

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：82101

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2011～2014

課題番号：23681005

研究課題名(和文) 微生物によるヒ素の環境動態変化に及ぼす抗生物質の影響の解明

研究課題名(英文) Effects of antibiotics on the microbial arsenic cycle in aquatic environments

研究代表者

山村 茂樹 (Yamamura, Shigeki)

独立行政法人国立環境研究所・地域環境研究センター・主任研究員

研究者番号：90414391

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,100,000円

研究成果の概要(和文)：ヒ素の環境動態に深く関わる微生物によるヒ酸塩〔As(V)〕還元及び亜ヒ酸塩〔As(III)〕酸化に着目し、それらに及ぼす抗生物質の影響を湖沼等の底泥を用いたマイクロコスム試験により評価した。その結果、好気環境でのAs(V)還元を担うヒ素耐性細菌は、種々の抗生物質耐性を持ち、抗生物質存在下でも旺盛なAs(V)還元が生じることが明らかとなった。一方で、As(III)酸化細菌は、クロラムフェニコールなどによって活動が阻害されることが明らかとなった。従って、ある種の抗生物質が好気環境に流入した場合、ヒ素の酸化・還元のバランスが崩れ、その動態が不溶化から可溶化へシフトする可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We investigated the effects of antibiotics on microbial arsenate (As(V)) reduction and arsenite (As(III)) oxidation in sediments collected from a small pond and a eutrophic lake. The As(V)-reducing activities were less susceptible to chloramphenicol in aerobic conditions than in anaerobic conditions. Aerobic As(V) reduction proceeded in the presence of diverse types of antibiotics. In contrast, some antibiotics strongly inhibited aerobic As(III) oxidation. These results indicate that the aerobic As(III) oxidizers in the sediment are more sensitive to certain types of antibiotics than the aerobic As(V) reducers. Our results suggest that antibiotic disturbance of environmental microbial communities affects the biogeochemical cycle of As.

研究分野：環境工学、環境微生物学

キーワード：ヒ素 環境動態 抗生物質 耐性細菌 ヒ酸塩 亜ヒ酸塩

1. 研究開始当初の背景

抗生物質を含めた医薬品が広範な水環境から検出されており、環境中における薬剤耐性細菌の発生や耐性遺伝子の伝播・拡大などが憂慮されている。一方、その影響は微生物の群集構造にも及び、物質の挙動を大きく変化させる可能性がある。

ヒ素は、自然環境中に低濃度で広く存在しているが、一様に分布しているわけではなく、高濃度で偏在している場合もある。ヒ素のような毒性を持つ微量元素の場合、微生物を介した環境動態の変化がヒトの健康影響に直結する恐れがある。即ち、抗生物質の環境中への流入には、ヒ素による水環境汚染を副次的に助長するリスクが潜在する。しかし、国内外を問わず、その可能性を検討した研究例はこれまでになく、実際に抗生物質がヒ素の環境動態にどのような影響を与えるかについて、ほとんど知見が得られていない。

2. 研究の目的

自然環境中のヒ素は、大部分が無機態であるヒ酸塩〔As(V)〕と亜ヒ酸塩〔As(III)〕の形で存在するが、As(V)は吸着性が高いため、土壌や底泥中ではFe(III)やAl酸化物によって固相に保持され易い。地下帯水層や湖沼底泥のような嫌気環境では、As(V)が吸着性の低いAs(III)へと還元されることによってヒ素の可溶化、即ち水相への移動が生じ、As(V)還元細菌が反応の中心的役割を果たしている。しかし、著者らの最近の研究から、従来はヒ素が固相に保持されやすいと考えられていた好気環境においても、As(V)還元を介した可溶化が起こり得ることが明らかとなってきた。一方、好気環境では、As(III)酸化細菌が旺盛に活動しているため、ヒ素の可溶化と不溶化が繰り返し起きることで、結果的には固相に保持されている可能性も示されている。これは、抗生物質の流入により微生物生態系が変遷した場合、ヒ素の動態が大きくシフトする可能性を秘めているといえる。そこで本研究では、環境中におけるヒ素の可溶化/不溶化に大きく関与するAs(V)還元及びAs(III)酸化に着目し、各種の抗生物質がこれらの微生物反応に及ぼす影響を評価した。

3. 研究の方法

(1) As(V)還元及びAs(III)酸化試験

国立環境研究所構内の池、霞ヶ浦及びその流入河川の一つである恋瀬川から採取した底泥サンプルをTris-HClバッファー(pH 7.2)で3回洗浄し、固相と液相の容積比がほぼ1:1となるよう同バッファーと混和した底泥懸濁液を微生物植種源として用いた。

池底泥を用いた実験では、50mL容量バイアルビンに分注したAs(V)もしくはAs(III)を含む乳酸無機塩培地20mL(pH 7.2)にクロラムフェニコール(CP)を終濃度50mg/Lとなるよう加え、底泥懸濁液1mLを接種して好気及び嫌気の両条件下において振盪培養を

行った。また、対照として、CPを加えずに同様の実験を行った。

霞ヶ浦及び恋瀬川底泥を用いた実験では、三角フラスコに分注したAs(V)を含む乳酸無機塩培地200mLにクロラムフェニコール(CP)、テトラサイクリン(TC)、エリスロマイシン(EM)、リンコマイシン(LCM)、もしくはアンピシリン(ABPC)を加え、底泥懸濁液5mLを接種して好気条件下において振盪培養を行った。また、対照として、抗生物質を加えずに同様の実験を行った。

実験期間中、適時サンプリングを行い、溶液中のAs(V)及びAs(III)濃度をイオンクロマトグラフィーにより、全As濃度をICP-AESにより測定した。

(2) 細菌群集構造の解析

霞ヶ浦底泥を用いた実験サンプルから全DNAを抽出した。抽出したDNA試料を鋳型として、16S rRNA遺伝子の一部領域を対象とするプライマーセット341f/911r及びAs(III)酸化酵素遺伝子(*aioA*)の一部領域を対象とするプライマーセットaoxBM1-2F/aoxBM3-2Rを用いてPCRを行った。得られた遺伝子断片をもとに、16S rRNA遺伝子及び*aioA*遺伝子のクローンライブラリを構築した。各サンプルでそれぞれ90クローン程度を無作為に抽出し、塩基配列を決定した。決定した16S rRNA遺伝子の塩基配列をRibosomal database projectのRDP classifierにより系統分類し、各サンプルの細菌叢を比較した。また、*aioA*遺伝子はMEGA5を用いて系統解析を行った。

4. 研究成果

(1) 好気及び嫌気環境におけるAs(V)還元/As(III)酸化に及ぼすCPの影響

環境微生物によるヒ素の酸化還元に及ぼす抗生物質の影響を網羅的に調べるために、池底泥を用いた活性試験を好気及び嫌気の両条件下で行った。なお、ここでは、比較的広い抗菌スペクトルを持つCPを添加抗生物質として用いた。

好気条件下においてAs(V)還元試験を行った結果を図1に示した。CPを加えていない対照系では、実験開始直後に速やかなAs(V)の減少及びAs(III)の生成が見られ、底泥微生物による活発なAs(V)還元が確認された。実験後期には、As(V)濃度が増加へと転じ、それに伴うAs(III)の減少が認められたことから、一旦還元されたヒ素が酸化される現象が起きていた。これに対してCPを加えた実験系では、As(V)の還元は認められたものの、その後のAs(V)及びAs(III)濃度に変化はなかった。同様の条件で行ったAs(III)酸化試験でも、CPの添加によってAs(III)酸化が強く阻害されることが確認された。これらの結果から、好気条件下では、CPによってAs(V)還元が起こり易くなることが示された。

ここで、好気性細菌によるAs(V)還元には、ヒ素耐性機構(Arsenic resistance system)

と呼ばれる耐性メカニズム中の遺伝子が関わっていると考えられている。一般に、ヒ素などの金属耐性遺伝子は、薬剤耐性プラスミド(R プラスミド)に含まれる事が多いため、金属耐性細菌は抗生物質に対する共耐性を示す場合がある。実際に、ヒ素耐性遺伝子を含む R プラスミドの存在も知られている。従って、ここで得られた結果は、CP が選択圧となって、As(V)還元能を持つ好気性ヒ素耐性細菌が、間接的に優先化されたことを示唆している。また、CP 耐性を持たない As(III)酸化細菌が阻害を受け、結果として As(V)還元のみが生じたものと考えられた。

一方、嫌気条件での同様の実験では、好気条件とは異なり CP を加えていない対照系でのみ As(V)の還元が見られ、CP の添加で As(V)還元が強く阻害された(図2)。また、全ての系において、As(III)の酸化は確認されなかった。従って、嫌気条件では、As(V)還元へのヒ素耐性細菌の寄与率は低く、CP によって As(V)を嫌気呼吸に用いる異化型 As(V)還元細菌の活性が阻害された結果、As(V)還元が起き難くなると考えられた。

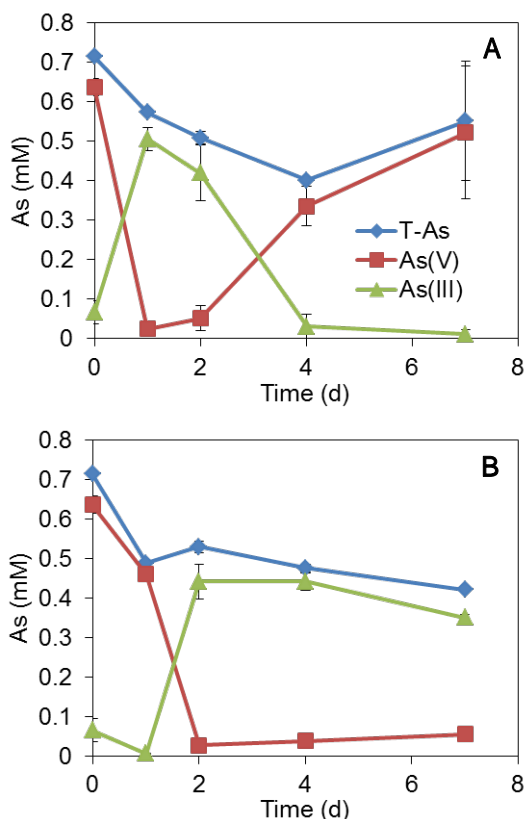


図1 好気条件下におけるAs(V)還元及びAs(III)酸化に及ぼすCPの影響(A;CPなし,B;CPあり)

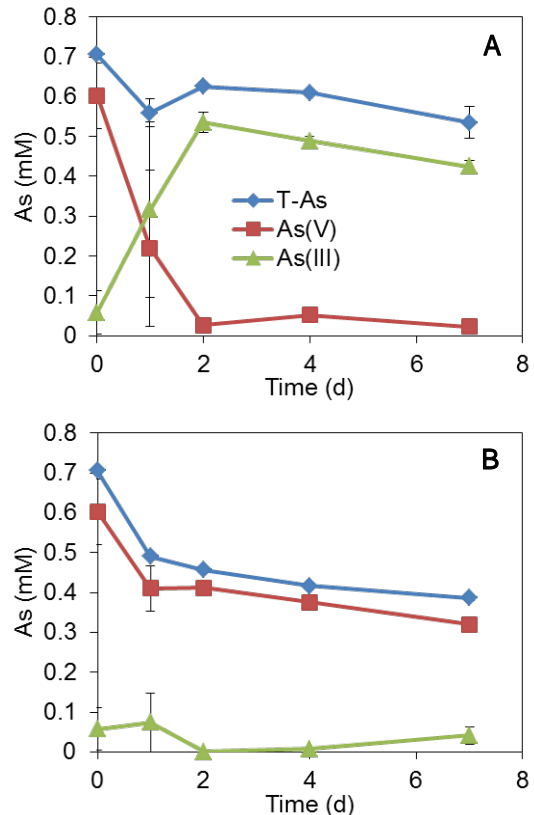


図2 嫌気条件下におけるAs(V)還元に及ぼすCPの影響(A;CPなし,B;CPあり)

(2) 好気環境におけるAs(V)還元/As(III)酸化に及ぼす各種抗生物質の影響

先の実験で、抗生物質によって好気環境でのヒ素の酸化・還元のバランスが大きく崩れる可能性が示唆されたことから、構造の異なる5種類の抗生物質を用いて、As(V)を含む培地で好気条件下でのマイクロコズム試験を行った。

霞ヶ浦底泥を用いて試験を行った結果、抗生物質を加えていない対照系では、開始直後から大幅なAs(V)の減少とAs(III)の生成が見られ、底泥微生物によって速やかにAs(V)が還元されていた(図3)。実験開始4日後には、As(V)濃度が増加へと転じ、それに伴うAs(III)の消失が認められたことから、As(III)の酸化も起きていた。抗生物質を加えた実験系においても、As(V)の還元は全ての系で認められた。従って、この結果から、ヒ素耐性細菌が種々の抗生物質に対する共耐性を持つことが示唆された。CP、TC及びABPCを添加した系では、その後のAs(III)酸化の開始に遅れが生じ、なかでもCPによって強く阻害される結果となった(図3)。このことから、As(III)酸化細菌はAs(V)還元能を持つヒ素耐性細菌と異なり、抗生物質による影響を比較的受けやすい可能性が示された。

恋瀬川底泥を用いた同様の実験でも、As(V)還元は全ての系において認められた。一方、生成したAs(III)の酸化は、CP、TC及びABPCによって若干の阻害を受けたものの、霞ヶ浦底泥と比べて速やかに見られた。

従って、As(III)酸化細菌の抗生物質に対する感受性は生息域によって異なり、より好気的な河川底泥には、旺盛な As(III)酸化能を持つ細菌群が生息している可能性が示唆された。

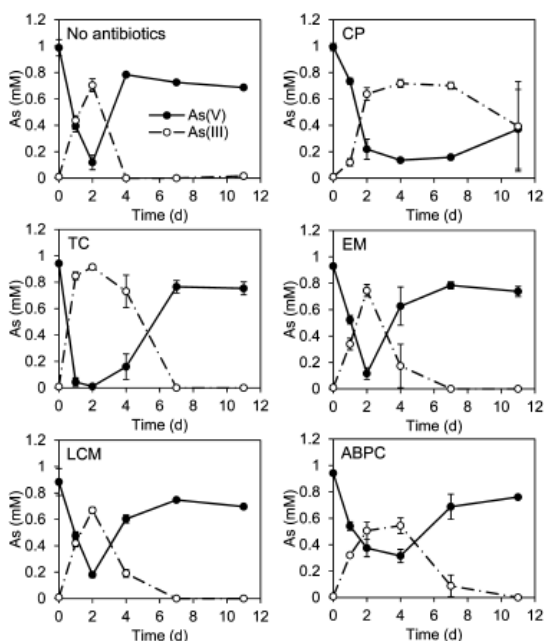


図3 好気条件下におけるAs(V)還元及びAs(III)酸化に及ぼす各種抗生物質の影響

(3) 細菌群集構造に及ぼす各種抗生物質の影響

霞ヶ浦底泥を用いた実験の対照系及び CP 添加系を対象に、0, 2, 4 日後のサンプルを用いて 16S rRNA 遺伝子のクローンライブラリ解析を行った。実験開始前(0 日)のサンプルでは、約半分のクローンが *Proteobacteria* 門に分類され、*Betaproteobacteria* 綱、*Gammaproteobacteria* 綱、及び *Deltaproteobacteria* 綱が、それぞれ 16%、7%、及び 28% の割合で検出された。2 日後のサンプルでは、どちらの系でも *Gammaproteobacteria* 綱が 50% と優占し、対照系では *Betaproteobacteria* 綱の割合も増加していた。一方、4 日後のサンプルでは、それぞれの系で細菌相が大きく変遷し、対照系では *Betaproteobacteria* 綱の割合が 75% まで増加した。また、*Alphaproteobacteria* 綱に分類されるクローンもわずかに検出された。これに対して、CP 添加系では、*Proteobacteria* 門の割合が大幅に減少し、*Bacteroidetes* 門が優占していた(82%)。また、属レベルでの解析では、そのほとんど(96%)が、*Chryseobacterium* に分類された。*Chryseobacterium* は種々の抗生物質に耐性を持つ多剤耐性細菌として知られており、ヒ素耐性遺伝子(*ars* 遺伝子)を持つ単離菌株も確認されている。これらの結果から、CP 添加系では、共耐性によってヒ素耐性細菌が優占化したことが示唆された。

また、全ての系を対象に、As(III)酸化酵素遺伝子(*aioA* 遺伝子)の PCR を行ったところ、CP 添加系ではほとんど増幅が確認されなかった(図 4)。さらに、*aioA* 遺伝子のクローンライブラリ解析では、CP 以外の抗生物質添加系では、対照系(N)と同程度の *aioA* 遺伝子が得られ、そのほとんどが *Proteobacteria* 門由来の *aioA* 遺伝子と同じグループに分類された(図 5)。これまで知られている中温性の As(III)酸化細菌は、多くが *Proteobacteria* 門に属することが知られている。また、As(III)酸化にほとんど影響を及ぼさなかった EM 及び LCM は、グラム陽性細菌に抗菌スペクトルを持つことが知られている。従って、CP 添加系では、*Proteobacteria* 門の増殖が阻害されたことで、As(III)酸化の阻害が生じたものと考えられた。また、各ライブラリの多様性の解析から、抗生物質添加系では、対照系と比べて *aioA* 遺伝子の多様性が減少していることが明らかとなり、多様性の解析からそれぞれの系で優占種の変遷が起きていることが示された。

本研究の結果から、抗生物質が環境中での微生物反応を介したヒ素の酸化・還元が大きく影響を及ぼすことが示された。特に、好気環境での As(V)還元を担うヒ素耐性細菌は、種々の抗生物質耐性を持つことから、抗生物質存在下でも旺盛な As(V)還元が生じることが明らかとなった。一方で、As(III)酸化細菌はある種の抗生物質に対する感受性が高く、CP などによってその活動が阻害されることが明らかとなった。これらのことから、*Proteobacteria* 門に抗菌スペクトルを持つ抗生物質が好気環境に流入した場合、ヒ素の酸化・還元のバランスが崩れ、その動態が不溶化から可溶化へシフトすることで、水環境中にヒ素が流入する可能性が示唆された。

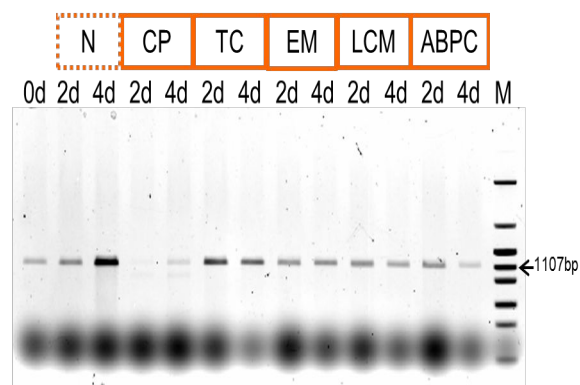


図 4 各実験系からの *aioA* 遺伝子の検出(N;対照系, CP;クロラムフェニコール添加系, TC;テトラサイクリン添加系, EM;エリスロマイシン添加系, LCM;リンコマイシン添加系, ABPC;アンピシリン添加系. M;DNA 分子量マーカー)

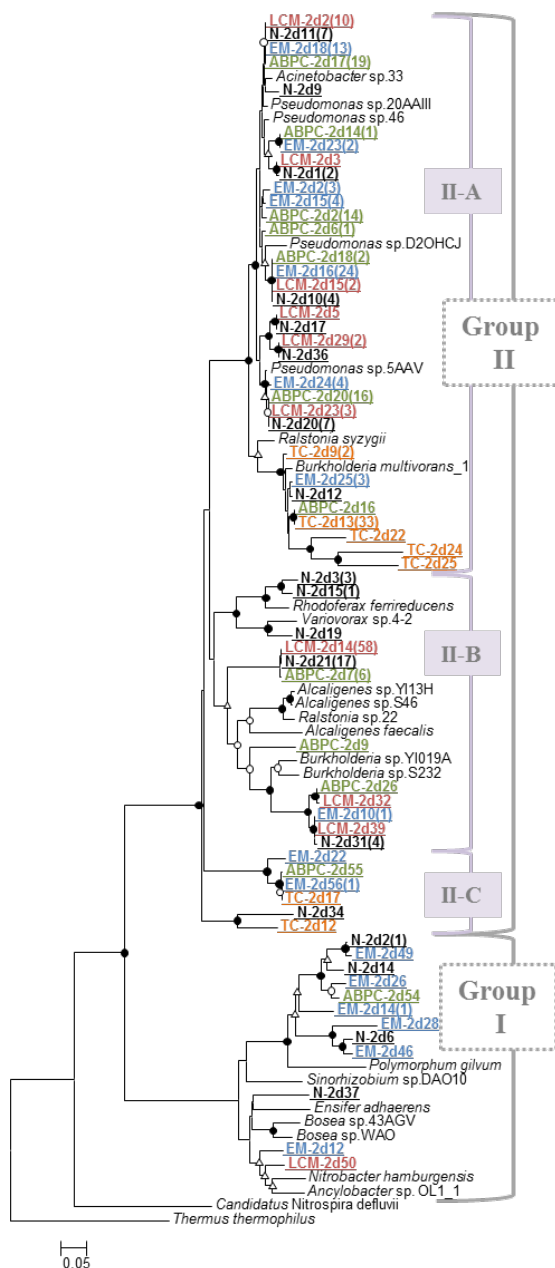


図5 *aioA* 遺伝子のクローンライブラリ解析(N;対照系, CP;クロラムフェニコール添加系, TC;テトラサイクリン添加系, EM;エリスロマイシン添加系, LCM;リンコマイシン添加系, ABPC;アンピシリン添加系. 括弧内の数字は相同性 97%以上のクローン数を示す.)

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計3件)

Yamamura S., Watanabe K., Suda W., Tsuboi S., Watanabe M. (2014) Effect of Antibiotics on Redox Transformations of Arsenic and Diversity of Arsenite-Oxidizing Bacteria in Sediment Microbial Communities. *Environ. Sci.*

Technol., 48, 350-357 (査読有) DOI: 10.1021/es403971s

Yamamura S., Amachi S. (2014) *Microbiology of inorganic arsenic: From metabolism to bioremediation.* *J. Biosci. Bioeng.*, 118 (1), 1-9 (査読有) DOI: 10.1016/j.jbiosc.2013.12.011

山村茂樹 (2014) 微生物によるヒ素の酸化・還元及ぼす抗生物質の影響. *水環境学会誌*, 37(A) (11), 413-416 (査読無)

[学会発表](計7件)

董典涛, 山村茂樹, 山口紀子, 牧野知之, 天知誠吾 (2014) 亜ヒ酸濃度が土壤中の亜ヒ酸酸化細菌群集構造に及ぼす影響. 環境微生物系学会合同大会 2014, 10月22日, 浜松

山村茂樹, 須藤崇行, 天知誠吾 (2014) 土壤微生物群を用いた汚染土壌からのヒ素可溶化. 日本水環境学会第48回年会, 3月17日, 仙台

山村茂樹, 渡邊圭司, 須田互, 坪井隼, 渡邊未来 (2013) 抗生物質によるヒ素酸化細菌群の変化. 日本微生物生態学会大会第29回, 11月23日, 鹿児島

山村茂樹, 渡邊圭司, 渡邊未来 (2012) 湖沼底泥中の亜ヒ酸塩酸化細菌群に及ぼす各種抗生物質の影響. 日本水処理生物学会第49回大会, 11月25日, 東京

山村茂樹, 渡邊圭司, 渡邊未来 (2012) 抗生物質が好気環境での微生物によるヒ素還元を促進する?. 日本水環境学会第46回年会, 3月14日, 東京

山村茂樹, 渡邊圭司, 渡邊未来 (2011) 環境微生物によるヒ素の酸化・還元及ぼす抗生物質の影響. 第17回ヒ素シンポジウム, 11月19日, つくば

Yamamura S., Watanabe K., Watanabe Mirai., Soda S., Ike M. (2011) Role of Redox Active Vitamins in Microbial Arsenic Mobilization. *IUMS 2011 Sapporo The unlimited world of Micribes*, 9月7日, 札幌

[図書](計1件)

山村茂樹 (2014) 第3章メタルバイオテクノロジーの応用 3.2環境修復 3.2.4環境汚染金属(2)ヒ素. 山下光雄, 清和成 編著, 地球を救うメタルバイオテクノロジー, 成山堂書店, 118-125

6. 研究組織

(1)研究代表者

山村茂樹 (YAMAMURA, Shigeki)

独立行政法人国立環境研究所・地域環境研究センター・主任研究員

研究者番号: 90414391