

多摩川生息魚類の腸内および周辺環境水の細菌 叢に及ぼす化学物質の影響

2010年

浦野 直人

東京海洋大学海洋科学部海洋環境学科 教授

共同研究者：石田 真巳（東京海洋大学海洋科学部海洋環境学科 准教授）
丸山 隆、見上 貴教、恩田 淳之助、相川 和也、永田 悦子

《様式4-2》

助成調査・試験研究完了報告書 [学術研究用]
(最終年度)

2009 年 4 月 30 日

財団法人 とうきゅう環境浄化財団
会 長 西 本 定 保 様

住 所 東京都港区港南 4-9-7
調査・試験研究者
氏 名 浦野直人 (印)

2008 年 7 月 10 日付第 2008-12 号
調査・試験研究課題

『 多摩川生息魚類の腸内および周辺環境水の細菌叢に及ぼす化学物質の影響 』

上記、助成調査・試験研究は 2010 年 3 月 31 日に完了いたしましたので、**財団法人 とうきゅう環境浄化財団 “調査・試験研究助成に関する調査・試験研究の選定基準、助成の方法、調査・試験研究の実施方法、助成金の支払い方法ならびに調査・試験研究者の個人情報の保護の方法に関する規程”**第 1 2 条に基づき、下記書類を添えて報告いたします。

記

1. 調査・試験研究の実施内容および成果に関する報告書

(1) ①調査・試験研究課題 (邦文、英文)

- ・ 多摩川生息魚類の腸内および周辺環境水の細菌叢に及ぼす化学物質の影響
- ・ Effect of chemical substances on bacterial flora isolated from both intestines of various fishes and environmental waters in the Tamagawa-river

②代表研究者名 (日本語、英文ローマ字)

浦野直人、Urano Naoto

共同研究者名 (日本語、英文ローマ字)

石田真巳、Ishida Masami

丸山隆、Maruyama Takashi

見上貴教、Mikami Takanori
恩田淳之助、Onda Junnosuke
相川和也、Aikawa Kazuya
永田悦子、Nagata Etsuko

③実施内容 要約400字程度(邦文、英文)

- 多摩川の上流・中流・下流・河口域に生息する魚類および周辺環境水・底泥を採集した。(1)魚類の腸内、水、泥中から全細菌と抗生物質耐性菌フローラを単離して比較した。魚類腸内ではアンピシリン(Ap)耐性菌の平均存在比率は90%以上と非常に高かった。他はストレプトマイシン(Sm)、クロラムフェニコール(Cr)、テトラサイクリン(Tc)耐性菌1-18%であった。表層環境水ではSm耐性菌比が高く、底泥ではAp耐性菌比が高かった。また上流・中流の水と底泥の耐性菌比は11-16%で、下流の水と底泥の耐性菌比は91-96%であった。(2)魚類の腸内、水、泥中から細菌DNA抽出を行った。16SrRNA遺伝子を増幅させて、DGGE法により単離した各細菌種の塩基配列解析から、水と底泥から *Clostridium*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Candida*, *Pseudomonas*, *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Enterococcus*, *Rhodococcus*, *Streptococcus* 属の細菌が出現した。魚類腸内から *Plesiomonas*, *Pectobacterium*, *Cetobacterium*, *Pseudomonas*, *Rahnella*, *Yersinia* 属の細菌が出現した。

In The Tamagawa-river, the authors collected fishes, waters, and bottom muds from head-, middle-, and down-streams. (1) All bacteria and antibiotics-resistant ones were compared by single colony isolation from the environments. In the intestines of fishes, ratio of ampicillin(Ap)-resistant bacteria to total ones were over 90%, and those of streptomycin(Sm), chloramphenicol(Cr), tetracycline(Tc)-resistant ones were 11-18%. In the waters and the muds from the head- and middle-streams, ratio of resistant-bacteria to total ones were 11-16%. In the waters and the muds from the down streams, those of resistant-bacteria to total ones were 91-96%. (2) By amplification of 16S rDNA using PCR and isolation of each DNA band using DGGE, *Clostridium*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Candida*, *Pseudomonas*, *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Enterococcus*, *Rhodococcus*, *Streptococcus* spp were found from the waters and the muds. *Plesiomonas*, *Pectobacterium*, *Cetobacterium*, *Pseudomonas*, *Rahnella*, *Yersinia* spp were found from the fish intestines.

④今後予想される効果 400字程度 (邦文、英文)

2008年度、2009年度において、多摩川の上流・中流・下流・河口域に生息する魚類および周辺環境水・底泥を採集した。採集標本から(1)細菌単離を行い、全細菌中の抗生物質耐性菌を調査した。(2)全細菌DNAを抽出して生息する細菌種を同定した。今後は以下の研究を行う予定である。

- ・抗生物質耐性菌の多剤耐性、病原性などの調査
- ・抗生物質耐性菌から耐性遺伝子を持つプラスミドの抽出と非耐性菌への伝播による耐性菌への形質転換
- ・DGGE法とPCR法による抗生物質耐性菌の細菌種の同定の継続
- ・多摩川全域(上流、中流、下流の魚腸内、環境水、底泥)の抗生物質耐性菌の蔓延度に関する総合的考察を行う。

In 2008 and 2009, the authors collected fishes, waters, and bottom muds from head-, middle-, and down-streams in the Tamagawa-river. From the samples, (1) bacteria were isolated and ratio of antibiotics-resistant to total ones were analyzed and (2) the bacterial species were identified by 16S rDNA sequencing using DGGE and PCR methods. Further developmental studies were as follows; investigation of resistance against multi-antibiotics and germs from the resistants, extraction of plasmids carrying resistant-genes from the bacteria and transformation to the resistants from the non-resistants, identification of antibiotics-resistant bacterial species using DGGE and PCR methods, total examination and discussion about distribution of antibiotics-resistant bacteria in the whole regions of the Tamagawa-river.

⑤調査・試験研究対象場所 別紙地図に対象範囲を明示



図 多摩川の魚、表層水、底泥の採集場所

⑥本研究により作成した発表論文

ア. 著者名 (日本語、英語)

永田悦子・見上貴教・石田真巳・浦野直人・丸山隆・加藤秀弘(海洋大)・藤瀬良弘 (日本鯨類研究所)

Nagata Etsuko, Mikami Takanori, Ishida Masami, Urano Naoto, Maruyama Takashi, Kato Hidehiro (Tokyo Univ. Marin. Sci. Tech.), Fujise Yoshihiro(The Inst. Cetacean Reserch)

イ. 題目 (邦文、英文)

水圏生物の腸内における抗生物質耐性菌の分布調査と解析

Distribution of antibiotics-resistant bacteria in the intestines of aquatic organisms

ウ. 発表場所 (学会、雑誌) 学会名、雑誌名、発行年月、発行者または出版社 (日本語、英語)

平成 21 年度日本水産学会講演要旨集、p246

Program and Abstracts, The Japanese Society of Fisheries Science,
Spring Meeting 2009, p246

エ. 研究内容のキーワード [5 以内] (日本語、英語)

抗生物質耐性菌、多摩川、魚、ミンククジラ、腸

Antibiotics-resistant bacteria, The Tamagawa-river, Fish, Minke Whale,
intestine

オ. 要約[400 字程度] (邦文、英文)

抗生物質の濫用 (用途拡大と大量消費) は抗生物質に対して耐性を獲得した耐性菌を出現させ、これらは社会的に問題となっている。本研究では水圏生物の腸内細菌中にどの程度の耐性菌が混在しているかを調査することとした

2006 年ミンククジラサンプルでは、Sm 耐性菌が最も多く 332/542 株で全単離菌の 61.3%であった。2008 年ミンククジラサンプルでも、最も高い耐性を示したのは Sm であり、その割合は 24.9%(87/350 株)であった。一方、2007 年多摩川魚類サンプルでは Ap 耐性菌が一番多く 96.3%(442/459 株)であった。次に多いのは Sm 耐性菌 19.8%(91/441 株)であった。この傾向は 2008 年サンプルでもみられ、Ap 耐性菌 94.1%(415/441 株)、Sm 耐性菌 16.3%(72/441 株)であった。薬剤や割合に差異はあるが、水圏生物腸内から高い頻度で耐性菌が分離された。

Various antibiotics-resistant bacteria were produced because of the antibiotics abuse and these phenomena caused social problems. In this study, distribution of the resistants in the intestines of aquatic organisms were analyzed. From the intestines of Minke Whales captured in 2006, 332 strains of the Sm-resistants were found in 542 strains of total bacteria, which amounted to 61.3% of all. From the samples in 2008, 25,9% of Sm-resistants to all were also observed. On the other hands, from the fishes in the Tamagawa-river in 2007, 442 strains of Ap-resistants were found in 459 strains of total bacteria, which amounted to 96.3% to all. From the samples in the

Tamagawa-river in 2008, 94.1% of Ap-resistants to all were observed. Large number of antibiotics-resistant bacteria were found in the intestines of aquatic organisms

(2) 財団提出研究成果報告書 (FD又はCD-ROM添付)

1. 調査・試験研究の目的

多摩川は東京都民の生活に密着した典型的な都市河川である。河川沿岸に隣接する一般住宅、製造工場、病院、その他公共施設からの廃水は、水再生センターで浄化された後に多くが多摩川に流入されている。下流に至ると河川水の約5割が水再生センター由来の処理水であるとされている。しかし流入水には様々な化学物質が低濃度でも残存しているため、生息する魚類の腸内細菌にも化学物質の影響が及んでいると推定される。本研究で実施期間中(2年間)は、特に化学物質のうちでも特に人の日常生活と密着している抗生物質に焦点を絞ってみる。

抗生物質の日本国内での消費量は、年間に医薬品で500t、農薬で100t、畜水産で1,100tにも及んでいる。一方で抗生物質に使用開始以来、その薬理作用が効力を及ぼさない細菌(抗生物質耐性菌)の出現と蔓延が観測されている。対応策として新たな抗生物質が開発され、その使用がさらなる耐性菌を出現させるという、イタチゴッコが繰り返されてきた。従って河川の生態系を調査する上で、耐性菌の蔓延度解析は極めて重要な研究課題である。

図1. 多摩川的环境水中の各種抗生物質濃度

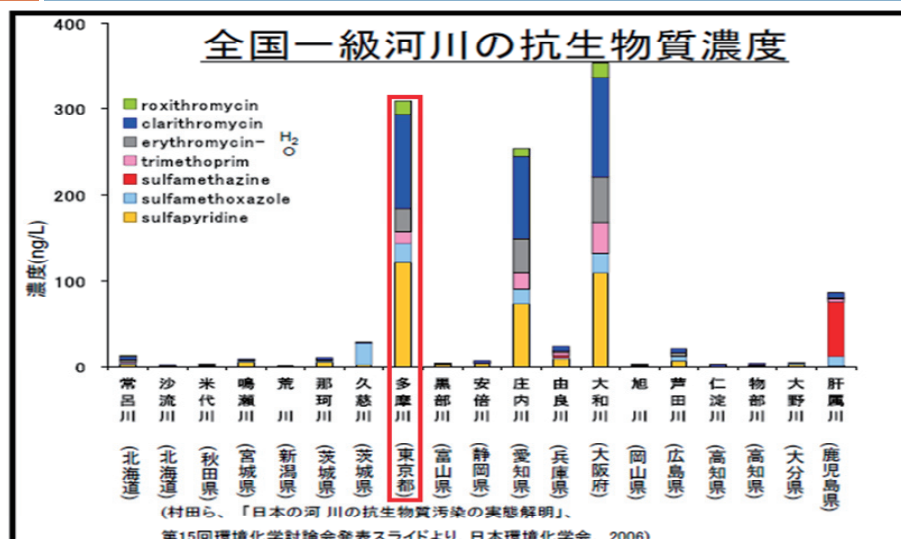


図1は全国主要河川中の抗生物質濃度を示すが、これらの河川中でも多摩川は抗生物質濃度が高いという報告がある。¹⁾ 計測方法の詳細が明確でないため、各河川の汚染度比較を本データのみで判断するのは疑問が残るが、多摩川的环境水の抗生物質汚染度は高いと判断して良いであろう。なお、環境中に抗生物質耐性菌が増大し、その原因は抗生物質の暴露を受けた細菌が生存のために体内に抗生物質耐性遺伝子を構成する。その遺伝子が染色体外 DNA(プラスミド)の細菌間の伝播に基因していることは、研究例が数多い。²⁻⁷⁾ また多摩川の抗生物質耐性菌に

関する研究も私どもの調査で一例のみ発見した。⁸⁾ この研究例のみでは、とても多摩川の抗生物質耐性菌の全容解明には至らず、充分なる研究の余地が残されている。

さて多摩川には確認された主な魚類として、純淡水魚 35 種、回遊魚 7 種、汽水/海水魚 23 種が報告されている。本研究では、その中でも上流域(河口から 60~80km)の生息、中流域(30~50km)の生息魚、下流域(0~20km)の生息魚、全域(0~80km)生息魚のうち、比較的捕獲が容易な魚種に焦点を絞り、魚腸内の細菌中における抗生物質耐性菌の蔓延度を調査する。さらに同時に、魚を捕獲した際の周辺環境水および底泥中に生息するに抗生物質耐性菌に関して研究を行なうことにする。

2. 調査・試験研究の方法

当初の研究計画では、大きく(A)と(B)の二つの研究に分けられた。

(A)上記の魚種、周辺環境水、底泥を採集する。腸内容物と環境水から全微生物の染色体 DNA を抽出する。PCR にて細菌 16SrDNA を増幅させ、変性濃度勾配ゲル電気泳動(DGGE)に掛け、バンドパターンから生息細菌叢を解析する。さらに各バンドの塩基配列から細菌種を同定する。

(B)腸内容物、環境水、底泥を一般細菌増殖用培地(a)、主要4種の抗生物質を1種ずつ含む細菌増殖用培地(b)を1種ずつ唯一の炭素源とする培地(c)で各々培養する。(A)と同様に PCR と DGGE を用いて細菌叢の変化を解析する。

(A)からは多摩川の上・中・流に生息する魚の腸内とその周辺環境中の細菌叢を解析することができる。(B)からは上記の細菌叢中で、特に多摩川にも流出していると推定できる抗生物質の耐性菌を解析することができる。

こうして、多摩川生息魚類の腸内および周辺環境水・底泥の細菌叢に及ぼす化学物質(特に抗生物質)の影響を調査することで、多摩川の化学物質汚染を推し量ることを目的とした。

なお、2008年度は当初に計画していた DGGE による DNA 解析の技術確立に時間がかかった。そこで平行して DGGE を使用しないで、コロニー形成と細菌の単離による研究を行った。

- ・ まず生息微生物のコロニー形成による単離を行った。
- ・ 単離菌に関して同様の試験研究に供することにした。
(本手法ではコロニー非形成細菌の関してのデータを得ることができない。)
- ・ 2008年度は DGGE 不使用、2009年度は DGGE 使用して、データを比較することにした。

調査・試験研究の実施状況

日時	場所	採集標品
----	----	------

- (1) 2007年11月 多摩川中流域(府中市) 魚(アユ、ギンブナ、オイカワ)
- ・各魚腸内容物 g 当りのコロニー形成数計測
 - ・アンピシリン(Ap)、ストレプトマイシン(Sm)、テトラサイクリン(Tc)、クロラムフェニコール(Cr)の抗生物質に対する耐性菌の割合
- (2) 2007年12月 多摩川下流域(六郷橋付近) 魚(マハゼ)
- ・各魚腸内容物 g 当りのコロニー形成数計測
 - ① アンピシリン(Ap)、ストレプトマイシン(Sm)、テトラサイクリン(Tc)、クロラムフェニコール(Cr)の抗生物質に対する耐性菌の割合
- (イ) 2008年5月 多摩川下流域(川崎大師) 環境水と底泥
- ① 環境水と底泥 1ml 当りのコロニー形成数解析
 - ② 単離細菌と全 DNA の DGGE 法による 16SrDNA の塩基配列解析
- (ウ) 2008年6月 多摩川上流域(奥多摩) 環境水と底泥
- ① 環境水と底泥 1ml 当りのコロニー形成数解析
 - ② 単離細菌の 16SrDNA の塩基配列解析
- (エ) 2008年8月 多摩川中流域(調布泉多摩川) 環境水と底泥と魚
(ヨシノボリ、カマツカ)
- ① 各魚腸内容物 g 当りのコロニー形成数計測
 - ② アンピシリン(Ap)、ストレプトマイシン(St)、テトラサイクリン(Tc)、クロラムフェニコール(Cr)の抗生物質に対する耐性菌の割合
 - ③ 環境水と底泥 1ml 当りのコロニー形成数解析
 - ④ 単離細菌と全 DNA の DGGE 法による 16SrDNA の塩基配列解析
- (オ) 2009年4月 多摩川河口(浮島) 環境水、底泥
- ① アンピシリン(Ap)、ストレプトマイシン(St)、テトラサイクリン(Tc)、クロラムフェニコール(Cr)の抗生物質に対する耐性菌の割合
 - ② 環境水と底泥 1ml 当りのコロニー形成数解析
 - ③ 単離細菌の 16SrDNA の塩基配列解析
- (カ) 2009年8月 多摩川中流(二ヶ領河原堰堤) 魚(ギンブナ、ナマズ、オイカワ、ニゴイ、アユ)
- ①各魚の腸内陽物からの全 DNA 抽出
 - ②全 DNA の DGGE 法と PCR を用いた 16RrDNA の増幅、塩基配列解析
- (キ) 2009年8月 多摩川河口(ちどり公演) 魚(キス、ヒイラギ)、環境水
- ① 各魚腸内容物 g 当りのコロニー形成数計測
 - ② アンピシリン(Ap)、ストレプトマイシン(St)、テトラサイクリン(Tc)、クロラムフェニコール(Cr)の抗生物質に対する耐性菌の割合
 - ③ 環境水 1ml 当りのコロニー形成数解析
 - ④ 単離細菌の 16SrDNA の塩基配列解析

(ク) 2009年9月 多摩川上流(奥多摩) 魚(ヤマメ、ウグイ)

- ① 各魚の腸内陽物からの全DNA抽出
- ② 全DNAのDGGE法とPCRを用いた16SrDNAの増幅、塩基配列解析

3. 調査・試験研究の方法

① 魚腸内容物g当りのコロニー形成数

- ・ 魚種による大きな差異は無かった。
- ・ 同じ魚種でも魚体により、 $10^3 \sim 10^7$ 個/gと大きな差異があった。
- ・ この差異は魚が摂取した食物を腸内で消化している時間帯によると推定される。

② コロニー形成菌中の抗生物質耐性菌の存在比率

- ・ 下流・中流に生息するマハゼやギンブナよりも回遊魚であるハゼの方が耐性菌の存在比率が高かった。
- ・ Ap耐性菌の平均存在比率は96%前後と非常に高かった。他はSm 5-12%、Cr 4-18%、Tc 1-5%と低かった。
- ・ 上記の抗生物質のうち、現代の日本ではApの使用量が高いが、耐性菌の存在比率の高さとの詳しい関連は不明である。

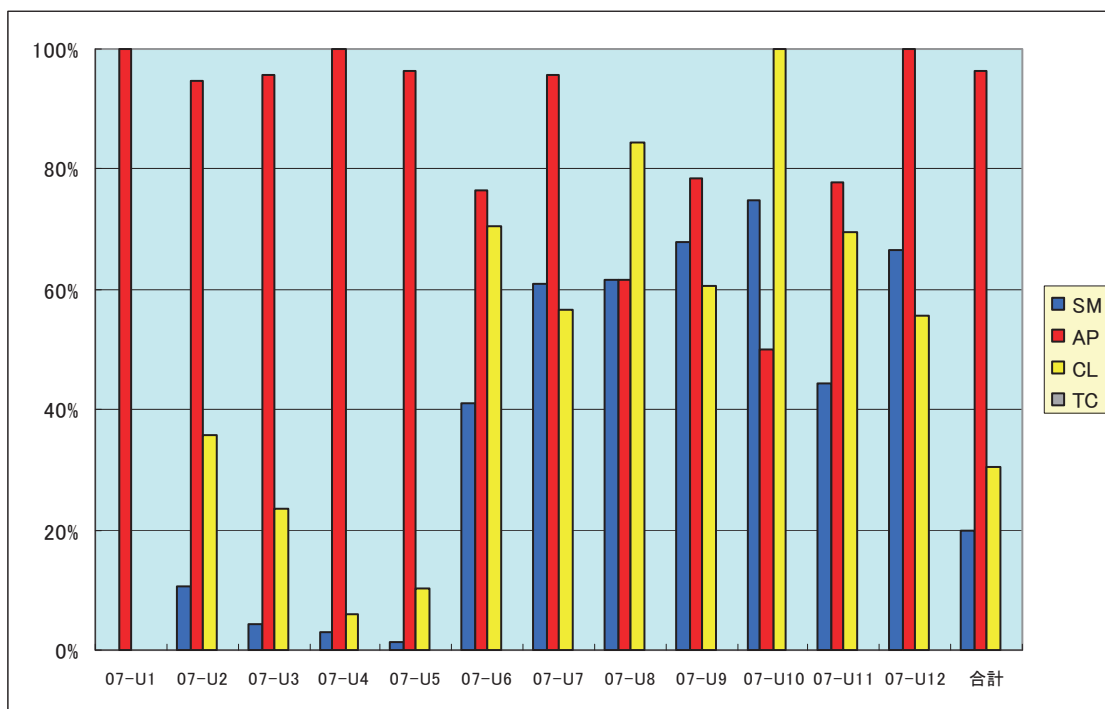


図2. 2007年度多摩川上流域サンプル分離株からの抗生物質耐性菌比率

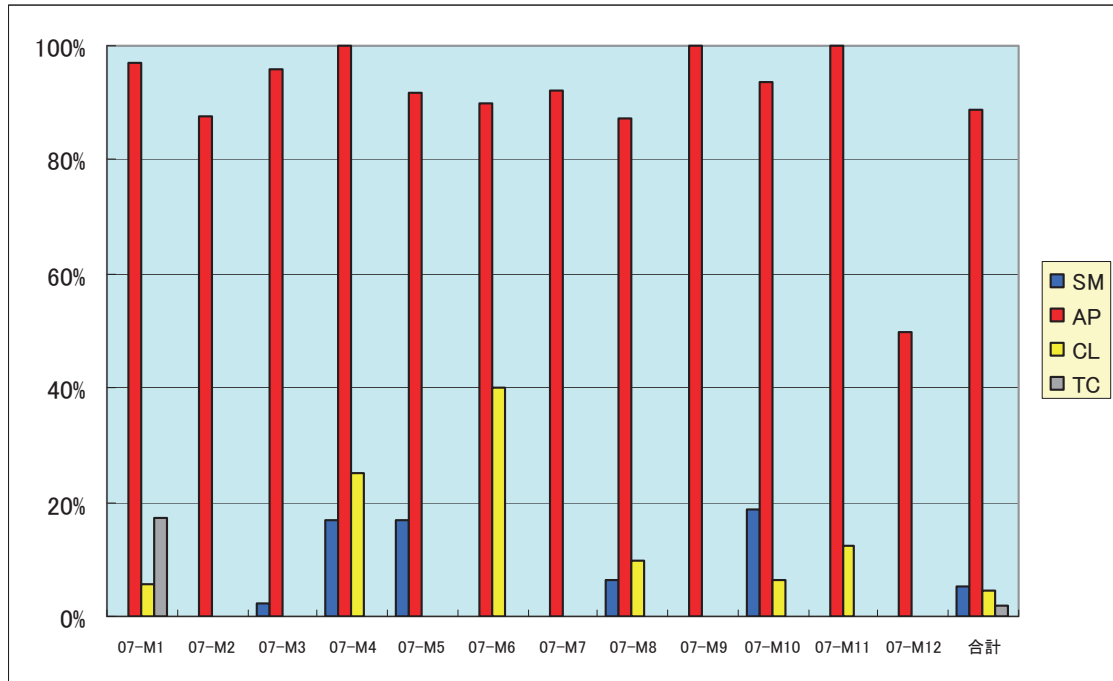


図 3. 2007 年度多摩川中流域サンプル分離株からの抗生物質耐性菌比率

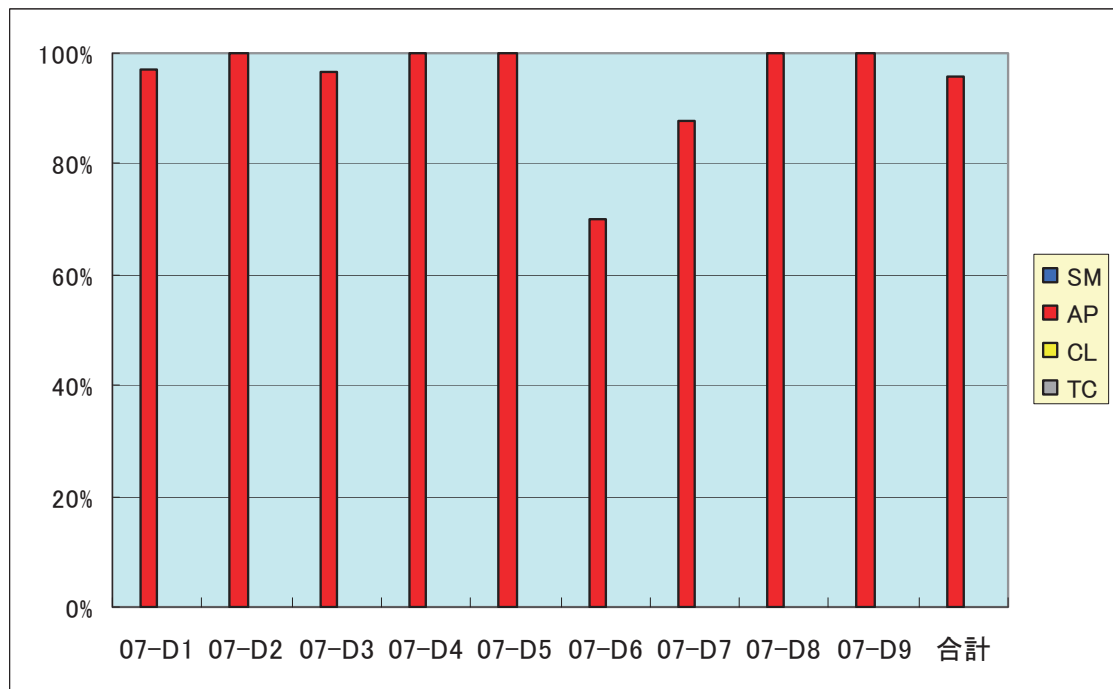


図 4. 2007 年度多摩川下流域サンプル分離株からの抗生物質耐性菌比率

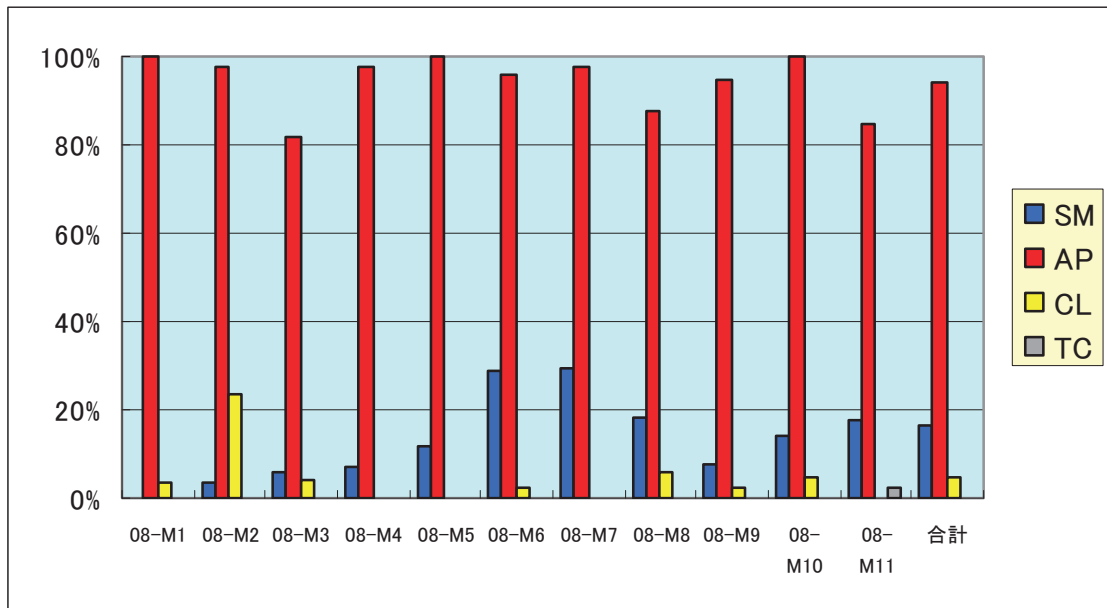


図 5. 2008 年度多摩川中流域サンプル分離株からの抗生物質耐性菌比率

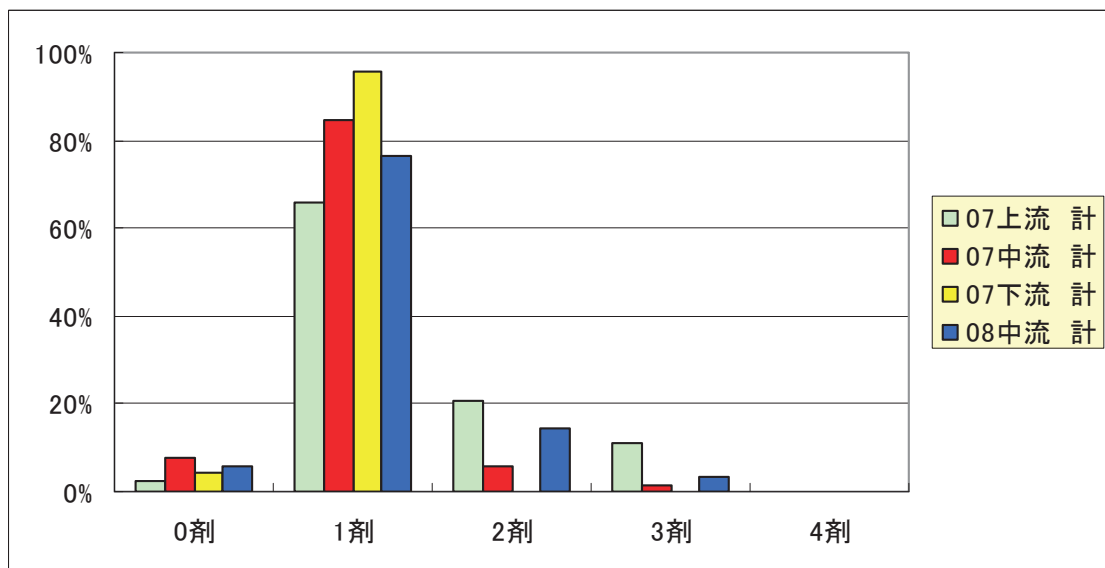


図 6. 多摩川魚類から分離した耐性菌の耐性を示す薬剤数とその割合

③ 環境水および底泥の生息微生物

- ・ 多摩川上流水 1ml 当りの生息菌数は、培地 10 種類により差があり、 $10^0 \sim 10^1$ 個であった。
- ・ 多摩川上流底泥 1ml 当りの生息菌数は、同様に $10^1 \sim 10^3$ 個であった。
- ・ 多摩川中流水 1ml 当りの生息菌数は、同様に $10^1 \sim 10^2$ 個であった。

- ・ 多摩川中流底泥 1ml 当りの生息菌数は、同様に $10^2 \sim 10^4$ 個であった。
- ・ 従って水圏環境中の菌数は、水よりも底泥、上流より中流と、溶存有機物濃度が高くなるにつれて、増加した。
- ・ 単離細菌を約 70 株同定したところ、主として *Pseudomonas fluorescence*, *Pseudomonasa synxantha*, *Acidovorax delafieldii*, *Streptomyces verne*, *Paenibacillus amylolyticus*, であった。

④ 環境水および底泥中の抗生物質耐性菌の存在比率

(環境水)

- ・ 上流：16.7%、中流：16.7%、下流：91.7%

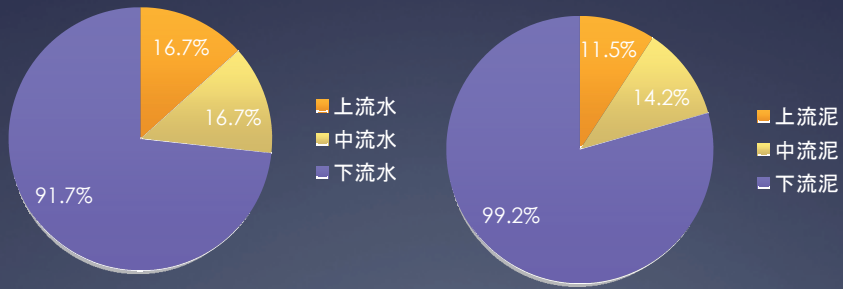
(底泥)

- ・ 上流：11.5%、中流：14.2%。下流：99.2%
- ・ 環境水と底泥では下流に多くの抗生物質耐性菌が生息することがわかった。

図7. 単離菌株の16s rDNA解析結果(抜粋)

No.	Acseccion	Name	Identity
TDWS 14	DQ377750	<i>Pseudomonas grimontii</i>	99.43%
TDWS 15	DQ377751	<i>Pseudomonas grimontii</i>	99.48%
TDWS 16	AY771737	<i>Flavobacterium frigidarium</i>	96.52%
TDWS 21	AY972408	<i>Pseudomonas veronii</i>	99.17%
TDWS 22	EF407880	<i>Flavobacterium cheniae</i>	96.93%
TDWS 31	AY559429	<i>Porphyrobacter donghaensis</i>	96.94%
TDMU 20P	EU570581	<i>Streptomyces colombiensis</i>	98.98%
TDMU 23	AY094364	<i>Streptomyces sanglieri</i>	99.19%
TDMU 25W	AB115960	<i>Paenibacillus amylolyticus</i>	99.29%
TDMU 26W	AJ011321	<i>Paenibacillus borealis</i>	95.19%
TDMU 27	Z84591	<i>Bacillus mycoides</i>	100.00%
TDMD 13CW 1	EU982882	<i>Paenibacillus taichungensis</i>	98.80%
TDMD 13CY 2	AB115960	<i>Paenibacillus amylolyticus</i>	99.18%
TDMD 16W 2	Z84587	<i>Bacillus thuringiensis</i>	99.13%
TDMD 22	DQ201414	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	99.87%
TIW 7	DQ257418	<i>Pseudomonas reactans</i>	99.87%
TMW 15	EU360313	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	99.18%
TMM_22	DQ201414	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	99.87%

図8. 培養可能な菌に対する耐性菌の割合



⑤ 環境水および底泥から抽出した全 DNA の DGGE 法による解析



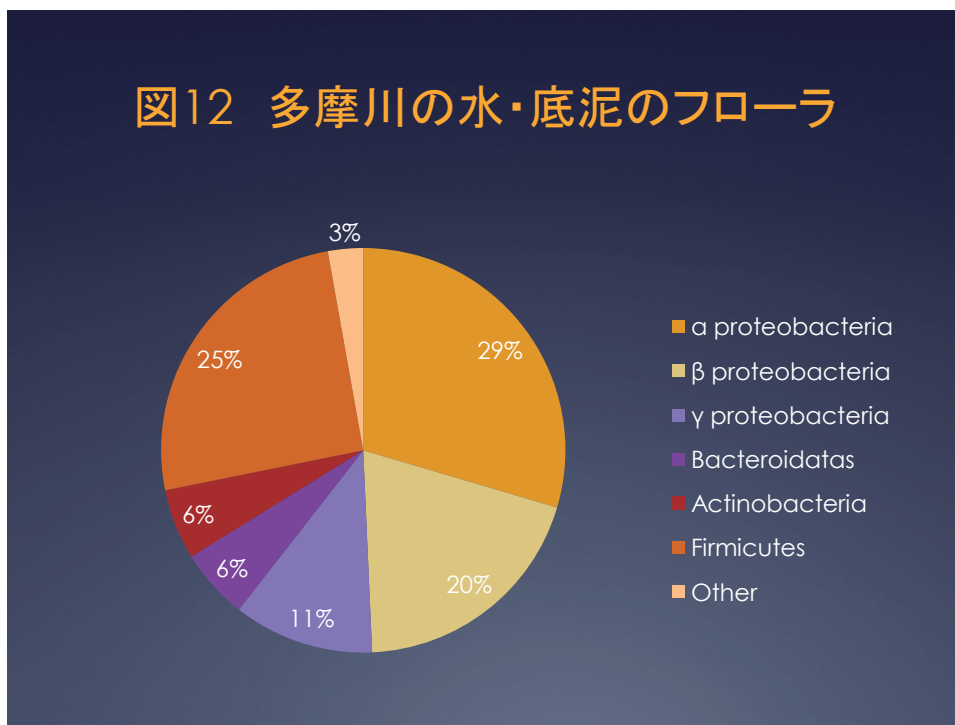
図 10. 環境水と底泥の全 DNA の 16SrDNA 産物の DGGE 結果

図11. DGGEバンドの16S rDNA解析結果

No.	Accession	Name	Identity
15	AM889031	Clostridium perfringens	95.24%
20	AY971749	Enterococcus faecium	95.00%
22	EU622834	Escherichia coli	96.43%
25	X73442	Clostridium botulinum	100.00%
26	CP000488	Candidatus Ruthia magnifica str. Cm	100.00%
30	DQ084460	Pseudomonas fluorescens	100.00%
37	EF536363	Lactobacillus plantarum	100.00%
41	DQ779010	Bacillus licheniformis	100.00%
42	FM865896	Pseudomonas sp. LDd	100.00%
44	FJ842670	Streptomyces sp. GW26-17	100.00%
46	FJ514026	Enterococcus sp. H297	100.00%
51	FJ883962	Rhodococcus corynebacterioides	100.00%
53	EF377306	Bacillus sp. CCBAU 13246	100.00%
62	FJ223881	Pseudomonas stutzeri	100.00%
66	AY395018	Enterococcus faecalis	100.00%
67	FJ788528	Pseudomonas aeruginosa	100.00%
69	AB126582	Pseudomonas aeruginosa	95.24%
70	EF672049	Pseudomonas fluorescens	100.00%
93	EU660339	Streptococcus dysgalactiae	100.00%

- DGGE バンドの 16SrDNA 塩基配列解析結果から、細菌種として *Clostridium*, *Enterococcus*, *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Streptomyces*, *Rhodococcus*, *Streptococcus* 属等が生息していた。
- 全体的に Protobacteria 門の細菌が多く典型的な河川の花ローラを成していた。

図12 多摩川の水・底泥の花ローラ



⑥ 魚腸内容物から抽出した全 DNA の DGGE 法による解析

図13 上流サンプル
DGGE結果

DNA変性剤濃度勾配
35%-55%で泳動

- a:U1 ヤマメ
- b:U2 ヤマメ
- c:U3 ヤマメ
- d:U4 ヤマメ
- e:U5 ヤマメ
- f:U6 ヤマメ
- g:U7 ウグイ
- h:U8 ヤマメ

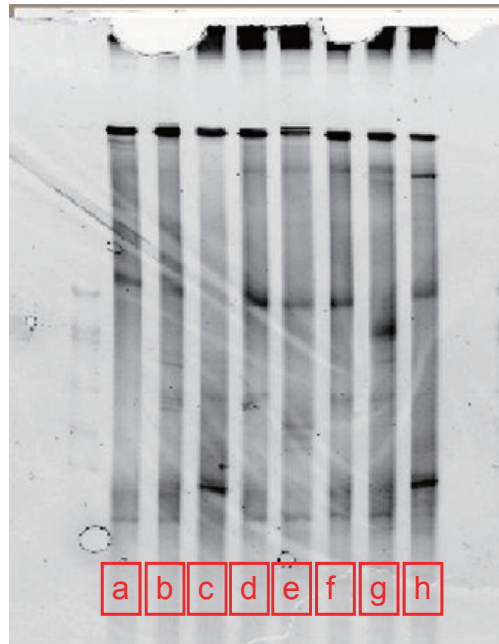


図14 中流サンプル
DGGE結果

変性剤濃度勾配35%-55%

- a: M1 ギンブナ
- b: M2 ナマズ
- c: M3 オイカワ
- d: M4 アユ
- e: M5 アユ
- f: M6 ニゴイ
- g: M7 オイカワ
- h: M8 オイカワ
- i: M9 オイカワ
- J: M10 オイカワ

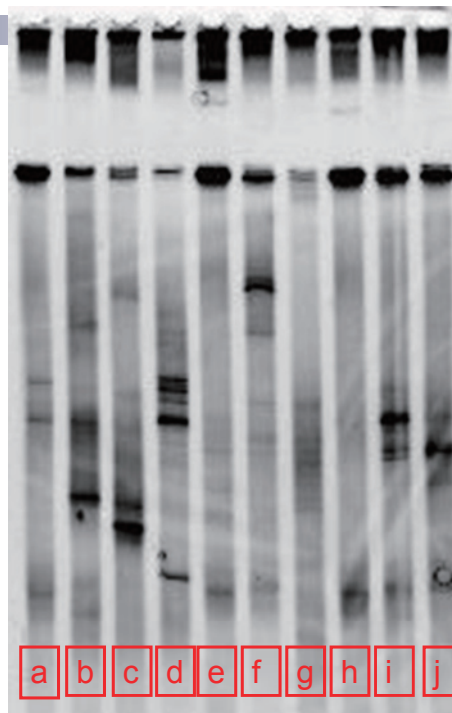


図15 魚腸内容物のDGGEによる同定

魚種	シーケンス結果	相同性
U1 ヤマメ-1	<i>Plesiomonas</i> sp.	97%
U1 ヤマメ-2	<i>Plesiomonas</i> sp.	96%
U3 ヤマメ-1	<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp.	94%
U3 ヤマメ-2	<i>Rahnella aquatilis</i>	98%
U6 ヤマメ-1	<i>Plesiomonas</i> sp.	98%
U6 ヤマメ-2	<i>Plesiomonas</i> sp.	97%
U7 ウグイ-1	<i>Plesiomonas</i> sp.	97%
U7 ウグイ-2	<i>Cetobacterium somerae</i>	99%
U8 ヤマメ-1	<i>Yersinia mollaretii</i>	98%
M1 ギンブナ-1	<i>Pseudomonas</i> sp.	99%
M1 ギンブナ-2	<i>Pseudomonas</i> sp.	97%

・ DGGE バンドの 16SrDNA 塩基配列解析結果から、細菌種として *Plesiomonas*, *Pectobacterium*, *Rahnella*, *Cetobacterium*, *Yersinia*, *Pseudomonas* 属等が生息していることがわかった。

⑦ 多摩川河口域における抗生物質耐性菌

図16 浮島 表層水の生菌数

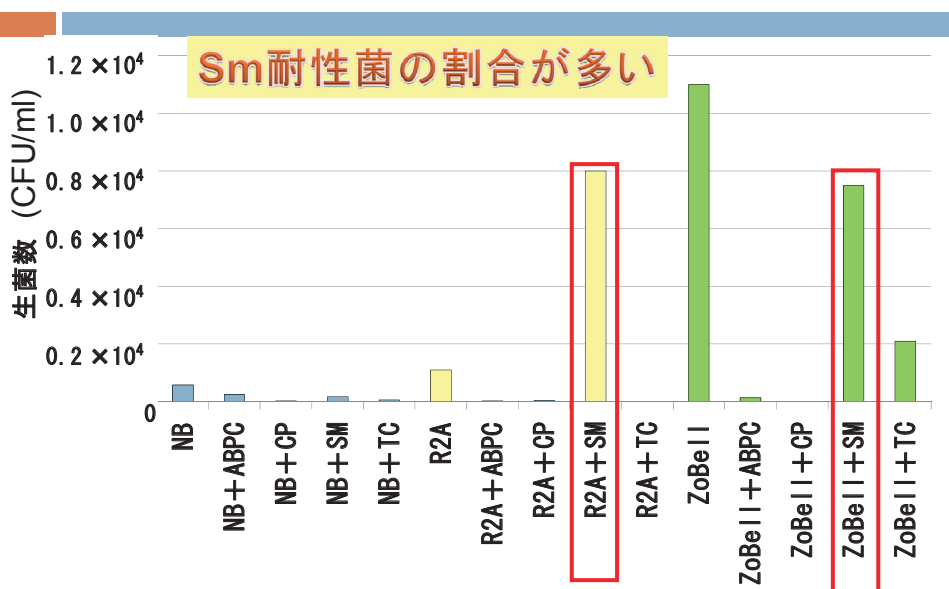


図17 浮島 **底泥**の生菌数

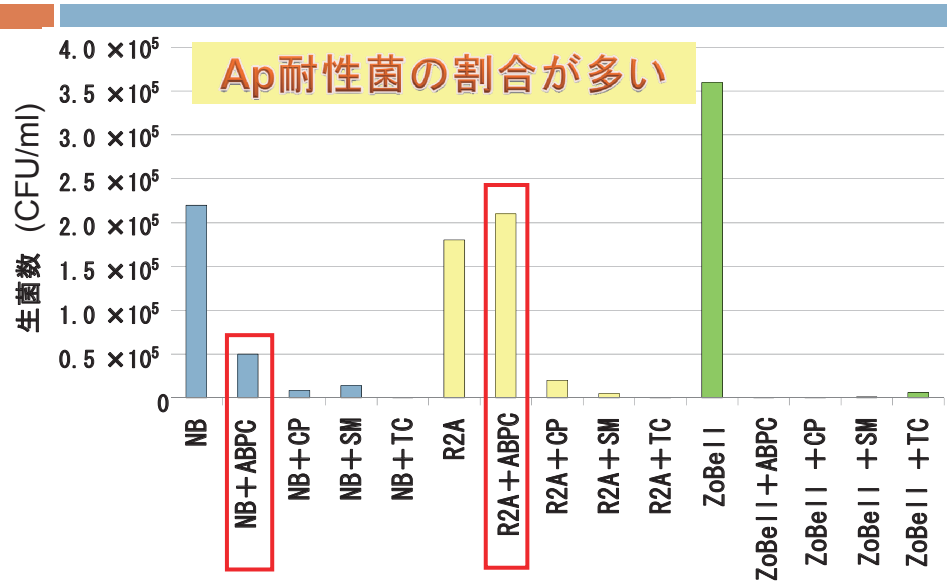


図18 ちどり公園 **表層水**の生菌数

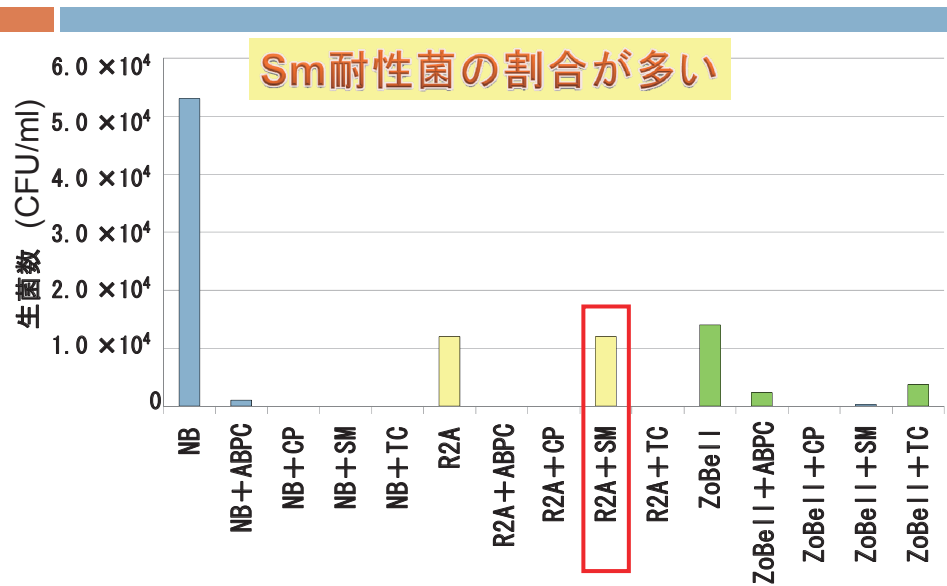


図19 ちどり公園 **魚類腸内容物の生菌数**

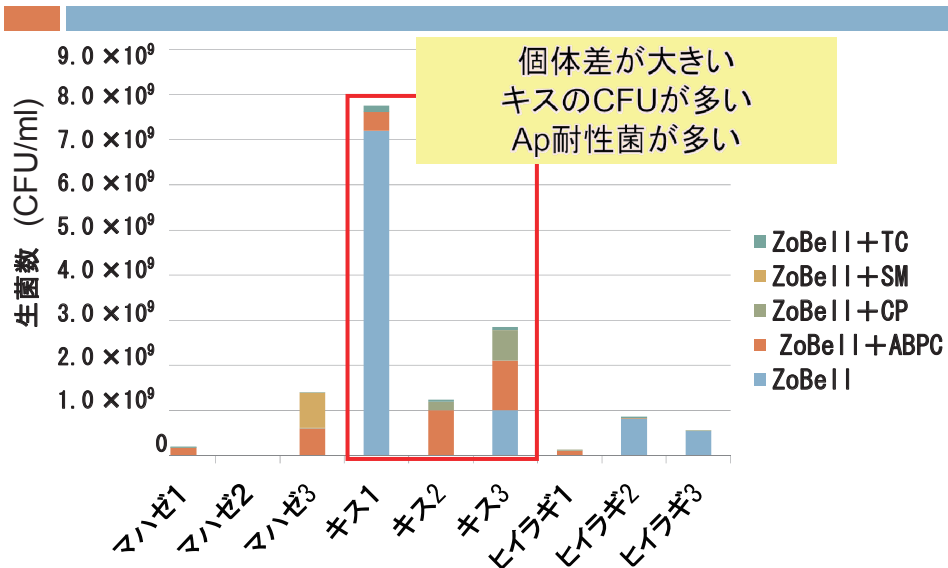


図20 浮島底泥中の病原性抗生物質耐性菌



- ・魚腸内容物と底泥には Ap 耐性菌が多く、環境水には Sm 耐性菌が多かった。
- ・底泥には病原性の抗生物質耐性菌として、*Aeromonas hydrophila*, *Burkholdela cepacia* が生息していた。

4. 総合的考察

多摩川に生息する全細菌中の抗生物質耐性菌比は環境水（表層水）と底泥では上流や中流と比べて、下流で非常に高いことがわかった。これは抗生物質が多摩川に流出すると、下流に向かって流れて行き、下流域での抗生物質濃度が高いことを示していると思われる。

一方、魚腸内容物中の抗生物質耐性菌比は、上流・中流・下流での流域傾向がほとんど無かった。これは魚が下流から上流へ向かって移動する可能性があることと、多摩川の魚は天然物と放流物があり、成長段階での環境が一応で無いことに基因している可能性がある。また、魚腸内容物と底泥にアンピシリン耐性菌が多く、環境水にストレプトマイシン耐性菌が多いことがわかった。これはアンピシリンとストレプトマイシンの水溶解度差が原因と判断される。

本研究の2年間では DGGE 法を利用して細菌フローラに及ぼす抗生物質の影響を DNA レベルから解析することが十分に達成できなかった。今後も研究を継続して行く予定である。

文献

1. 村田ら、日本の河川の抗生物質汚染の実態解明、第15回環境化学討論会、日本環境化学会(2006).
2. A. B. Sturtevant et al., Incidence of infections drug resistance among fecal colineforms isolated from raw sewage, *Appl. Microbiol.*, 21, 487-491(1971).
3. J. B. Bell et al., Incidence of R factors in colineform, fecal colineform, *Salmonella* populations of the red river in Canada, *Appl. Environ. Microbiol.*, 40, 486-491(1980).
4. J. B. Bell et al., R factors in colineform-fecal colineform sewage flora of the prairies and northwest territories of Canada, *Appl. Environ. Microbiol.*, 42, 204-210(1981).
5. J. B. Bell et al., Influence of sewage treatment and utilization and urbanization on selection of multiple residence in fecal colineform populations, *Appl. Environ. Microbiol.*, 46, 227-232(1983).
6. M. V. Walter et al., Occurrence of multiple-antibiotics-resistant enteric bacteria in domestic sewage and oxidation lagoons, *Appl. Environ. Microbiol.*, 50, 930-933(1985).
7. M. Arvanitidou et al., Transferable antibiotics resistance among *Salmonella* strains isolated from surface waters, *Wat. Res.*, 5, 1112-1116(1997).
8. T. Iwabe, T. Urase, and K. Yamamoto, Possible impact of treated wastewater discharge on incidence of antibiotic resistant bacteria in river water, *Wat. Sci. Tech.*, 43, 91-99(2001).

たまがわせいそくぎよるい ちょうない しゅうへんかんきょうすい さいきんそう およ かがくぶっしつ えいきょう
多摩川生息魚類の腸内および周辺環境水の細菌叢に及ぼす化学物質の影響

(研究助成・学術研究VOL. 39—NO. 289)

著者 うらの なおと
浦野 直人

発行日 2011年3月31日

発行者 公益財団法人 とうきゅう環境財団

〒150-0002

東京都渋谷区渋谷1-16-14 (渋谷地下鉄ビル内)

TEL (03) 3400-9142

FAX (03) 3400-9141

<http://home.q07.itscom.net/tokyuenv/>