

平成 27 年 6 月 18 日現在

機関番号：16301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25740029

研究課題名(和文) 抗生物質流出による水圏微生物群集の応答解析および腐食食物網への影響評価

研究課題名(英文) Assessment of antibiotics effect in the aquatic environment on bacterial community

研究代表者

横川 太一 (Yokokawa, Taichi)

愛媛大学・沿岸環境科学研究センター・講師

研究者番号：00402751

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：抗生物質流出による水圏生態系へのリスク「抗生物質による腐食食物網の機能低下」を定量的に把握することを目的とした。実験解析の結果、抗生物質の添加によって、環境細菌群集の増殖速度の低下および群集構造の変化が起きることを明らかにした。また、微小生態系実験を用いた操作実験の結果、抗生物質の添加は、細菌群集構造の違いにかかわらず、細菌群集の呼吸量の低下および有機物利用特性の変化を引き起こすことが明らかになった。本研究では、細菌群集の応答を定量化できる汎用的な微小生態系実験系を確立し、抗生物質流出による水圏生態系機能低下リスクを定量的に把握することを可能にした。

研究成果の概要(英文)：Microbial food web in aquatic environments plays important roles in processes of organic matter degradation and remineralization. Concern that the anthropogenic pollutants in aquatic environments may undermine the function of microbial food web has prompted aquatic microbial ecology in recent years. As such, understanding the response of the bacterial community to anthropogenic contaminants (e.g., antibiotics, heavy metals) is crucial to assess stability of microbial food web functioning. We determined response of bacterial activity under antibiotic-contaminated conditions by using quantitative methods. Antibiotics addition caused a significant decrease of bacterial growth and respiration rates, and community succession. These data help to understand how microbial community respond to antibiotic contaminations. Our data demonstrated that antibiotic induce reduction of bacterial activity which could be a cause of inefficiency of microbial food web of the aquatic environments.

研究分野：微生物生態学

キーワード：水圏微生物食物網 抗生物質 細菌群集 腐食食物網

1. 研究開始当初の背景

(1) 抗生物質の水圏環境への流出

感染症の原因となる細菌を抑制する抗生物質の使用の対象は人間だけでなく、家畜、養殖魚類と多岐にわたっている。そして現代社会においては、抗生物質が恒常的に利用されている。特に市街地あるいは畜産域を通過する河川、および養殖が活発に行われている沿岸環境では、顕著に高濃度な抗生物質の分布が確認されている。例えば日本全域を網羅した 37 の河川において、人および家畜に使用されるスルホンアミド系およびマクロライド系抗生物質が、平均して 1 ng L^{-1} (海水 1L 中に十億分の一グラム) の濃度で検出されていることが報告されている。これは抗生物質の恒常的な利用と、下水処理において効率的な除去を行っていないことに一因が考えられている。

(2) 河川-沿岸生態系の維持における腐食食物網

腐食食物網は主に細菌群集によって構成される。その役割は有機物の分解と無機栄養塩(窒素、リン酸、ケイ素)の再生である。細菌群集は、植物プランクトンから上位栄養段階につながる生食食物連鎖で作られた生物体有機物を分解し、光合成に必要な無機栄養塩を再生している。沿岸生態系において腐食食物網の機能が低下すると、底水塊の貧酸素化、有機物を多く含む底泥の増加等の環境の悪化が起きる。

(3) 抗生物質による腐食食物網の生態系機能の低下の可能性

抗生物質の流出は、3つのプロセスによって、腐食食物網の生態系機能の低下に繋がると考えられる。抗生物質感受性細菌群による有機物分解能と無機栄養塩再生能の低下、細菌捕食者への細菌体有機物転送量の低下、腐食食物網を構成する微生物の群集構造の変化、および各栄養段階間の有機物転送量の低下。

これらの過程を1つずつ解析し、生態系における「抗生物質による腐食食物網の機能の低下」リスクを評価することが重要な課題である。

2. 研究の目的

水圏環境では、有機物分解と無機栄養塩の再生を腐食食物網が担っている。腐食食物網では細菌群集が中心生物として機能している。この細菌群集による有機物分解能および無機栄養塩再生能が人間生活圏から流出する抗生物質によって不全状態になる可能性がある。本研究は、抗生物質流出による水圏生態系へのリスク「抗生物質による腐食食物網の機能低下」を定量的に把握することを目的とする。実際には、「腐食食物網の生態系機能の低下」を「腐食食物網を介した有機物転送量の低下」として捉えて、次の作業仮説の検証を微生物生態学的手法を用いて行う。

抗生物質に暴露された際；環境細菌群集の有機物分解活性と呼吸活性は低下し、その生物量が減る。環境細菌生物量の低下に伴い、細菌捕食者への有機物転送量が低下する。微生物群集の構造変化に起因して、腐食食物網を介する有機物転送量が低下する。

3. 研究の方法

(1) 抗生物質暴露時における環境細菌群集の増殖速度と群集組成遷移の解析

異なる合成過程を抑制する3つの抗生物質(Erythromycin (ERY), Sulfamethoxazole (SMX), Oxytetracycline (OTC))を用いて、これらに暴露した際の環境細菌群集の増殖速度を測定した。それぞれの抗生物質において、2つの濃度区(0.1 および $10 \mu\text{g mL}^{-1}$)を設定した。増殖速度測定に供した試料は愛媛県、伊予灘の沿岸水である。上記条件およびコントロール区(抗生物質非添加)における細菌群集全体および主要系統分類群(alpha-, beta-, and gamma-proteobacteria, and Bacteroidetes)の個体群動態および増殖活性の応答を Catalyzed reporter deposition-Fluorescence in situ hybridization 法を用いて解析した。細菌群集の増殖速度測定には、従来法である希釈培養法を使用した。

(2) 抗生物質暴露時における細菌群集機能の動態解析：異なる細菌群集を用いたマイクロコズム実験

マイクロコズム内での細菌群集の呼吸量、有機基質利用種数、有機基質総利用量の変化の測定を行った。細菌群集作成には、研究機関から提供を受けた、マリンプロス培地で生育する29の単離株を使用した。この29の単離株をランダムに10株抽出した系を7つ用意し(繰返しは3連)、培養実験をおこなった。この系を用いて抗生物質暴露区(OTC, $1 \mu\text{g L}^{-1}$)とコントロール区(抗生物質非暴露)を用意した。呼吸量測定には酸素計(Fibox3, タイテック)を使用した。利用基質数および総利用基質量に関しては、31種類に基質の利用が比色によって測定できるマイクロプレート(EcoPlate, BiOLOG)を使用した。この課題では、異なる細菌群集組成を用いて繰返し実験をおこない、その結果を解析することにより、抗生物質暴露時における細菌群集の応答の普遍的なパターンを抽出した。

4. 研究成果

(1) 抗生物質暴露時における環境細菌群集の増殖速度と群集組成遷移

コントロール区に比べて環境細菌群集の増殖は抗生物質を添加した18系のうち16系で低く、抗生物質による増殖阻害が確認された。阻害された系のうち7系では増殖が認められず残りの9系では19%から73%の阻害が観察

された。これらの系を抗生物質の種類ごとにまとめると、ERY 暴露において最も強い増殖阻害 (96%)、次に OTC 暴露において 74%、SMX において 46%の阻害が観察された (図 1)。このことは、抗生物質の阻害作用によって環境細菌群集の増殖速度 (生態系における有機物分解および無機栄養塩再生の指標) が低下すること、そしてその増殖速度の阻害影響の強度は抗生物質の種類によって異なることを示唆している。

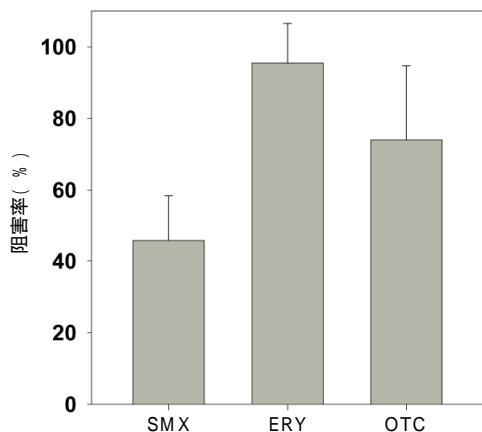


図 1 抗生物質暴露区での環境細菌群増殖速度とコントロール区における増殖速度との比較。横軸の SMX, ERY, OTC は添加した抗生物質を、縦軸は抗生物質暴露によって阻害された増殖速度の阻害率を示す。

また同実験系において環境細菌主要系統分類群の増殖速度を解析した結果、抗生物質暴露による各系統分類群の増殖速度への阻害の強さが異なっていることが明らかになった。抗生物質暴露区において alpha-proteobacteria の増殖速度はコントロール区の 23%、beta-proteobacteria では 1%、gamma-proteobacteria では 7%、Bacteroidetes では 19%であった。この結果によって、細菌群集が抗生物質にたいして異なる感受性をもつグループによって構成されていることが示された。

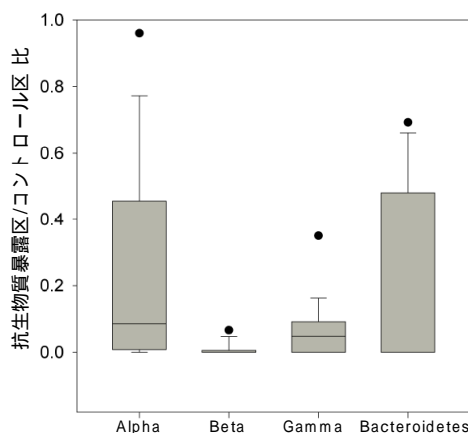


図 2 抗生物質暴露における各主要系統分類群の「抗生物質暴露区 / コントロール区」比。

横軸に系統分類群、縦軸に暴露区 / コントロール区の比を示す。

(2) 抗生物質暴露時における細菌群集機能の動態解析：異なる細菌群集を用いたマイクロコズム実験

マイクロコズム実験の結果、抗生物質暴露によって細菌群集の呼吸量は顕著に減少した (コントロール区との比は、 0.54 ± 0.51 (\pm SD, $n = 18$)). この傾向は異なる組成の細菌群集いずれでも確認された。つまり、抗生物質暴露による呼吸量の減少は細菌群集組成にかかわらず、恒常的な現象であることが示唆された。一方で、EcoPlate を用いた細菌群集活性の測定では、抗生物質暴露区 / コントロール区の比が、利用基質数では 1.00 ± 0.20 ($n = 18$), 総利用基質量では 0.98 ± 0.46 ($n = 18$) であり、いずれも抗生物質暴露による影響は観察されなかった。これら結果は、つまり、抗生物質暴露は、細菌群集全体で見ると、同化活性 (有機物利用) ではなく、異化活性 (呼吸) に強く影響している可能性を示唆している。

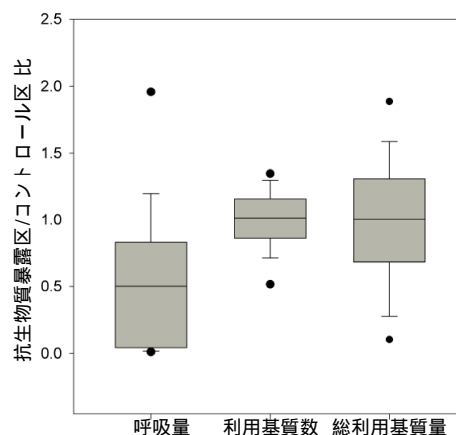


図 3 抗生物質暴露における細菌群集の呼吸量、利用基質数および総利用基質量の応答。横軸は各細菌群集パラメータ、縦軸は各パラメータの暴露区とコントロール区との比を示す。

抗生物質暴露時における環境細菌群集の増殖速度と群集組成遷移の解析および、細菌群集機能の動態解析から、抗生物質暴露に対して細菌群集の活性は減少する事が確認された、また、その影響は群集構造の違いにかかわらず起きることが明らかになった。これらの結果は抗生物質の環境への流出が、水圏生態系の維持において重要な細菌群集 (腐食食物網の主要構成生物群) の動態に影響を与えていること、そしてその影響は細菌群集の活性の低下に起因していることが示唆された。この知見は、水圏生態系機能の低下リスクを定量的に把握し、水圏生態系の良い状態を

の維持に必要な指針をつくるうえで重要であると考える。

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)

[学会発表](計 4件)

Ngo Vy Thao, Nozawa A, Obayashi Y, Kitamura S, Yokokawa T, Suzuki S
“Bacterial proteins are rapidly processed in the presence of both bacteria and ciliates” 日本微生物生態学会第30回大会(静岡県, 浜松市, 浜松アクトシティコンgresセンター), 2014年10月24日

松井一彰, 三木健, 横川太一「微生物の多様性と生態系機能の関係性評価に向けて: データベースと実験生態系を用いた理論的アプローチ」日本微生物生態学会第30回大会(静岡県, 浜松市, 浜松アクトシティコンgresセンター), 2014年10月24日

大林由美子, 横川太一, 鈴木聡「生物活性阻害剤を用いて海水中のタンパク質分解酵素活性の起源を探る」日本微生物生態学会第30回大会(静岡県, 浜松市, 浜松アクトシティコンgresセンター), 2014年10月23日

Avi Nurul Oktaviani, Yokokawa T, Suzuki S
“Effect of antibiotics addition on Bacterial community in seawater” 5th Joint forum of Environmental Sciences (National Taiwan Ocean University, Keelung, Taiwan), 2013年11月18日 招待講演

6. 研究組織

(1)研究代表者

横川 太一 (YOKOKAWA TAICHI)

愛媛大学・沿岸環境科学研究センター・講師
研究者番号: 00402751