

令和 3 年 6 月 21 日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22904

研究課題名（和文）沿岸海洋細菌の群集組成および物質代謝に対する抗生物質の影響評価

研究課題名（英文）The effect of antibiotics on the bacterial community composition and the related biogeochemical cycle

研究代表者

濱 健夫（HAMA, Takeo）

筑波大学・生命環境系・名誉教授

研究者番号：30156385

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：沿岸細菌群集組成と物質循環に対する抗生物質の影響を、2種類の抗生物質を添加した細菌培養実験を通して評価した。細菌群集の多様性は、エリスロマイシンでは20 mg/L以上の条件下、オキシテトラサイクリンでは200 mg/L濃度下で顕著な減少を示した。高濃度抗生物質存在下では、アルファプロテオバクテリア綱に属する細菌類の減少が認められ、一方、ガンマプロテオバクテリア綱の細菌類の存在比が大きく増加した。高濃度下では粒子状の凝集体内に生息する細菌のみが認められ、単独で生活する遊離性細菌はほとんど生息していなかった。抗生物質の細菌群集への影響は、細菌の生活様式に大きく関連することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抗生物質は人への使用に加えて、畜産動物や水産魚類にも使用されており、我が国の動物への使用量は、人への使用量の2倍に相当する。魚類の養殖においては、飼料に抗生物質を混ぜて与えており、海水中の抗生物質濃度を増加させる要因となる。

本研究は、水中の抗生物質濃度が増加は、細菌数を減少させ、さらに細菌群集の多様性を減少をもたらし可能性をもつことを明らかにした。抗生物質の環境中への排出に関しては、現在のところ法的規制は行われていない。抗生物質の「意図しない」効果を防止するため、環境中における抗生物質の挙動と生態系への影響に関する研究の強化の必要性が、強く示唆された。

研究成果の概要（英文）：The effect of the antibiotics on the community composition of coastal bacteria and the related biogeochemical cycle was assessed by the culture experiments spiked by two antibiotics; erythromycin and oxytetracycline. The diversity of bacteria community showed the drastic decrease under high concentration of antibiotics; higher than 20 mg/L for erythromycin and 200 mg/L for oxytetracycline. Most of bacteria which showed the decrease under high antibiotics concentration belonged to Alphaproteobacteria, whereas Gammaproteobacteria exhibited the compositional increase. Epifluorescence microscopy observation clearly showed that bacteria surviving under the high concentration was mainly composed by the particulate attached bacteria living in the aggregates. A little free living bacteria under the high concentration of antibiotics strongly suggests that the sensitivity against the antibiotics largely depends on the difference in their life-style.

研究分野：生物地球化学

キーワード：抗生物質 細菌群集 物質循環

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

#### (1) 環境中への抗生物質の流出

魚介類の養殖において、細菌感染の予防や成長促進などの目的で、抗生物質の使用が世界的に増大しつつある。これを反映し、抗生物質の養殖水産物への蓄積やヒトの健康への影響については、社会的関心が集まり始めた。しかし、養殖場から海水中に拡散した抗生物質が、海水の自然細菌群集に対して与える影響に関しては、ほとんど考慮されていない。

#### (2) 環境中での抗生物質の安定性と細菌への影響

抗生物質に対する細菌の耐性は、細菌の分類群毎に異なることから、海水中への抗生物質の残存は、沿岸の細菌群集組成を変化させる可能性がある。さらに、細菌群集の変化が生じた場合には、有機物の分解による二酸化炭素の生成速度や、炭素の長期貯留過程として知られる細菌の難分解溶解態有機物の生成速度も影響を受ける可能性がある。

### 2. 研究の目的

(1) 沿岸から採取した自然細菌群集に対して、代表的な抗生物質2種類を添加し、30日間の培養実験を行い、抗生物質が細菌自然群集へ与える影響を明らかにする。

(2) 有機栄養源として添加した植物プランクトン有機物の培養期間中の減少量を明らかにすることにより、細菌の有機物分解過程に対する抗生物質の影響を評価する。

### 3. 研究の方法

(1) 自然細菌群集を含む試水は、静岡県下田市の筑波大学下田臨海実験センターにおいて採取した。海水試料を滅菌した3Lの培養容器に分注した後、抗生物質としてエリスロマイシンあるいはオキシテトラサイクリンを、0.02 µg/L から 200 mg/L の7段階の濃度で添加した。抗生物質の添加をしないコントロールを含めて、20℃で培養を開始し、0、3、10および30日後に試料を分取した。

(2) 細菌群集組成は、16s rRNA の V3-V4 領域を用いた遺伝子解析により明らかにした。また、蛍光顕微鏡とフローサイトメーターを用いて細菌の観察および細菌数の計測を行った。

(3) 培養系に含まれる懸濁態有機炭素(POC)濃度は、元素分析計により測定した。

### 4. 研究成果

#### (1) 細菌群集の多様性

培養期間中の細菌の多様性を示す Shannon 指数は、エリスロマイシン添加試料では 20 mg/L および 200 mg/L において、オキシテトラサイクリン添加試料では 200 mg/L において、顕著に低下した(図1)。また、多様性に関する他の指標である Chao 1 指数に関しても、ほぼ同様の変化が認められた。この結果から、高濃度の抗生物質存在下においては、感受性の高い細菌群が死滅するため、群集全体の多様性が低下することが明らかとなった。また、エリスロマイシンはオキシテトラサイクリンに比較して、より低濃度から影響を及ぼすことが示唆された。

#### (2) 細菌群集の変化

16s rRNA の塩基配列を用いて細菌群集組成を明らかにした。網レベルでの群集組成は、抗生物質の添加により、大きく変化した。コントロール試料においては、アルファプロテオバクテリアおよびガンマプロテオバクテリアが全体の7割近くを占めた(図2)。

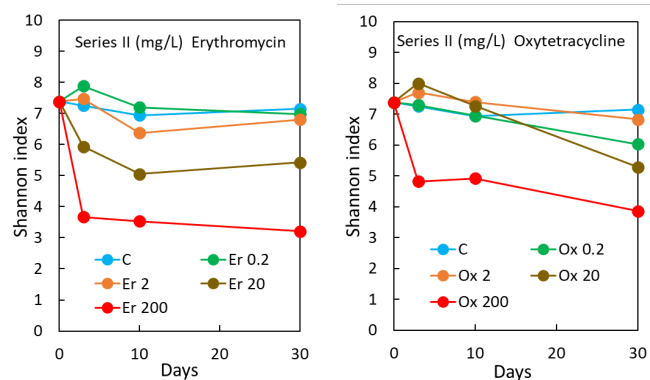


図1 培養期間中の多様性の変化 (Shannon 指数)

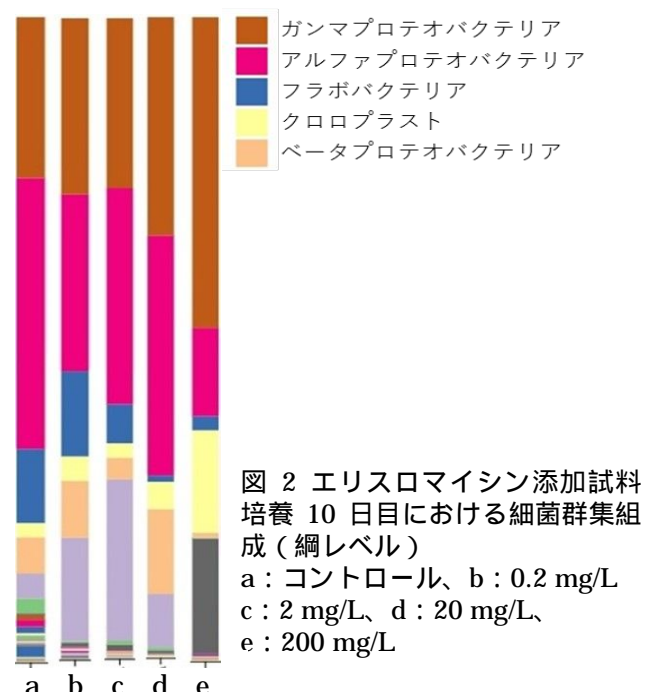


図2 エリスロマイシン添加試料培養10日目における細菌群集組成(綱レベル)  
a: コントロール、b: 0.2 mg/L  
c: 2 mg/L、d: 20 mg/L、  
e: 200 mg/L

アルファプロテオバクテリアは、エリスロマイシンの添加量が増加するにつれて、その割合が減少する傾向にあった。また、フラボバクテリアも同様に、高抗生物質濃度下では占める割合は低かった。一方、ガンマプロテオバクテリアの割合は増加する傾向にあり、200 mg/L 条件下では 50% を超えた。

抗生物質の種レベル (OUT : Operational Taxonomic Unit) への影響を評価するため、コントロール試料とエリスロマイシンおよびオキシテトラサイクリン mg/L 試料間の比較を行った。両試料間で、その寄与率が 1% 以上変動した OTU の変化量を図 3 に示す。

抗生物質添加により、寄与率が 1% 以上増加した OTU は両抗生物質で 9 種類であり、特にガンマプロテオバクテリアに属するアルテロモナスは、エリスロマイシンが 40%、オキシテトラサイクリンが 23% と高い増加を示した。また、一種類の抗生物質のみで 10% を超える増加を示す OTU も数種類存在した。

一方、高抗生物質濃度下で 1% 以上減少する OUT は、15 種類存在したが、その中で、11 種類は両抗生物質で共通していた。10% 以上の減少を示した OTU はアルファプロテオバクテリア綱に属するペラジバクテリアのみであり、他の 14 種類の減少は 10% 以下であった。ペラジバクテリアは海洋の栄養塩の少ない環境下に普遍的に生息していることが知られているが、本研究により、抗生物質に対して最も感受性の高いグループであることが示唆された。

### (3) 細菌の生活形態と感受性

水圏環境中の細菌は、細胞が単独で生活する浮遊性細菌と、粒子に付着して生活する付着性細菌に分別される。エリスロマイシンの 200 mg/L 添加試料について蛍光顕微鏡観察を行い、培養 3 日目では大型凝集体に付着する付着性細菌に加えて、単独で生活する遊離性細菌の両者が認められた (図 4a)。一方、10 日および 30 日目では、付着性細菌の生息のみが認められ、浮遊細菌はごく少数が観察されたのみであった (図 4b、c)。この結果は、浮遊性細菌は付着性細菌に比較して、抗生物質に対する感受性が高いことを示している。

海洋細菌の生活形態と分類群の関係に関しては、浮遊性細菌としてはアルファプロテオバクテリア綱が多く、付着性細菌としてはガンマプロテオバクテリア綱およびバクテロイデス綱が多いことが報告されている (Crespo ら、2013)。上述したように、本研究ではアルファプロテオバクテリア綱の寄与が高抗生物質存在下で低下し、ガンマプロテオバクテリア綱の寄与が増加することが明らかになっている。抗生物質により浮遊性細菌が低下した結果をあわせて考えると、抗生物質の濃度による細菌群集組成の変化は、生活形態の異なった分類群の感受性の違いを反映していることが示唆される。すなわち、浮遊性細菌は海水に溶存する抗生物質の影響が直接細菌細胞に及ぶのに対して、凝集体内に生息する付着性細菌は凝集体の媒体に細菌細胞が保護されているため、抗生物質の影響が及びにくい可能性が高い。

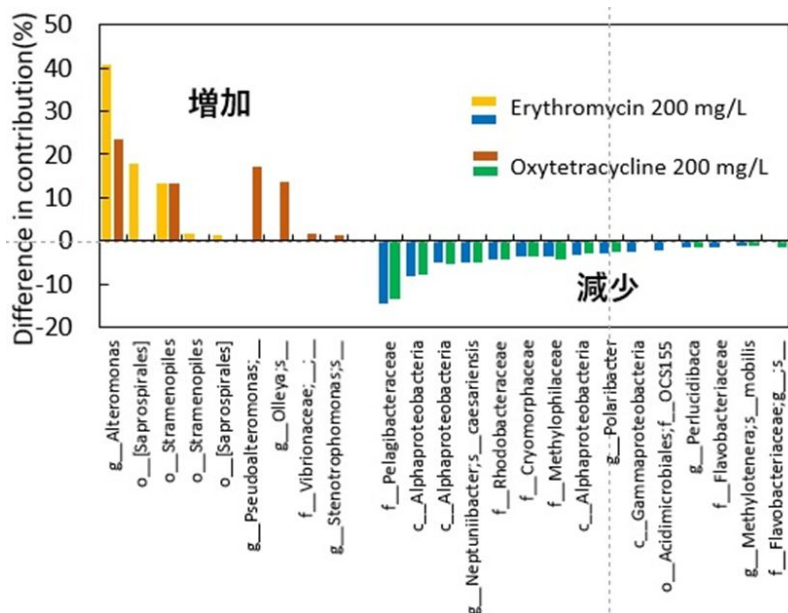


図3 培養 10 日目のコントロールおよび 200 mg/L 試料間での OUT の寄与率の差 (200 mg/L 試料における各 OUT の寄与率からコントロール試料における寄与率を差し引くことにより算出)

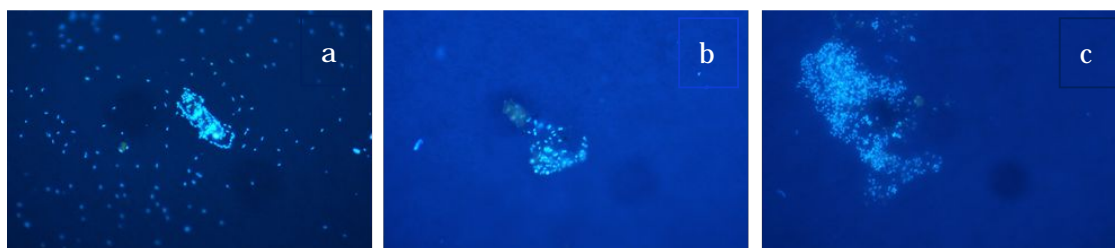


図4 エリスロマイシン 200mg/L 添加試料におけるバクテリアの蛍光顕微鏡による画像。 a : 培養 3 日目、 b : 培養 10 日目、 c : 培養 30 日目

#### (4) 有機物分解速度への影響

培養系に存在する懸濁態有機炭素(POC)濃度は培養期間中に減少し、培養実験終了時の30日目においては、初期濃度の34%から50%に相当した(図5)。変化のパターンは、抗生物質の添加濃度により大きな影響は受けず、10日まで急速な

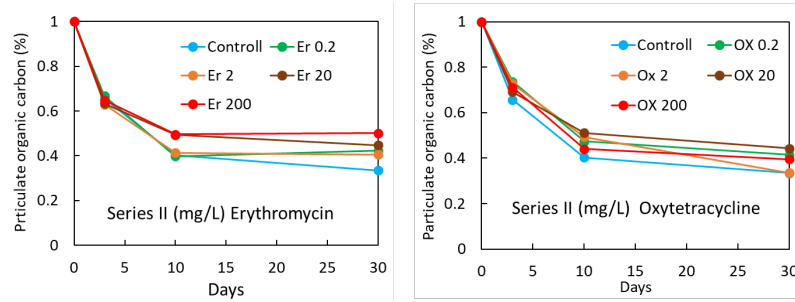


図5 培養期間中の懸濁態有機炭素(POC)濃度の変化

減少を示した後、10日目から30日目において減少速度は低下した。エリスロマイシンの添加試料では、添加濃度の増加に伴い、残存するPOC濃度が高くなる傾向が認められた、コントロールと200 mg/L添加試料では、10%程度の残存率の差が生じた。一方、オキシテトラサイクリン添加試料では、コントロールで減少の割合が最大であったが、添加量に依存した変化は認められなかった。全体として、有機物の分解速度に対する抗生物質の顕著な影響は認められなかった。

#### <引用文献>

Crespo, B. G., T. Pommier, B. Fernandez-Gomez and C. Pedros-Alio (2013) Taxonomic composition of the particle-attached and free living bacterial assemblages in the Northwest Mediterranean Sea analyzed by pyrosequencing of the 16S rRNA. *Microbiology Open*, 2, 5134-552.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

研究代表者が担当する獨協大学の講義（「特殊講義a：生命を造るしくみ・生命が造るしくみ」、および「環境学」）において、研究成果について発表し学生を含めて討議を実施した。

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	大森 裕子  (OMORI Yuko)  (80613497)	筑波大学・生命環境系・助教     (12102)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関