった。一方において、EPISENS-S 法は、SARS-CoV-2 RNA の濃度が 2.11×10^4 copies/L の場合でも検出が可能であった。また、EPISENS-S 法を実下水に適用し、PMMoV と SARS-CoV-2 を定量したところ、各濃度は A 処理場でそれぞれ 5.05×10^7 copies/L と 2.19×10^3 copies/L, B 処理場でそれぞれ 2.56×10^7 copies/L と 2.34×10^3 copies/L であり、実下水に対しても適用可能であった。さらに、札幌市内の COVID-19 新規感染者数と実下水中の SARS-CoV-2 RNA の濃度には高い相関（ピアソンの相関係数 $r = 0.83$ ）が認められた。これらの結果から、EPISENS-S 法によって、罹患者が少ない地域でも下水疫学における COVID-19 の感染動態の追跡が可能であることがわかった。

(2) Residual seawater from salt production (bittern) as a coagulant to remove lead (Pb²⁺) and turbidity from batik industry wastewater

Soedjono, E. S., Slamet, A., Fitriana, N., Sumarlan, M. S., Supriyanto, A. Ratri, D., Isnadina, M., and Othman, N. B.

Heliyon, 7 (11) , e08268 (2021)

Reviewed by M. Kanai

インドネシアの特産品であるバティックの生産では、合成染料を用いた染色やすすぎなどの工程で高濁度の排水が発生する。高濁度の排水は、受水域の光合成を阻害し、生態系に影響を与える。また、合成染料には鉛などの重金属が含まれている。鉛は、人体に入り込むと脳などに機能障害を及ぼす危険性がある。そこで本研究では、バティック工場排水から鉛と濁質を除去するために凝集沈殿実験を行った。凝集剤としてにがりを用い、鉛と濁度の除去率からにがり注入率と急速攪拌の速度の最適条件を検討した。バティック工場排水（濁度：500 NTU, pH：11, 鉛濃度：6.34 mg/L）はインドネシアの東ジャワ州の工場から入手し、にがりには東ジャワ州にある塩田から入手した。実験は200 mLの排水を取り、にがりを5, 15, 25, 35% (v/v) 注入し、ジャーテスターを用いて5分間の急速攪拌（55, 90, 125 rpm）、15分間の緩速攪拌（30 rpm）後に60分間静置させた。静置後、上澄み水の濁度を測定し、鉛の残留濃度は上澄み水をろ過した後に、原子吸光度計を用いて測定した。さらに、にがり注入率と急速攪拌速度の変動が鉛や濁度の除去に及ぼす影響を二元配置分散分析法で統計的に解析した。その後、応答曲面法（RSM）を用いたデータ処理の結果からにがり注入率と急速攪拌速度の最適条件を検討した。

鉛除去率は、すべてのにがり注入条件、急速攪拌条件において98%以上であった。最大鉛除去率はにがり注入率：35%、急速攪拌速度：55 rpmにおいて99.3%であった。除去率が高い理由として、にがりに多量に含まれる硫酸イオン（SO₄²⁻）と塩化物イオン（Cl⁻）が鉛（Pb²⁺）と反応してPbSO₄やPbCl₂として沈殿したことが考えられる。統計解析の結果、鉛除去率はにがり注入率、および急速攪拌速度の変動との間に有意な影響はなかった（ $p > 0.05$ ）。また、濁度除去率は、すべてのにがり注入条件、急速攪拌条件において90%以上であった。最大濁度除去率の条件は、にがり注入率：15%、急速攪拌速度：125 rpmであり、このときの除去率は96.6%であった。統計解析の結果、濁度除去率においても、にがり注入率、および急速攪拌速度の変動との間に有意な影響はなかった（ $p > 0.05$ ）。さらに、応答曲面法を用いて最適条件を検討したところ、最適条件はにがり注入率：25%、急速攪拌速度：55 rpmとなり、鉛除去率は99.13%、濁度除去率は93.13%であった。