

令和5年度 水質保全研究助成 成果報告会

発表者資料

〔令和6年3月22日〕



公益財団法人 琵琶湖・淀川水質保全機構

## 目 次

		頁
1. 食物連鎖によるプランクトンおよび小型魚類への抗菌薬耐性菌・耐性遺伝子蓄積の検証	京都大学大学院 医学研究科 徳野 治 准教授	1- 1 } 13
2. 琵琶湖で新たにブルームを形成するようになった微細藻類の分類学的・水処理生物学的研究	滋賀県立琵琶湖博物館 大塚 泰介 総括学芸員	2- 1 } 11
3. 前塩素処理・粉末活性炭処理を用いた超親水性溶存有機物の制御	京都大学大学院 地球環境学堂 多田 悠人 助教	3- 1 } 19
4. 琵琶湖・瀬田川流域における抗生物質による水環境汚染の実態解明	立命館大学（総合科学技術研究機構） 澤田 和子 専門研究員	4- 1 } 7

食物連鎖によるプランクトンおよび小型魚類への  
抗菌薬耐性菌・耐性遺伝子蓄積の検証

京都大学大学院 医学研究科  
徳野 治 准教授

公益財団法人 琵琶湖・淀川水質保全機構  
令和5年度水質保全研究助成  
成果報告会

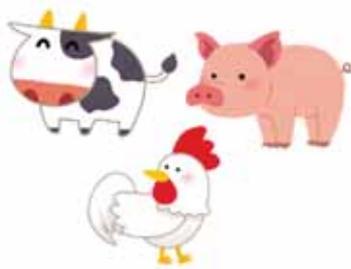
# 食物連鎖によるプランクトンおよび小型魚類への 抗菌薬耐性菌・耐性遺伝子蓄積の検証

京都大学大学院医学研究科  
人間健康科学系専攻  
徳野 治

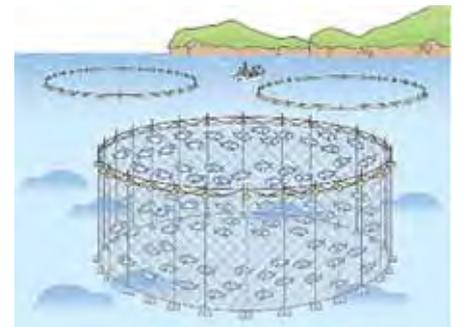
## 抗菌薬（抗生物質）を使う事業所



医療機関



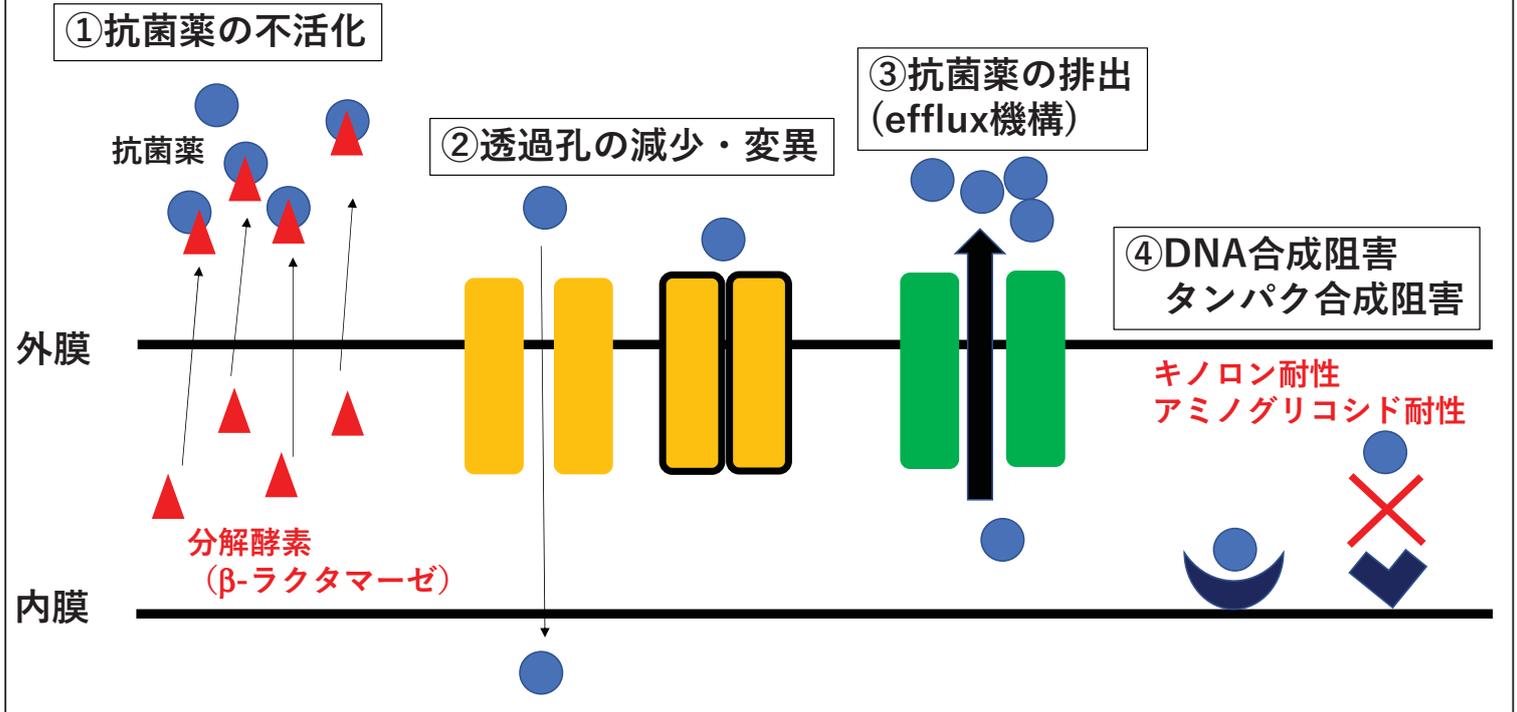
獣医・畜産



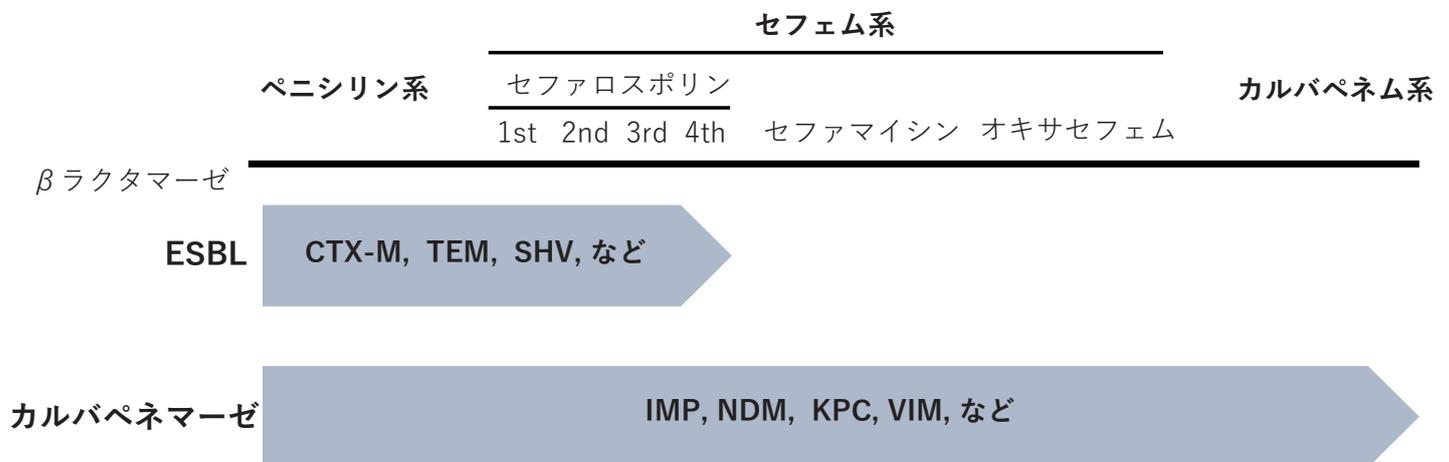
養殖水産

「耐性菌」が発生しやすい場所でもある

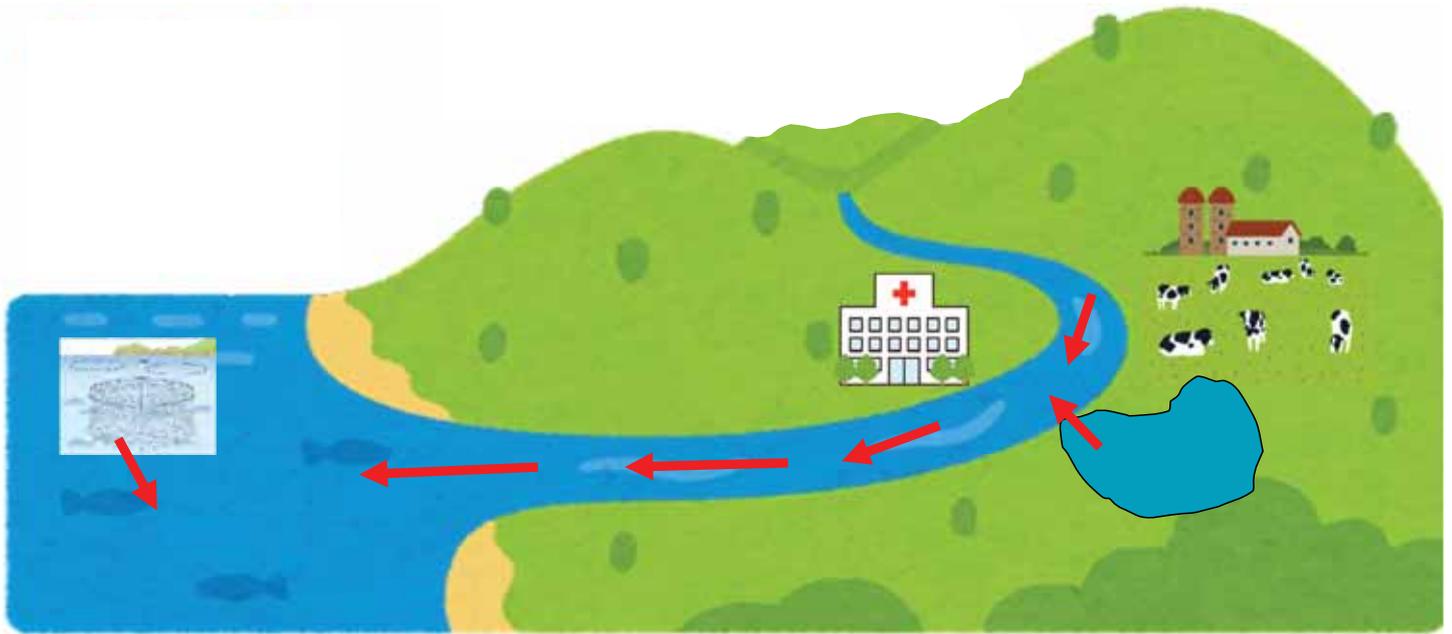
## 抗菌薬耐性機構の概要



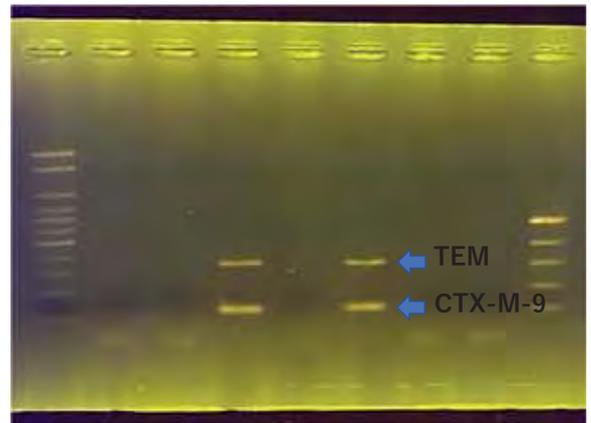
## 耐性菌が産生するβ-ラクタマーゼとその基質



# 水圏へ流出拡散する抗菌薬耐性菌・耐性遺伝子



## 鴨川（荒神橋付近）



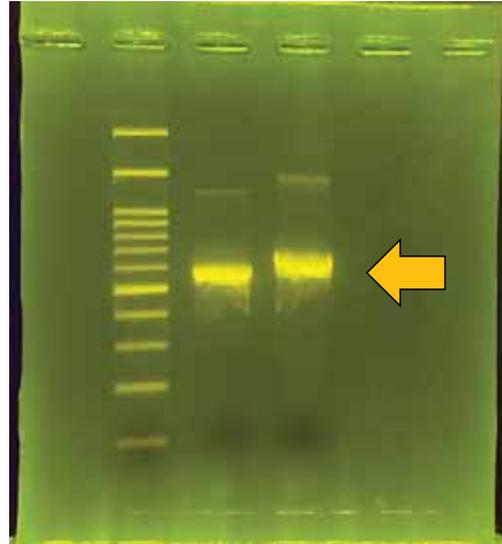
これまでに・・・

- ・ CTX-MとTEMをもつESBL産生大腸菌
- ・ ESBL産生肺炎桿菌
- ・ シプロフロキサシン（キノロン）耐性大腸菌

## 淀川中流（3 河川合流域）



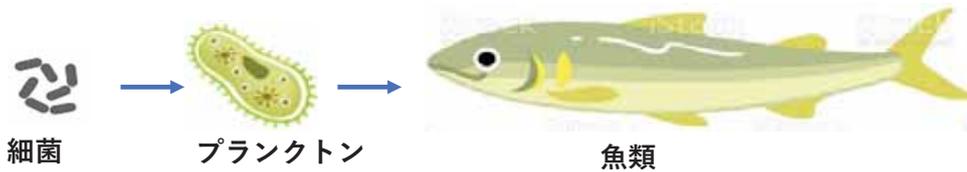
メタロ-β-ラクタマーゼ産生



耐性遺伝子：IMP-7

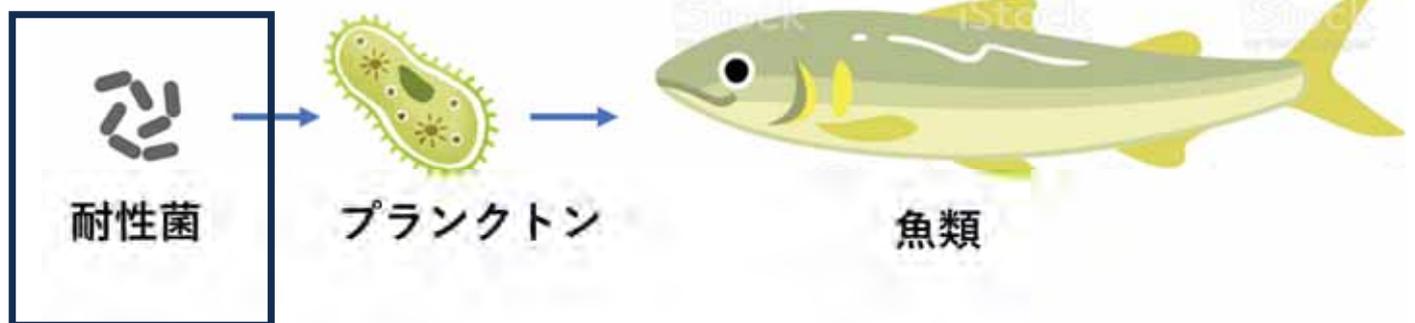
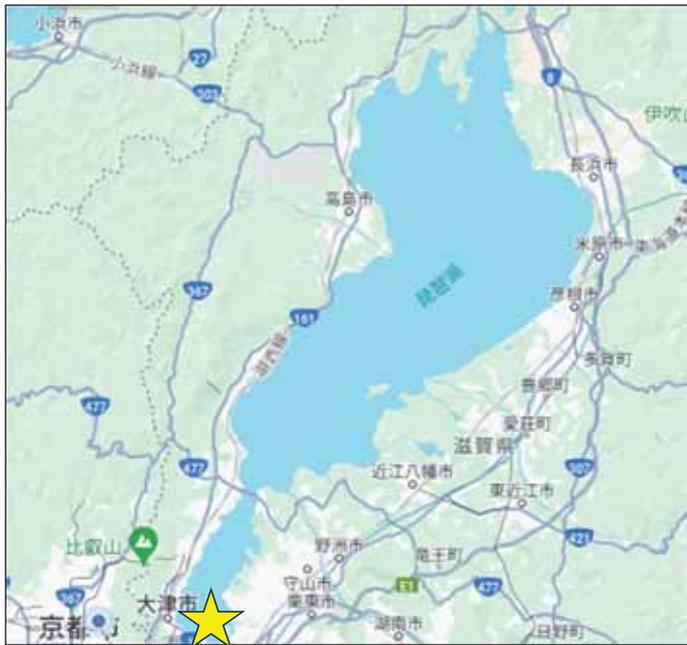
菌種：*Acinetobacter sp.*

## 食物連鎖上の耐性遺伝子の流れ



食物連鎖を介した抗菌薬耐性遺伝子水平伝播





# 方法



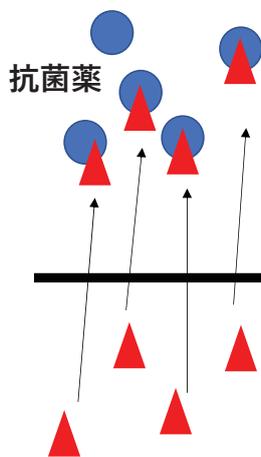
湖水試料  
Glass fiber filter (平均孔径0.4 $\mu$ m)でろ過  
フィルター捕捉物よりDNAを抽出

ろ液  
membrane filter (0.22 $\mu$ m)でさらにろ過し、  
超遠心 (200,000g、90min)

沈渣を少量のPBSに浮遊→フロースルー画分

## 対象とした耐性遺伝子

抗菌薬の不活化



$\beta$ -ラクタマーゼ  
(ESBL, カルバペネマーゼ)

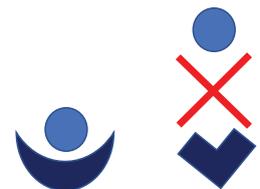
抗菌薬の排出

*tet (A)*  
テトラサイクリン耐性

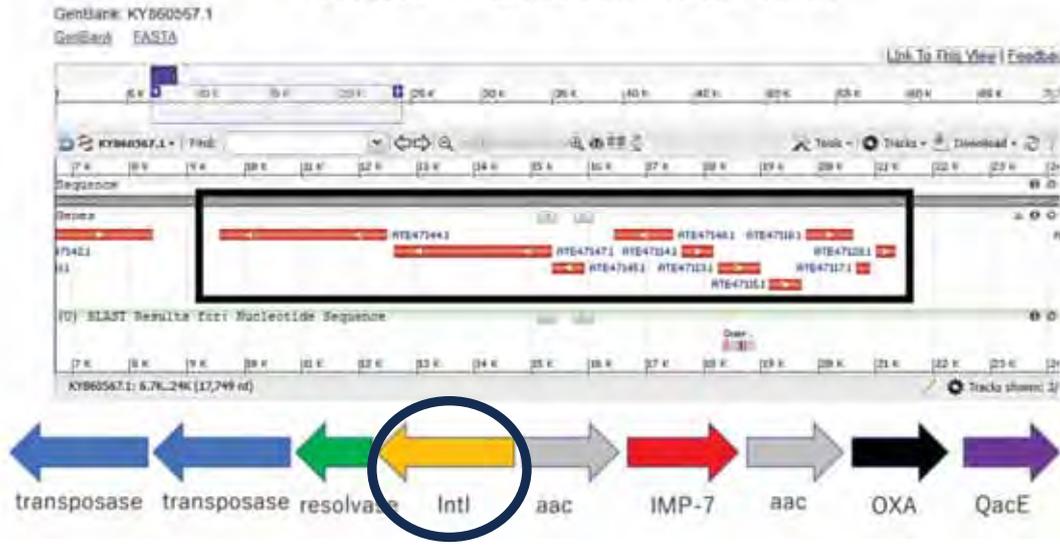


DNA合成阻害

*sul1*  
サルファ剤耐性



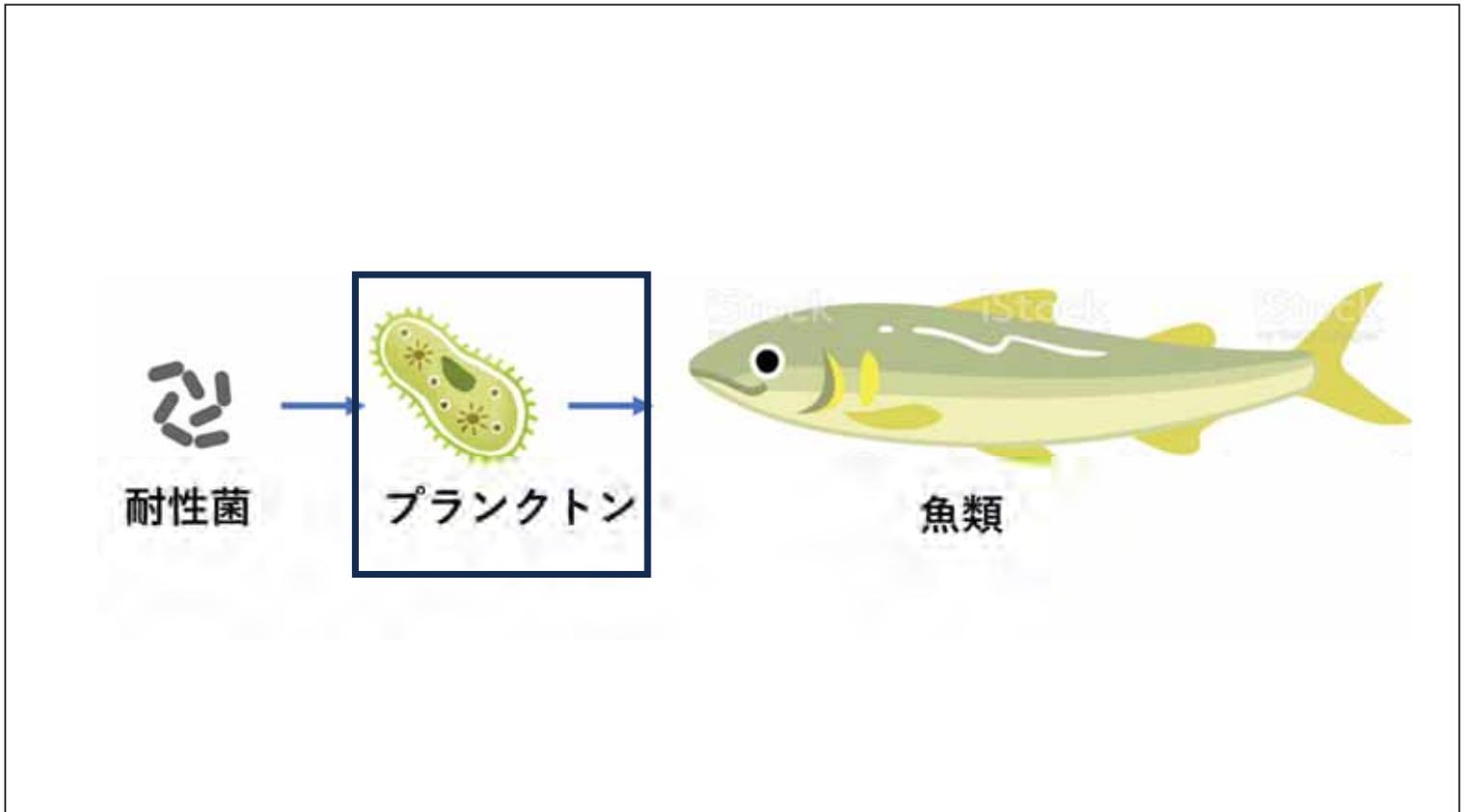
## 薬剤耐性インテグロン (トランスポゾン) —多剤耐性機構の集積と転移



インテグラーゼ (IntI)

## 検出された耐性遺伝子

	2月	5月	7月	10月
フィルター 捕捉物	IMP	IMP, OXA, VIM, <i>tet(A), sul1, intl</i>	IMP, OXA, VIM, <i>tet(A), sul1, intl</i>	<i>tet(A), sul1, intl</i>
フロースルー	IMP, NDM, SHV <i>tet(A), sul1, intl</i>	VIM, <i>tet(A), sul1, intl</i>	VIM, intl	IMP, <i>tet(A), sul1</i>





AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY Applied and Environmental Microbiology®

PUBLIC AND ENVIRONMENTAL HEALTH MICROBIOLOGY

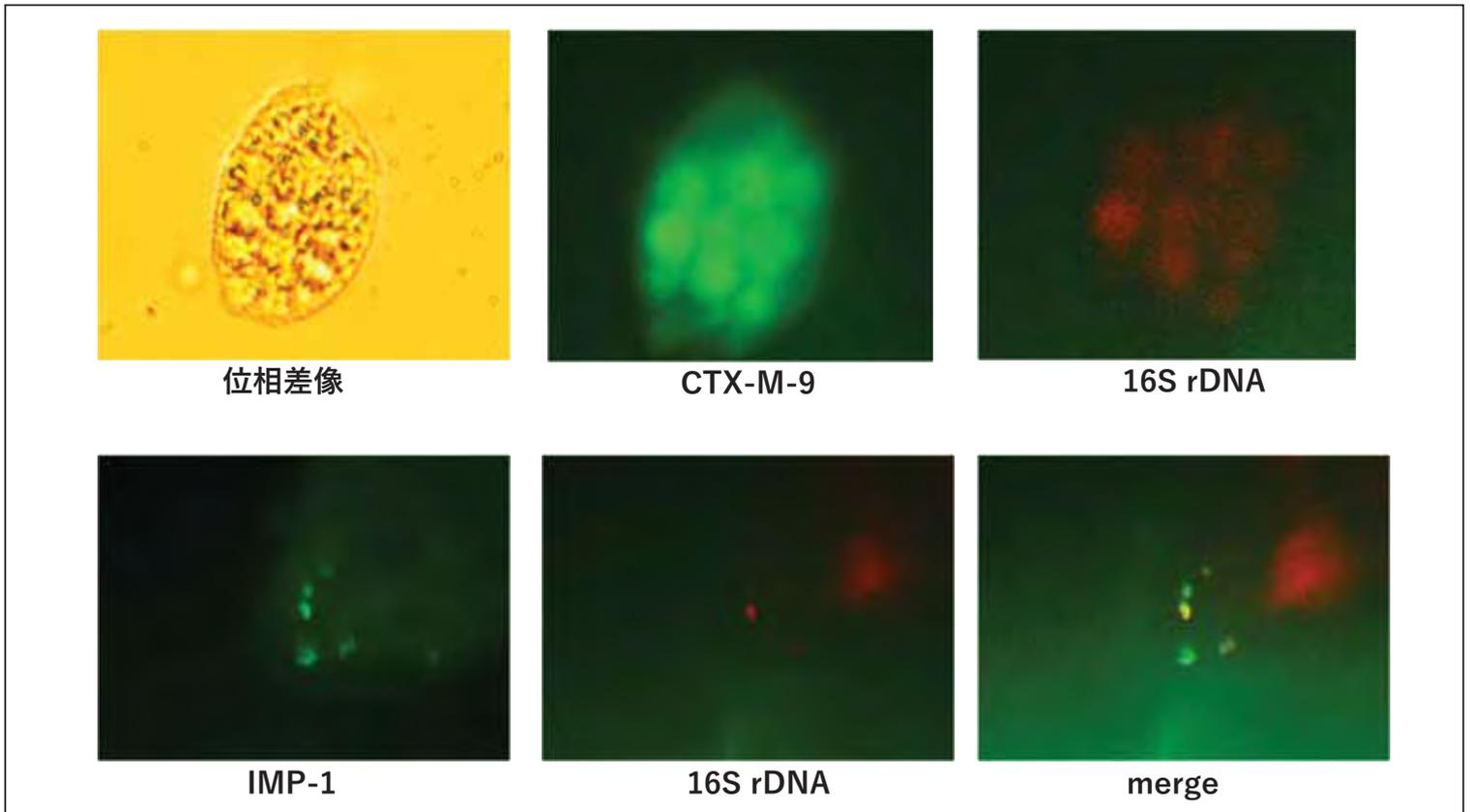
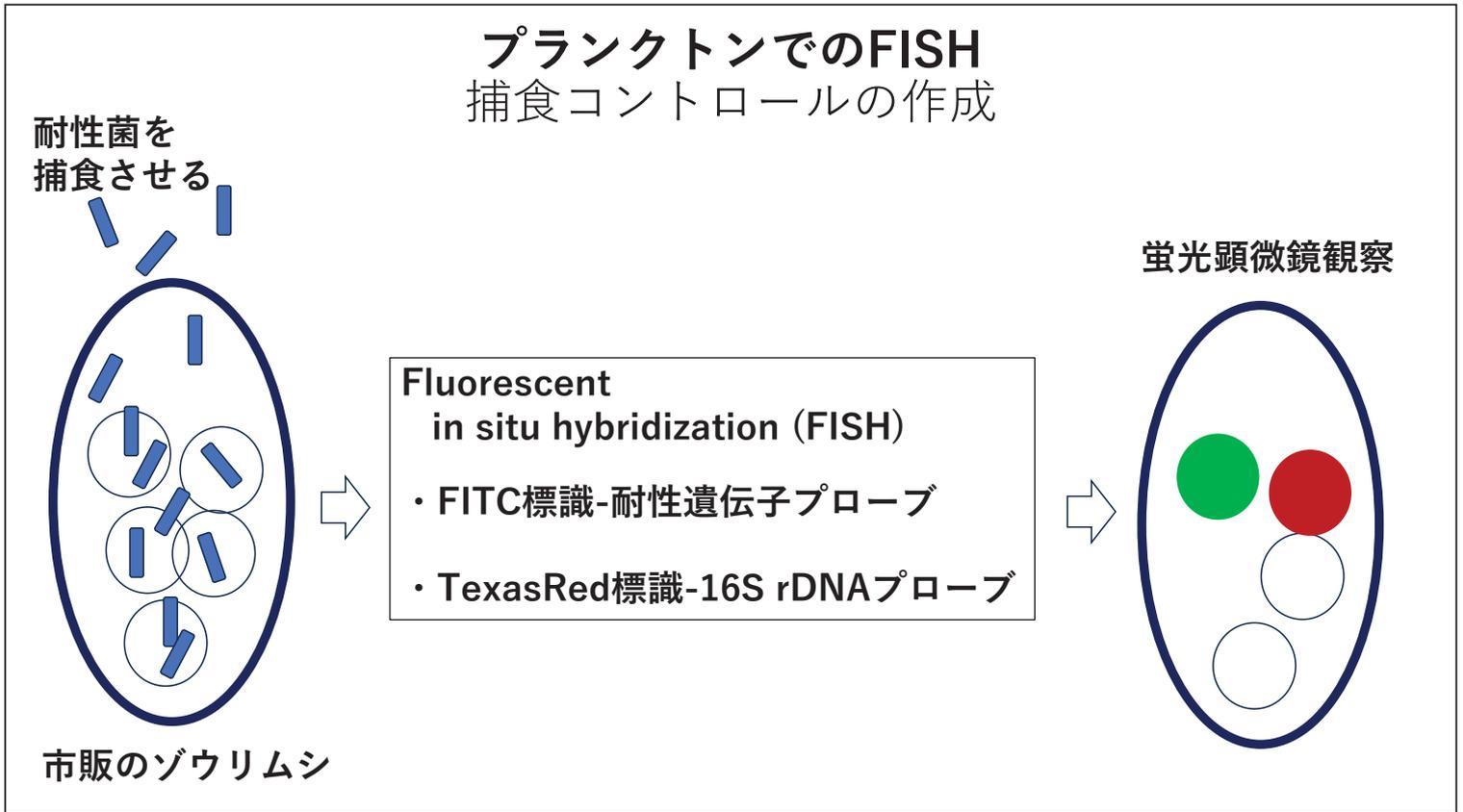


## Linezolid Resistance Genes in Enterococci Isolated from Sediment and Zooplankton in Two Italian Coastal Areas

Simona Fioriti,<sup>a</sup> Sonia Nina Coccitto,<sup>a</sup> Nicholas Cedraro,<sup>b</sup> Serena Simoni,<sup>b</sup> Gianluca Morroni,<sup>a</sup> Andrea Brenciani,<sup>a</sup> Gianmarco Mangiaterra,<sup>b</sup> Carla Vignaroli,<sup>b</sup> Luigi Vezzulli,<sup>c</sup> Francesca Biavasco,<sup>b</sup> Eleonora Giovanetti<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Department of Biomedical Sciences and Public Health, Polytechnic University of Marche, Ancona, Italy  
<sup>b</sup>Department of Life and Environmental Sciences, Polytechnic University of Marche, Ancona, Italy  
<sup>c</sup>CISTAV, Department of Earth, Environment, and Life Sciences, University of Genoa, Genoa, Italy  
 Simona Fioriti, Sonia Nina Coccitto, and Nicholas Cedraro contributed equally to this work. Author order was determined based on the number of experiments performed.

プランクトン体内の薬剤耐性遺伝子を可視化できないか？



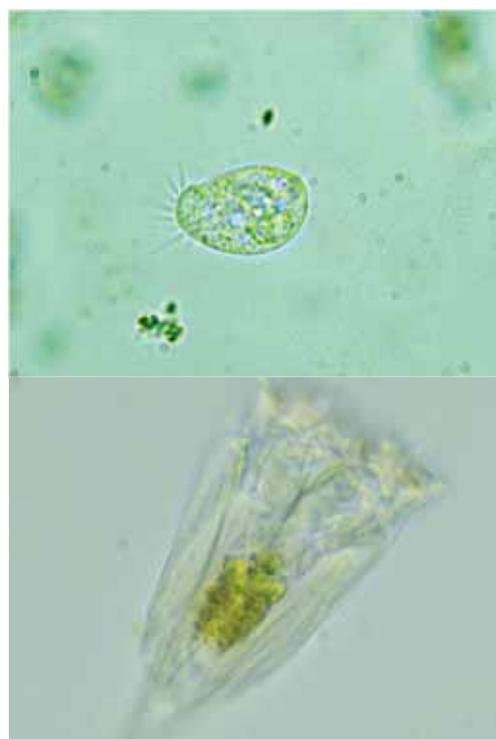
## 現地サンプリング



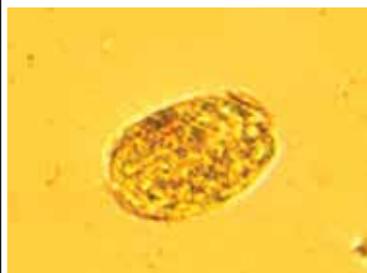
2 L採取



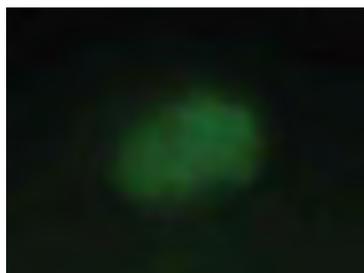
1 ~ 2 mLまで濃縮



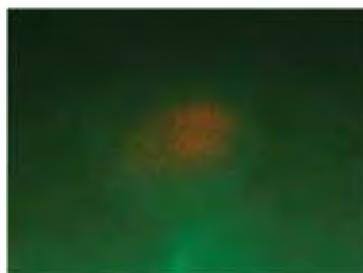
## 琵琶湖プランクトンにおけるFISH



ゾウリムシのなかま？



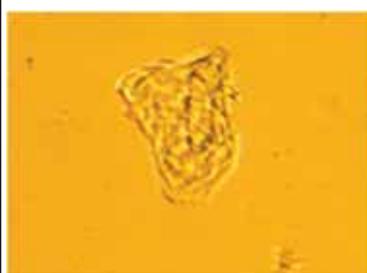
*tet(A)*



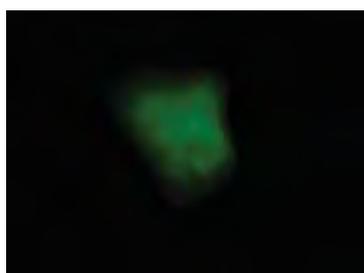
16S rDNA



merge



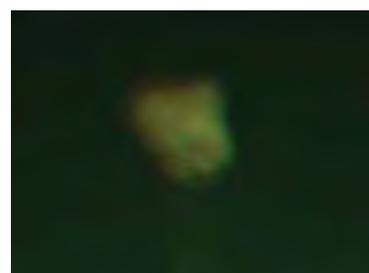
ワムシのなかま？



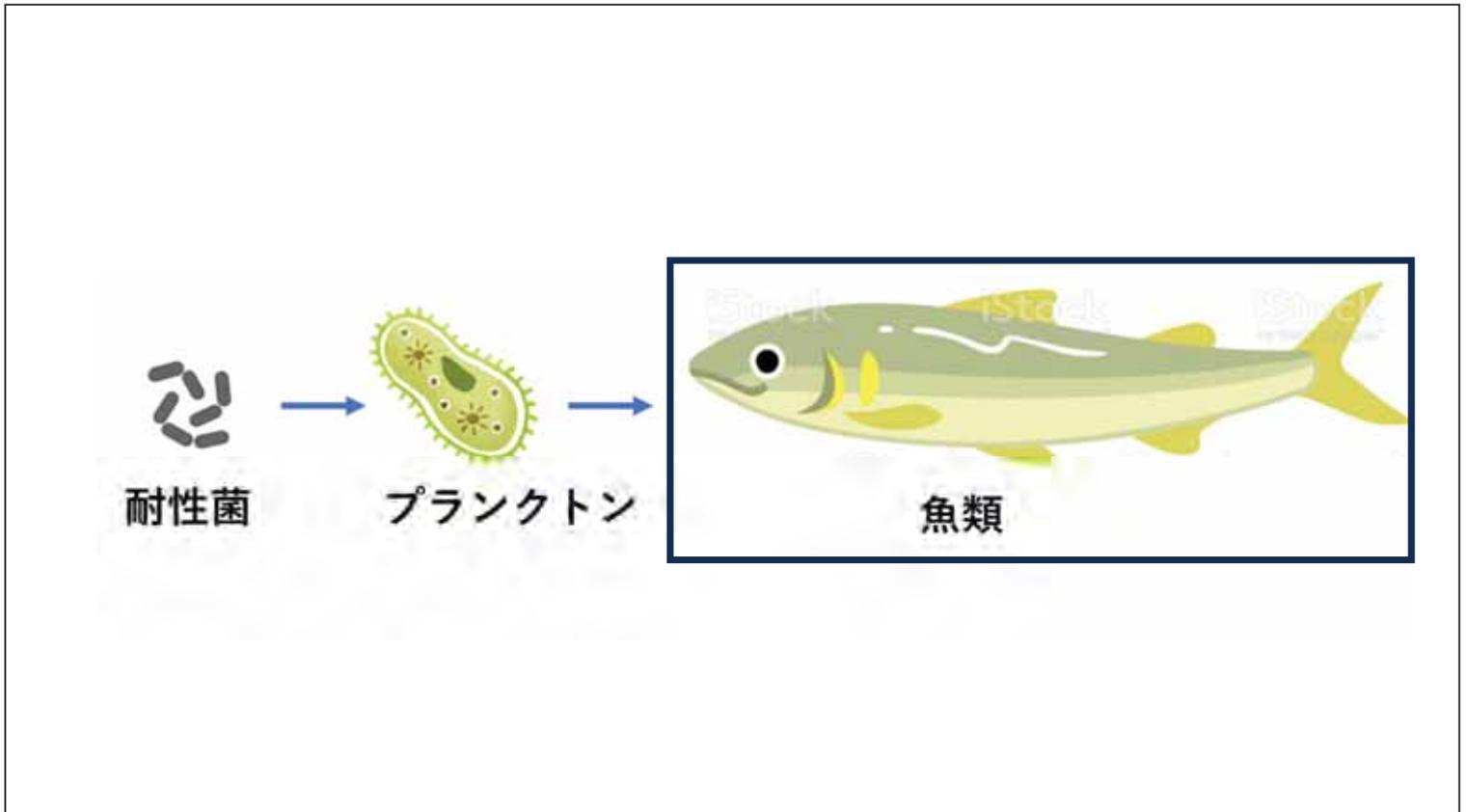
*sul1*



16S rDNA



merge



### フィッシングによる魚類検体採取

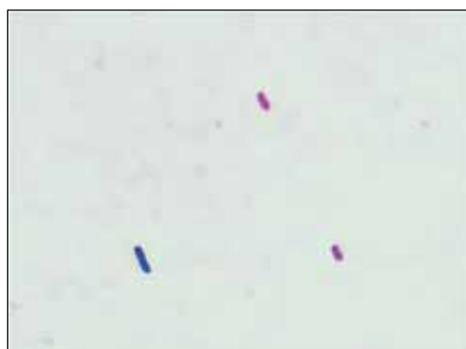


小鮎 体長10センチほど

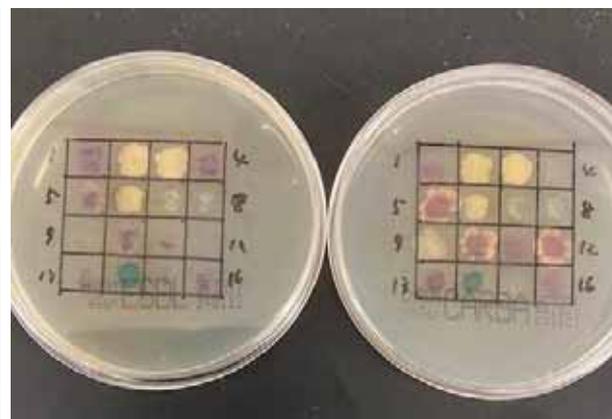
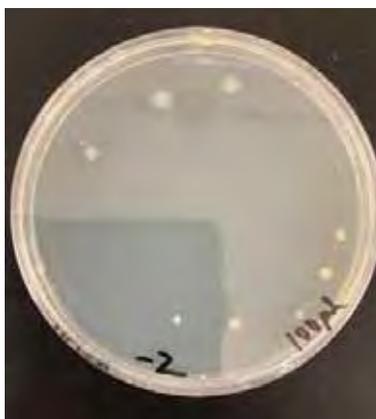


腸内容物を採取

## 菌種同定と耐性遺伝子検索



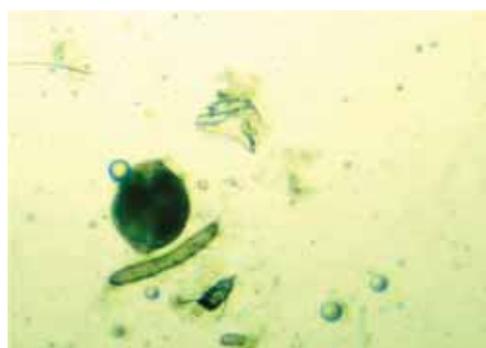
グラム染色 1,000倍



16S rDNA シーケンス  
⇒ *Aeromonas hydrophila*

耐性遺伝子は今回検出できず

## 腸内容物において観察された プランクトン残渣



## まとめと課題

- 湖水試料より各種抗菌薬耐性遺伝子が検出された
- プランクトンにおけるFISHによる抗菌薬耐性遺伝子の可視化
- 魚腸からは、淡水域でポピュラーなAeromonas sp.が検出された
- 魚腸から耐性遺伝子は検出できなかった ⇒ n 数不足
- 直ちに健康への影響を論じるものではないが、耐性菌や耐性遺伝子の人体内への侵入経路としての可能性

## 謝辞

本研究は、公益財団法人 琵琶湖・淀川水質保全機構の「令和5年度水質保全研究助成」を受け、行いました。

ここに記し、感謝の意を表します。

琵琶湖で新たにブルームを形成するようになった微細藻類の  
分類学的・水処理生物学的研究

滋賀県立琵琶湖博物館  
大塚 泰介 総括学芸員

令和5年度 水質保全研究助成 成果報告会

# 琵琶湖で新たにブルームを形成するようになった微細藻類の分類学的・水処理生物学的研究



琵琶湖周辺に生息する日本一長いミミズ！ハッタミミズを大...

YouTube



大塚泰介  
根来 健  
(琵琶湖博物館)

おしながき

- 研究目的
- 研究方法
- 年度当初に研究を計画していた種の研究進展状況
  1. *Planktothrix pseudagardhii* Suda & Watanabe, nom. nud.
  2. *Raphidiopsis raciborskii* (Woloszynska) Aguilera et al.
  3. *Discostella* sp.
  4. *Fragilaria* sp.
  5. *Fragilaria longifusiformis* ssp. *eufofusiformis* Lange-Bertalot & S.Ulrich
  6. *Ulnaria japonica* (F.Meister) Tuji
- 新たに研究対象に加えた種の研究状況
  1. *Dolichospermum minisporum* sensu Ohtsuka et al.
  2. *Achnantheidium catenatum* (Bílý & Marvan) Lange-Bertalot
  3. *Uroglenopsis* sp.
  4. *Cymbella compactiformis* B.Liu & D.M.Williams
  5. *Sellaphora constrictum* Kociolek & Q-M.You
- 研究成果の統合と発信
- 今後の課題
- 本研究と関連した成果公表

## 研究目的

- 今世紀に入って新たに琵琶湖および内湖でブルームを生じるようになった微細藻類のいくつかについて
  - 形態、遺伝子、発生状況などの基本情報を解明
  - 浄水場などへの影響を検討
- 琵琶湖博物館で作成を計画しているプランクトン図鑑に、当該種的基本的情報を掲載する。
- さらに琵琶湖集水域で最近になって見られるようになった付着藻類のうち、HAB（有害藻類ブルーム）を引き起こす恐れがある種についても、同定して出現状況を報告する。

## 研究方法

- 烏丸半島（琵琶湖南湖東岸）および西の湖でプランクトンネットおよび採水によってプランクトンを定期的に採集する。
- 関係者から寄せられた情報を手がかりに、サンプルをいただいたり現地に採集に行ったりして追加材料を集める。
- 珪藻についてはクリーニングをして殻だけにした上で、光学顕微鏡および走査電子顕微鏡で形態観察する。
- 同定が困難な場合には十分な文献調査を行った上で、専門家に同定を依頼する。
- 必要に応じて単離培養を行い、国立科学博物館の辻 彰洋博士に送って遺伝子（主に*rBCL*）解析を行って同定を確認する。

## 年度当初に研究を計画していた種の研究進展状況 1. “*Planktothrix pseudagardhii*”

- 2021年10月に西の湖でアオコの優占種になり、国立科学博物館で形態と遺伝子の両面から調べたところ、日本から初報告の本種であることが明らかになった。
- これまでタイ、モンゴル、中国から報告されているが、日本からの報告はない。本種が外来種かどうかは不明。以前から琵琶湖にわずかながら生育し、*Oscillatoria tenuis*、*Planktothrix agardhii*などと誤同定されてきた可能性が捨てられない。
- 本種は国際原核生物命名規約により記載されているが、国際藻類・菌類・植物命名規約からは不当名である。そこで辻彰洋氏を中心に、本種を日本から初めて正式に報告するとともに、植物・藻類・菌類命名規約による正式な記載の準備をしている。

### 本年度の研究の進展なし

100 μm

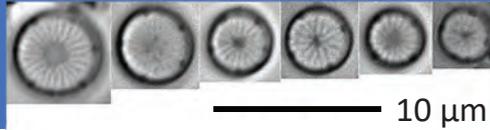
## 年度当初に研究を計画していた種の研究進展状況 2. *Raphidiopsis raciborskii*

- 2022年夏に琵琶湖でわずかに出現。その後10月～12月に、琵琶湖博物館生態観察池でアオコを形成。
- 世界的に分布を拡大しており、最も悪名高い浮遊ラン藻になりつつある。
  - 琵琶湖ではセタシジミなどに取り込まれ、貝毒を引き起こす危険性→琵琶湖博物館産株の毒性は国環研の調査待ち
- 本種は従来、熱帯性とされている。温帯湖沼では夏期の水温25℃以上の条件でのみブルームを形成するとされてきた。培養実験でも、ほぼ全ての株が15℃以上で増殖し、至適水温は30℃程度。
- しかし近年、中国などで水温15℃以下でも本種がブルームを引き起こす事例が報告されており、低水温耐性のある生態型の出現が示唆されている。
- 琵琶湖博物館生態観察池では2023年6～10月に再び発生し、7～9月には著しいブルーム（10<sup>8</sup>トリコーム/L程度）を形成した。
  - 現在進めている池干しで発生を抑えられるか？

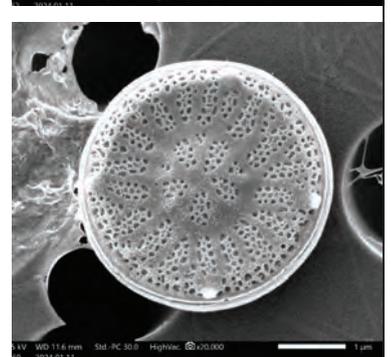
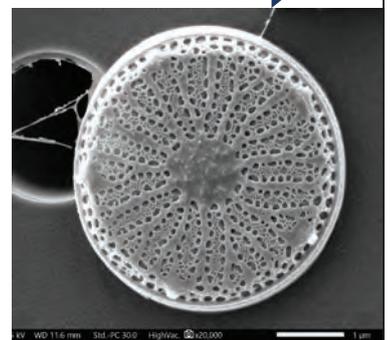
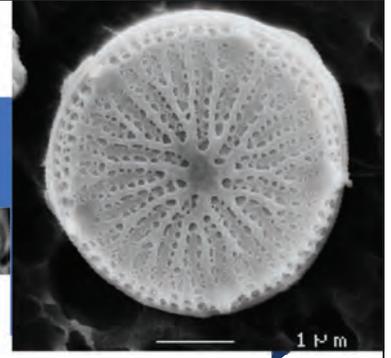


## 年度当初に研究を計画していた種の研究進展状況

### 3. *Discostella* sp.



- 直径3-5 μmの、ごく小型の円盤型珪藻。
- 2021年1-2月に、琵琶湖南湖で珪藻の優占種になっていた（ただし細胞数の上で）。以後も冬期にまとまった量が発生している。
- 1979年に琵琶湖南湖で採集された試料にも本種と思われる珪藻が大量に含まれており、近年侵入した種ではない（後藤敏一氏；私信）。
- 辻彰洋氏が国立科学博物館のエキシカータで*Discostella* sp. Kasumiとして報告した種と酷似している。
- 本種はChang & Chang-Schneider (2008) が*Discostella nana* (Hustedt) T.P.Changの組み替え論文で示した電子顕微鏡写真と形態がよく一致する。しかし本種の条線は光学顕微鏡下でも十分に解像可能であるのに対して、Hustedt (1957) の原図には条線が描かれておらず、Simonsen (1987) が示したタイプ写真でも、原記載と形態的に一致するものは条線がずっと細かいので、別種の可能性が高い（著作権の関係で原図とタイプ写真は非表示）。
- 現在、遺伝子分析に供するために単離培養に挑戦中だが、まだ成功していない。
- 2023年12月、本種は琵琶湖南湖の今津漁港でも多数出現した。この際、類似種の*Discostella lakuskarluiki* (Manguin ex Kociolek & Reviere) Potapova et al. も多く見られた。→下の写真
- こうしたナノプランクトン下限サイズの微細藻類が優占することはほとんど想定されていなかったようで、根来らが2023年11月の水処理生物学会大会で本種を紹介したところ、驚きの声が多数寄せられた。→検査の穴

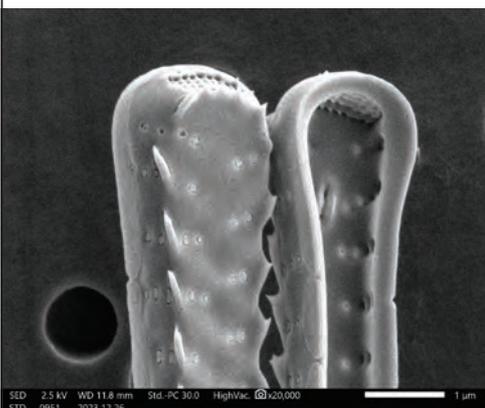


## 年度当初に研究を計画していた種の研究進展状況

### 4. *Fragilaria* sp.

- 本種は従来、オビケイソウ*Fragilaria crotonensis*と同定されてきた。しかし*F. crotonensis*が平面的な群体をつくるのに対して、本種はねじれた群体をつくることで容易に区別できる。
- 本種は*F. crotonensis*に比べて条線が粗い。また走査電子顕微鏡による観察の結果、殻面がほぼ90°ねじれているため、これが細胞同士の接合部をずらして群体をねじれさせていることが明らかになった。

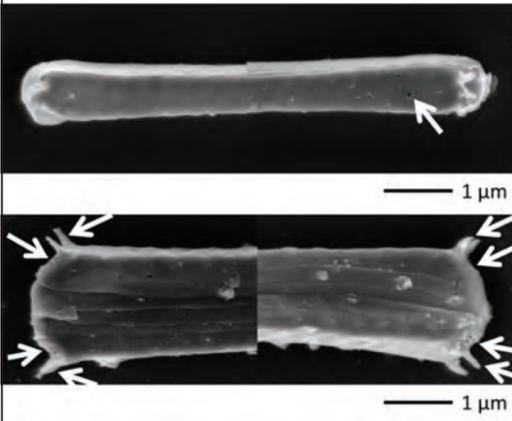
- 辻彰洋らの遺伝子 (*rBCL*) 解析により、本種は*Fragilaria crotonensis*とは遠縁で、*Fragilaria longifusiformis* ssp. *europusiformis*などと近縁の別種であることが明らかになった。
- 本種は2020年頃から琵琶湖であまり発生しなくなり、研究が滞っていた。しかし2014年2月下旬よりまとまった量の発生が見られたので、現在、再度の単離培養と詳細な形態観察を進めようとしている。



## 年度当初に研究を計画していた種の研究進展状況

### 5. *Fragilaria longifusiformis* ssp. *eufofusiformis*

- 本種は一見ハリケイソウ *Ulnaria* に似ているが、オビケイソウ *Fragilaria* の一種である。
- 2021-2022年冬には、琵琶湖南湖および西の湖で、ネットプランクトン中の第二優占種となった。このときの第一優占種は後述のハリケイソウ *Ulnaria japonica*。
- 本種は広島県のダム湖や霞ヶ浦などからも出現し、辻彰洋氏らが日本からの初報告を準備中だった。そこで琵琶湖からの出現報告を加えて、本種の日本からの初産出を論文報告した（辻ら 2022）。



- 本種は2024年1月から、再び琵琶湖南湖で増加した。しかしこの期間に浄水場でろ過閉塞障害が報告されていないため、どうやら類似種 *Ulnaria japonica* などと異なり、ろ過閉塞障害を引き起こすことはないようである。
- Van de Vijver et al. (2023) は、26<sup>th</sup> International Diatom Symposium の発表で、*Fragilaria* は大きく3つの属に分割されるべきであるとした。そして、そのどれにも該当しない種の例として本種（基本種 *F. longifusiformis*）を挙げた。したがって本種は近く、新設された別属に移される可能性がある。



## 年度当初に研究を計画していた種の研究進展状況

### 6. *Ulnaria japonica*

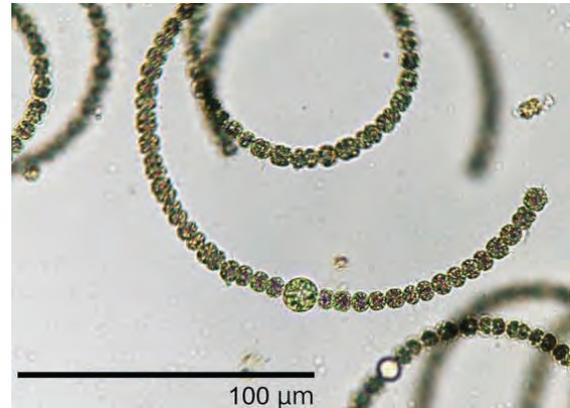
- 本種は *Synedra acus* と同定されてきたハリケイソウの一種である。浄水場で凝集沈殿処理障害を起こし、ろ過閉塞障害を引き起こすことで悪名高い。
- 2021年12月頃から本種と思われる珪藻が琵琶湖南湖で大発生し、淀川下流域まで流下して、琵琶湖および下流域を水源とする各地の浄水場でろ過閉塞障害を引き起こした。これは Tuji (2009) による本種の *Ulnaria* 属への組み替え論文が出版され、本種の存在が広く知られるようになって以降初めてのことであった。
- 一方、国立科学博物館の辻彰洋博士は北浦（茨城県）、鳴滝ダム（岡山県）などから本種とよく似た隠蔽種の存在を認め、大塚、根来らとともに新種記載論文を準備中である（まだネット上で公開できない）。
- この隠蔽種は、分子分類学的には *U. japonica* と明確な違いがあるものの、光学顕微鏡的特徴には僅かな違いしかない。現在、計量形態学的に区別する方法を検討中である。また SEM による観察に基づき、この隠蔽種と *U. japonica* との明確な形態の違いを明らかにしたので、これを上記の新種記載論文で公表する予定である（まだネット上で公開できない）。
- 今後、この隠蔽種が琵琶湖淀川水系でも出現していないかを調査し、浄水場における処理性を確認する必要がある。



## 新たに研究対象に加えた種の研究状況

### 1. *Dolichospermum minisporum* sensu Ohtsuka et al.

- 本種は2020年夏に琵琶湖南湖でブルームを形成し、*Dolichospermum minisporum* (M.Watanabe) Tuji & Niiyamaと同定された。
- 本種はgeosminを生成することが知られており、2020年夏の琵琶湖南湖におけるかび臭発生の原因となった（野口ら 2022）。
- 本種の琵琶湖からの出現は既に野口ら (2022)、大塚ら (2023)などにより報告されている。ただし大塚ら (2023) が示した顕微鏡写真は、未熟なアキネートを持つ他種を誤同定した可能性がある。
- ところが国立科学博物館の辻彰洋博士が琵琶湖産本種の遺伝子を分析したところ、*Dolichospermum*とは別属であることが示唆された。そのため琵琶湖に出現した本種がタイプ産地である千葉県印旛沼の*D. minisporum*と同種であるか否かを含め、形態および分子の両面からの分類学的再検討を始めている。



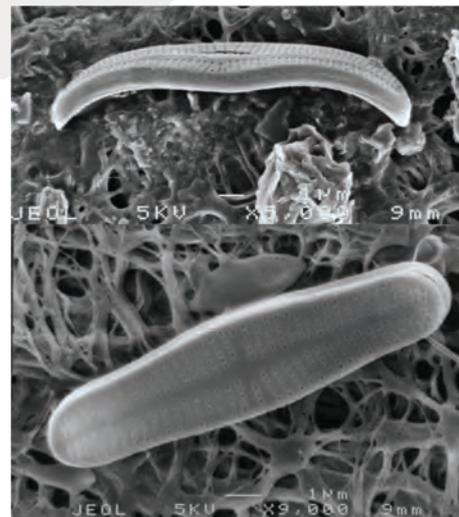
(一瀬諭氏撮影)

本種は2023年8～10月にも琵琶湖南湖で発生したが、風向きの関係か東岸ではたいへん少なく、追加の試料を得ることができず十分な検討ができなかった。

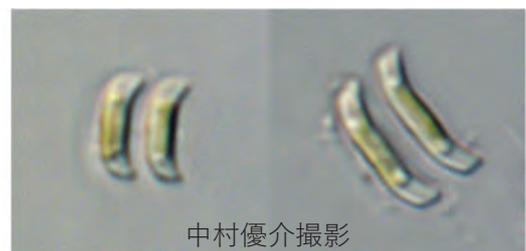
## 新たに研究対象に加えた種の研究状況

### 2. *Achnanthydium catenatum*

- 本種は*Achnanthydium* (ツメワカレケイソウ属) としては2種しか知られていない真性の浮遊性珪藻である。タイプ産地はボヘミア地方 (チェコスロバキア) のダム湖だが、原産地はアフリカだと考えられている。
- 外来種と考えられ、2021年頃から井の頭池 (東京都) と鳴滝ダム (岡山県) で出現するようになった。いずれも高密度で増殖することがあり、透明度の著しい低下を招いている。鳴滝ダムでは細胞密度が $4 \times 10^7$  cells/Lに達したことがあった。
- 日本に先立ち、中国でも2010年頃から見つかるようになった (馬ら, 2013)。
- 本種は2022年秋、琵琶湖博物館生態観察池の底泥上からも確認され、その後、水柱からもしばしば見いだされている。しかし生態観察池における本種の優占は起っていない。
- 大塚ら (2023) は本種の出現状況を日本珪藻学会第44回大会で報告し、論文執筆を準備中である。



琵琶湖博物館生態観察池 2023/1/17



中村優介撮影

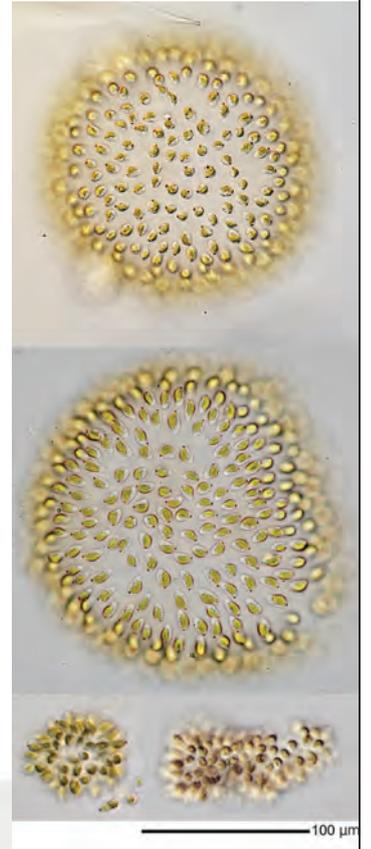
10 μm

同上 2023/4/10

## 新たに研究対象に加えた種の研究状況

### 3. *Uroglenopsis* sp.

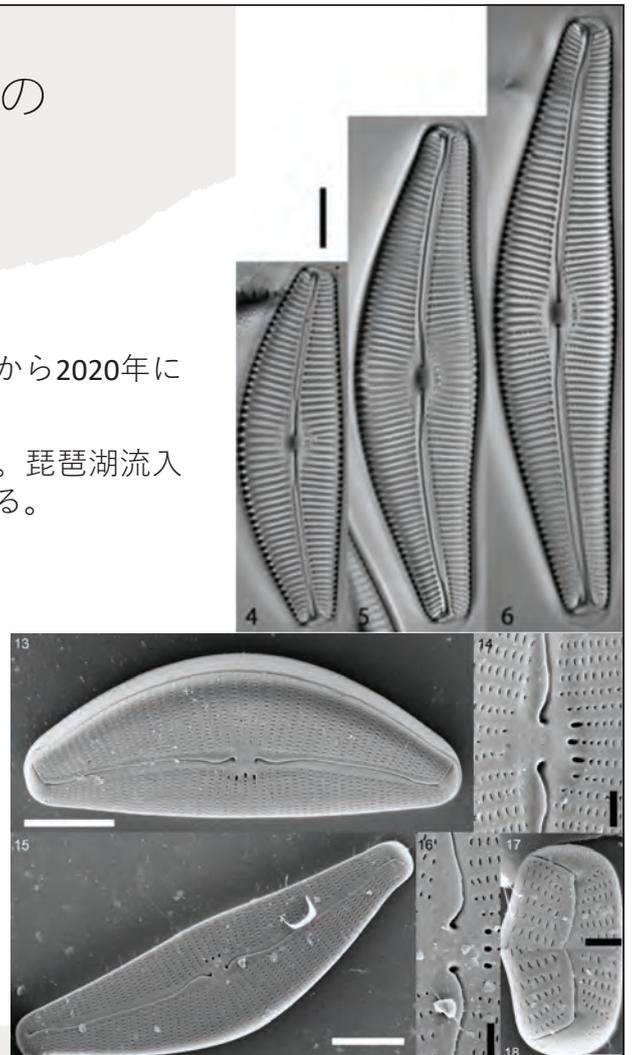
- 本種は1977年から琵琶湖で淡水赤潮を形成してきた種で、一般にはウログレナあるいはニセクスダマヒゲムシと呼ばれている。現在の分類基準では*Uroglenopsis americana* (G.N.Calkins) Lemmermannとされる。
- 2022年4月頃から、本種の小型で密な群体がしばしば見られるようになった。こうした小型群体では、細胞は極めて細長くなることもある。2種が混在していることが疑われたので琵琶湖の様々な時期、場所で採集した様々な形状の群体の遺伝子を分析したところ、全て同種で遺伝的な変異もほとんどないことが明らかになった。
- 一方で、琵琶湖産の本種は北米産の*U. americana*とは遺伝的にやや異なっており、むしろ欧州産の*Uroglenopsis botrys* (Pascher) Pascherに近縁であることが明らかになった（詳細はまだネット上で公開できない）。
- 現在、国立科学博物館の辻彰洋博士らと共に、上記成果の論文報告を準備している。また本種を新種記載すべきかどうかについても検討している。



## 新たに研究対象に加えた種の研究状況

### 4. *Cymbella compactiformis*

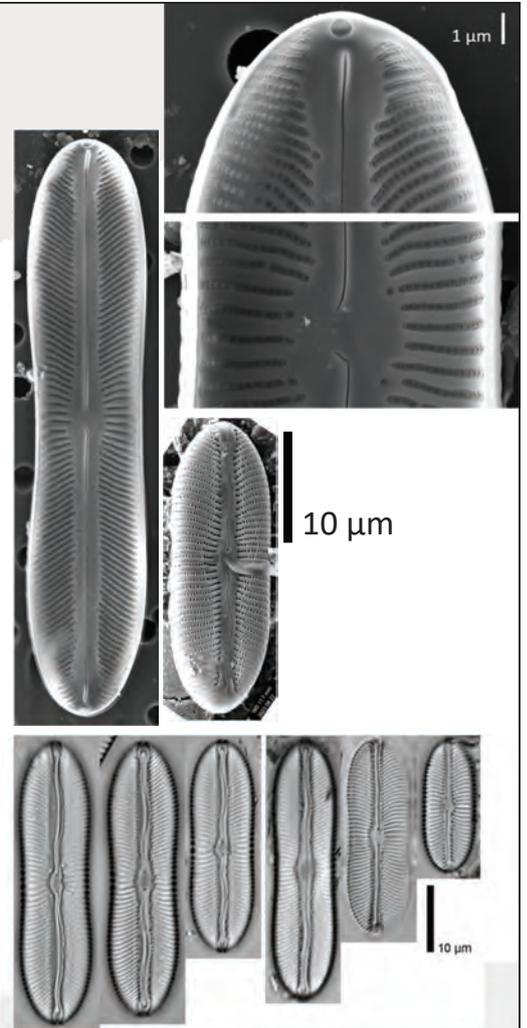
- 中型のクチビルケイソウで、中国の長江流域から2020年に新種記載された（Liu *et al.* 2020）。
- 日本では2020年頃から見られるようになった。琵琶湖流入河川では、天野川と犬上川から見つかっている。
- 今年度、懸案だった本種の日本からの出現報告を論文として出版した（泉野ら, 2023）。
- 本種のブルームは今のところ報告されていない。しかし近年、北米産*Cymbella janischii*、在来種*Cymbella subturgidula*、*Cymbella tumida*などクチビルケイソウのブルームが多発するようになり、漁業被害の事例（放流アユが居着かなくなる、漁網に大量に付着して漁の妨げとなる）もあることから、本種についても一応の警戒が必要である。



# 新たに研究対象に加えた種の研究状況

## 5. *Sellaphora constrictum*

- 本種は琵琶湖流入河川である犬上川で2021年に得られた試料中に僅かに含まれていた。
- 同種と思われるものが、2015年から矢作川（愛知県）でも発見されていた（内田・洲澤, 2018）。
- 2023年夏から、本種が堅田内湖で急増し、一時期、ヨシ付着珪藻の優占種になることがあった。九州の河川では砂泥上で優占した事例もあるという。
- 私たちは当初、本種を中国南部から2022年に報告された *Sellaphora tanghongquii* Ni et al. と同定していた。
- ところが様々な方法で処理された日本産標本を観察した結果、2018年に報告されていた本種と *S. tanghongquii* との違いが、単に殻の保存状態あるいはクリーニング方法の違いによるものであることが判明した。
- そこで現在、本種の日本からの報告論文を、日本各地で本種を見つけて大塚に相談してきた人たちとともに準備中である。



## 研究成果の統合と発信1 要注意! 琵琶湖とその集水域の「ミクロの外来生物」

- 2023年2月「地域自然史と保全 研究発表会」のシンポジウム「『視えない』外来種問題」で発表した内容を増補して、「地域自然史と保全」特集記事として刊行。
- 微細藻類の外来種が実際に存在すること、近年になって新たな外来種の発見が増加していることを示した。
- また近年になって見つかった、琵琶湖で外来種の可能性がある微細藻類の例として、*Cymbella janischii*、*Microseira wollei*、*Dolichospermum minisporum*、*Planktothrix pseudagardhii*、*Raphidiopsis raciborskii*の5種を紹介した。

地域自然史と保全 45 (2) : 25 - 38, 2023

特集: 『視えない』外来種問題

### 要注意! 琵琶湖とその集水域の「ミクロの外来生物」

滋賀県立琵琶湖博物館	大塚 泰介
滋賀県立琵琶湖博物館	根 未 健
福井県立大学海洋生物資源学部	佐 藤 晋 也
琵琶湖環境科学研究センター総合情報部門	石 川 可 奈 子
国立科学博物館植物研究部	辻 彰 洋

Caution! Alien microalgae in Lake Biwa and its catchment area. Taisuke Ohtsuka\* (Lake Biwa Museum), Takeshi Negoro (Lake Biwa Museum), Shinya Sato (Faculty of Marine Science and Technology, Fukui Prefectural University), Kanako Ishikawa (System Analysis Division, Lake Biwa Environmental Research Institute) and Akihiro Tuji (Department of Botany, National Museum of Nature and Science)

\*Corresponding author

In recent years, new microalgae have been discovered one after another in the Lake Biwa Basin, some of which have proliferated to form blooms. Among them, we present five species of alien microalgae (including possible ones) recently discovered in the Lake Biwa Basin that are forming or may soon form HABs (Harmful Algal Blooms). *Cymbella janischii* is an invasive diatom native to North America. In 2022, its invasion was confirmed in the Aho River for the first time in the Kinki region. Blooms of this species cover riverbeds as thick viscous colonies and adversely affect the growth of sweetfish, *Plecoglossus altivelis*. A benthic cyanobacterium *Microseira wollei* was discovered in the South Basin of Lake Biwa in 2012. Initially, it was thought to be an alien species native to North America, but genetic analyses revealed that it is genetically different from the North American population at the level of a separate species. It covered the bottom of the lake as thick mats and adversely affected the growth of bivalves and aquatic earthworms. In the Lake Biwa Basin, blooms due to new cyanobacteria were observed for three consecutive years from 2020. *Dolichospermum minisporum* which bloomed in the South Basin of Lake Biwa in September 2020 was found to produce geosmin, a musty odor substance. "*Planktothrix pseudagardhii*" bloomed in Lake Nishino in October 2021; it was the first discovery of this species from Japan. In 2022, *Raphidiopsis raciborskii*, which has been considered tropical, bloomed at a pond of Lake Biwa Museum from October to December when the water temperature dropped. One of the reasons why cyanobacterial blooms continue to occur in Lake Biwa despite improved water quality may be the continuous emergence and bloom formation of new species of cyanobacteria.

**Keywords:** Bas Becking's hypothesis, endemism of microorganisms, Ken-ichiro Negoro, phosphorus in the sediment, The Lake Biwa Ordinance

要旨: 琵琶湖およびその集水域では近年、新種の微細藻類が次々と発見され、その一部は大繁殖してブルームを形成している。その中には外来種かその可能性がある種が多く含まれている。本報ではこうした新種の微細藻類のうち、HABs (Harmful Algal Blooms; 有害藻類ブルーム) を形成したか、近い将来にその可能性がある5種を紹介する。ミヅウタクチルケイソウ *Cymbella janischii* は北米原産の外来種である。2022年に近畿圏で初めて、安曇川への侵入が確認された。本種が大繁殖すると河床を厚い粘質膠体として覆い、アヒの生育などに悪影響を及ぼす。底生シ

関西自然保護機構 第700号  
\*e-mail: ohtsuka-taisuke@biwamuseum.jp



# 今後の課題

- これまで見られなかった微細藻類が、突如として優占種あるいは準優占種として出現する事例が多発しているため、可及的速やかに同定して情報収集・情報提供していく必要がある。
  - *Fragilaria longifisiformis* ssp. *europusiformis*、*Raphidiopsis raciborskii*など
- 以前から数多く出現していたにもかかわらず、他種と混同されたりして認識されてこなかった種もある。生物多様性の評価と、浄水場などへの影響の両面から研究される必要がある。
  - *Discostella* sp., *Fragilaria* sp. の記載を急ぐ必要
- さらに分子分類や形態の精査などにより、従来の同定の誤りが発覚することもある。
  - *Uroglenopsis* sp.、*Dolichospermum minisporum* sensu Ohtsuka et al. など
- こうした研究成果は、講演会などにより水道・水産関係者に共有される必要があるが、それだけでなく電子図鑑などで誰でも容易にアクセスできる情報として整理される必要がある。
  - 新産種が次々と現れ、また研究が進むにつれて分類学的な不明点がどんどん明らかになるために、琵琶湖博物館で準備中の電子図鑑「琵琶湖のプランクトン」の公開準備はなかなか進まない。

## それでも . . .

この分野の他地域の研究者・技術者によれば、琵琶湖は恵まれているらしい。

- 過去の研究とモニタリングの蓄積がある。
  - ◆これがなければ、外来種の存在など誰も気づかない
- 注目して研究している人たちが今なお多い。
  - ◆地元大学・行政機関の研究者・学生たち
  - ◆ハイアマチュア（琵琶湖博物館はしかけなど）
  - ◆他地域に転出してでも研究を続け協力してくれる「琵琶湖育ち」の研究者たち

若手研究者・技術者諸君！

私たちが高齢化、後継者不足に悩む今だからこそ、この分野に本格的に参入してみませんか？

琵琶湖で今、研究を始めれば、巨人の肩に立って研究の王道を進み、きっと次世代の第一人者になれますよ!!

# 本研究と関連した成果公表（2023年度分）

## 学会発表など

大塚泰介・根来 健・井上晴絵・小倉謙一・草間雄大・辻 彰洋. 日本からの*Achnantheidium catenatum*の出現報告. 日本珪藻学会第44回大会、2023年5月13日、文教大学あだちキャンパス.

Ohtsuka T, Negoro T, Izumino H, Sato S, Tuji A. Diatoms presumed to have recently invaded Lake Biwa Basin in Central Japan. The 26<sup>th</sup> International Diatom Symposium, Aug. 29<sup>th</sup>, 2023, Yamagata Terra.

Ohtsuka T, Negoro T, Tuji A, Niiyama Y, Ishikawa, K, Ichise S. Cyanobacterial water blooms in Lake Biwa - revisiting 40 years of history. 20th International Conference on Harmful Algae, Nov. 6<sup>th</sup>, 2023. Grand Prince Hotel Hiroshima.

Tuji A, Niiyama Y, Ohtsuka T, Nakagawa M, Ichise S. Taxonomy and phylogeny of geosmin-producing *Dolichospermum* species. 20th International Conference on Harmful Algae, Nov. 10<sup>th</sup>, 2023. Grand Prince Hotel Hiroshima.

根来 健・大塚泰介・辻 彰洋. 琵琶湖南湖で多産する円盤型珪藻. 日本水処理生物学会第59回大会、2023年11月18日、山形大学鶴岡キャンパス.

## 論文

大塚泰介・鈴木隆仁・辻 彰洋 (2023) 琵琶湖辺の池におけるラン藻*Raphidiopsis raciborskii*のブルーム形成. 日本水処理生物学会誌 59: 27-32.

泉野央樹・洲澤多美枝・大塚泰介 (2023) 西日本3 河川からの *Cymbella compactiformis* の出現. *Diatom* 39: 47-53.

## その他

大塚泰介・根来 健・佐藤晋也・石川可奈子・辻 彰洋 (2023) 要注意！琵琶湖とその集水域の「ミクロの外来生物」. 地域自然史と保全 45: 25-38.

前塩素処理・粉末活性炭処理を用いた超親水性溶存有機物の制御

京都大学大学院 地球環境学堂  
多田 悠人 助教

琵琶湖・淀川水質保全機構  
令和5年度 水質保全研究助成 成果報告会

# 前塩素処理・粉末活性炭処理を用いた 超親水性溶存有機物の制御

京都大学大学院地球環境学堂 多田悠人、越後信哉

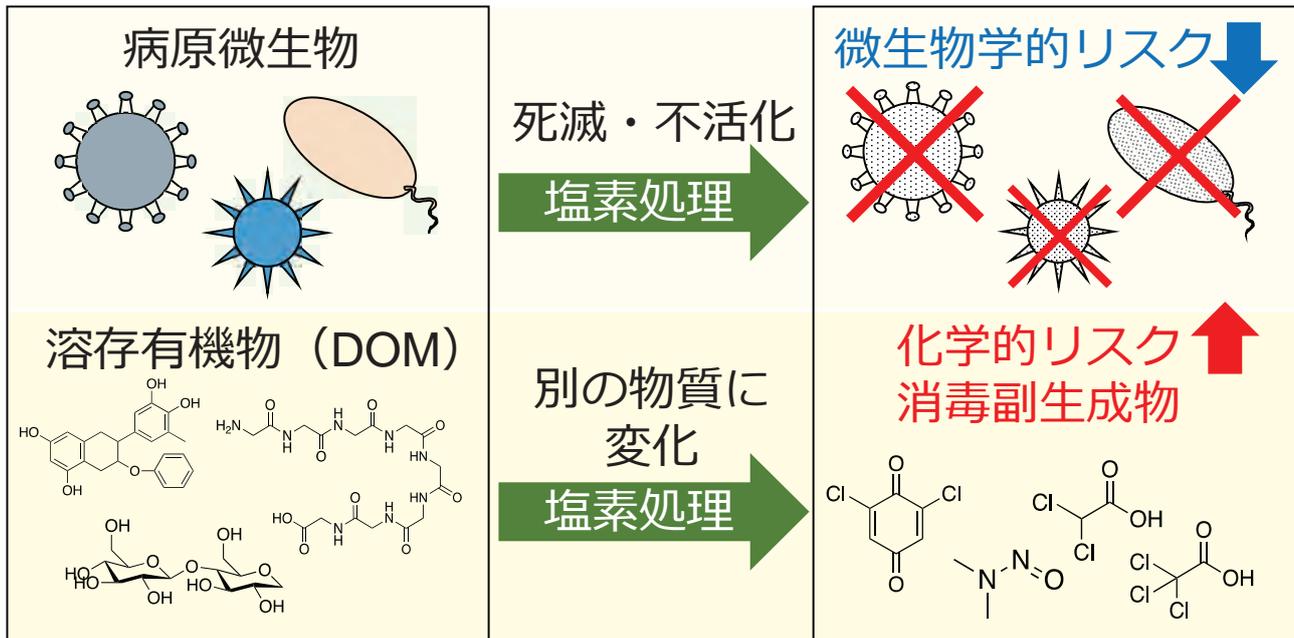
1

## 背景

超親水性DOMとは？

超親水性ハロ酢酸前駆物質を生成するラフィド藻

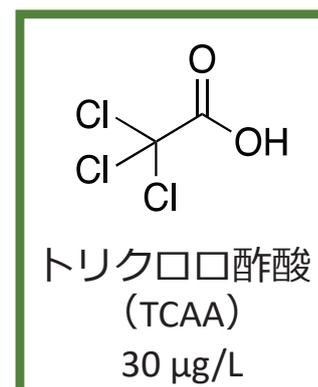
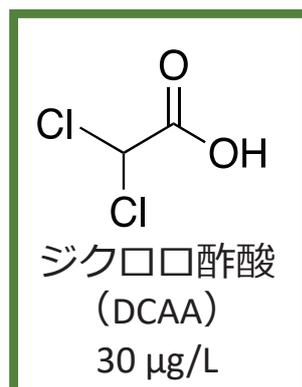
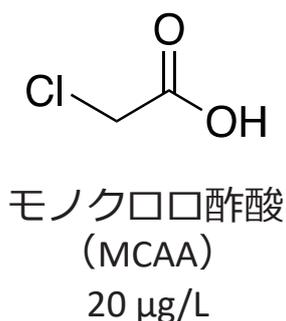
# 水道水中の消毒副生成物



何を, どこまで, どうやって制御するのか

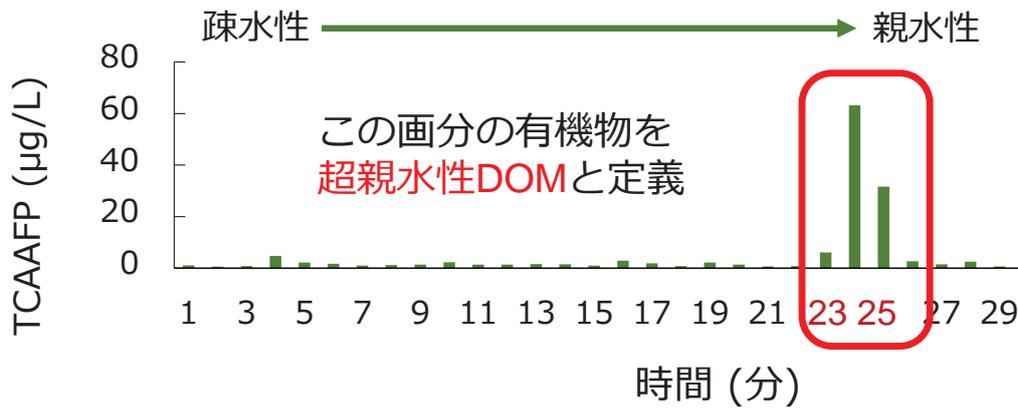
## ハロ酢酸 (Haloacetic acids; HAAs)

- 代表的な消毒副生成物の一種 (発がん性リスク)
- 塩素化体 (3種類) が基準項目、臭素化体 (6種類) が要検討項目に指定されている
- 2015年, ジクロロ酢酸 (DCAA) とトリクロロ酢酸 (TCAA) の基準値が強化 → **基準値超過**が懸念
- ブロモクロロ酢酸、ブロモジクロロ酢酸の目標値案 (10 µg/L) が示された



# 超親水性DOM

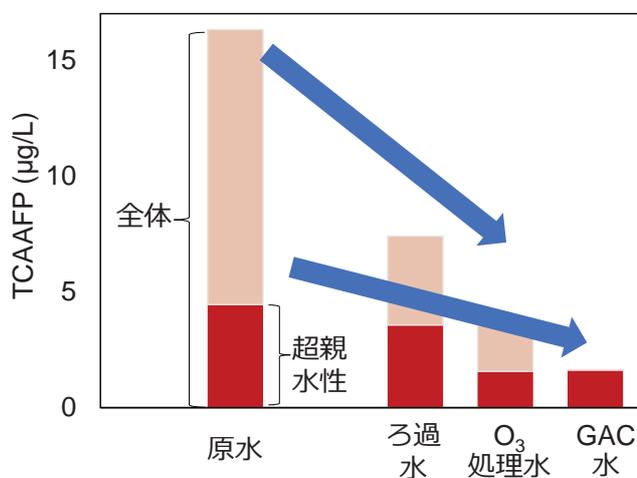
- 評価手法：高速クロマトグラフィー（HPLC）
- 親水性相互作用液体クロマトグラフィー（HILIC）による分離
- 疎水性物質は保持されず親水性物質に対して良好な保持
- 23分以降の非常に親水性が高い画分で極めて高いTCAAFP<sup>1)</sup>



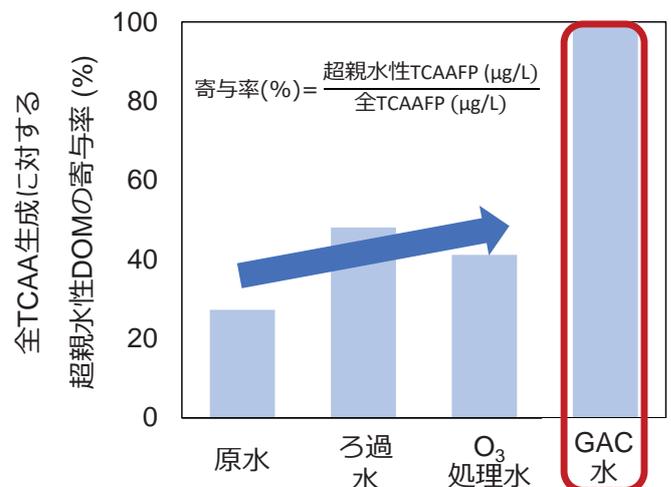
1) 奥田恵理香：京都大学大学院工学研究科修士論文，2019

# 超親水性DOMとHAAFPの浄水処理過程での挙動<sup>2)</sup>

- 対象浄水場：琵琶湖淀川水系内のA浄水場
- TCAAFP



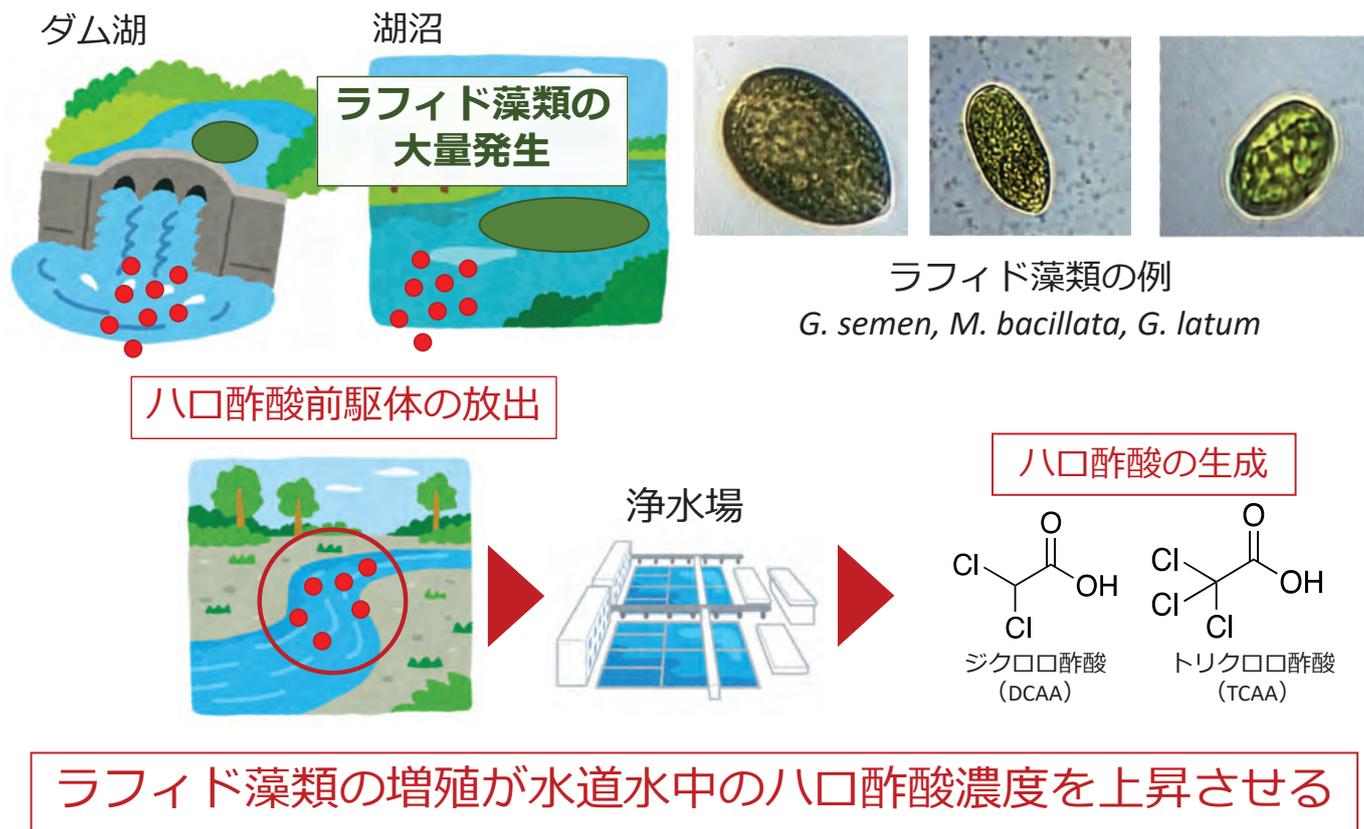
- 超親水性DOMの寄与率



総DOMと比べて超親水性DOMは除去されにくく、  
管理が重要

2) 越後信哉，令和3年度 水質保全研究助成

# ラフィド藻類とは



## ラフィド藻と超親水性HAA前駆物質

7

- ラフィド藻増殖時に水道水中のHAA濃度が増加<sup>3)</sup>
  - HAA前駆物質は、
    - 超親水性DOM<sup>4)</sup>
    - 酸性の高分子<sup>4)</sup>
    - 10 kDa 程度の高分子<sup>4)</sup>
    - 候補物質として糖鎖+多数のフェノール物質が挙げられる<sup>4)</sup>
- 通常の急速濾過プロセスでは処理が困難

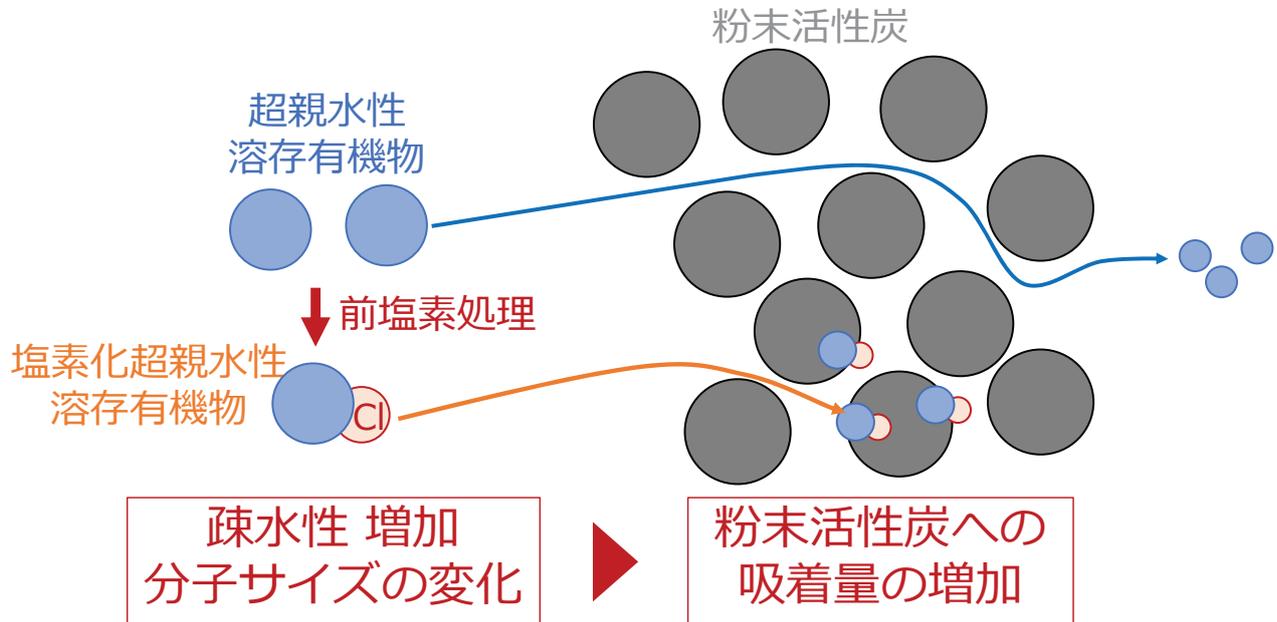
しかし、その処理方法は確立されていない

3) 横井ら,平成30年度全国会議(水道研究発表会),2018.

4) Tada et al, *Science of the Total Environment* 879 (2023): 163000.

## 前塩素素 + 粉末活性炭処理

- 塩素処理によって処理性が増した事例あり<sup>5)</sup>
- プロセスの追加が容易い（大規模処理設備が不要）
- 考えられるメカニズム:



5) Jiang, Jingyi, et al. Environmental science & technology 51.6 (2017): 3435-3444.

## 研究目的

**重要なHAA前駆体である超親水性DOMの  
前塩素処理・粉末活性炭処理による  
処理性の評価と処理手法の提案**

- **前塩素処理 + 粉末活性炭処理**
- 粉末活性炭処理
- 凝集沈澱処理
- オゾン処理
- 上記処理の組み合わせ

# 実験方法

## 対象試料

出典) 琵琶湖開発総合開発所HP

- 超親水性DOM
  - ① 琵琶湖水南湖 (琵琶湖水)
  - ② 桂川下水放流口直下 (桂川水)
  - ③ 淀川枚方大橋 (淀川水)
- ラフィド藻由来HAA前駆物質
  - *Gonyostomum semen* (実験室内で培養)
  - *Merotrichia* sp. (室生ダム④由来)



採水場所

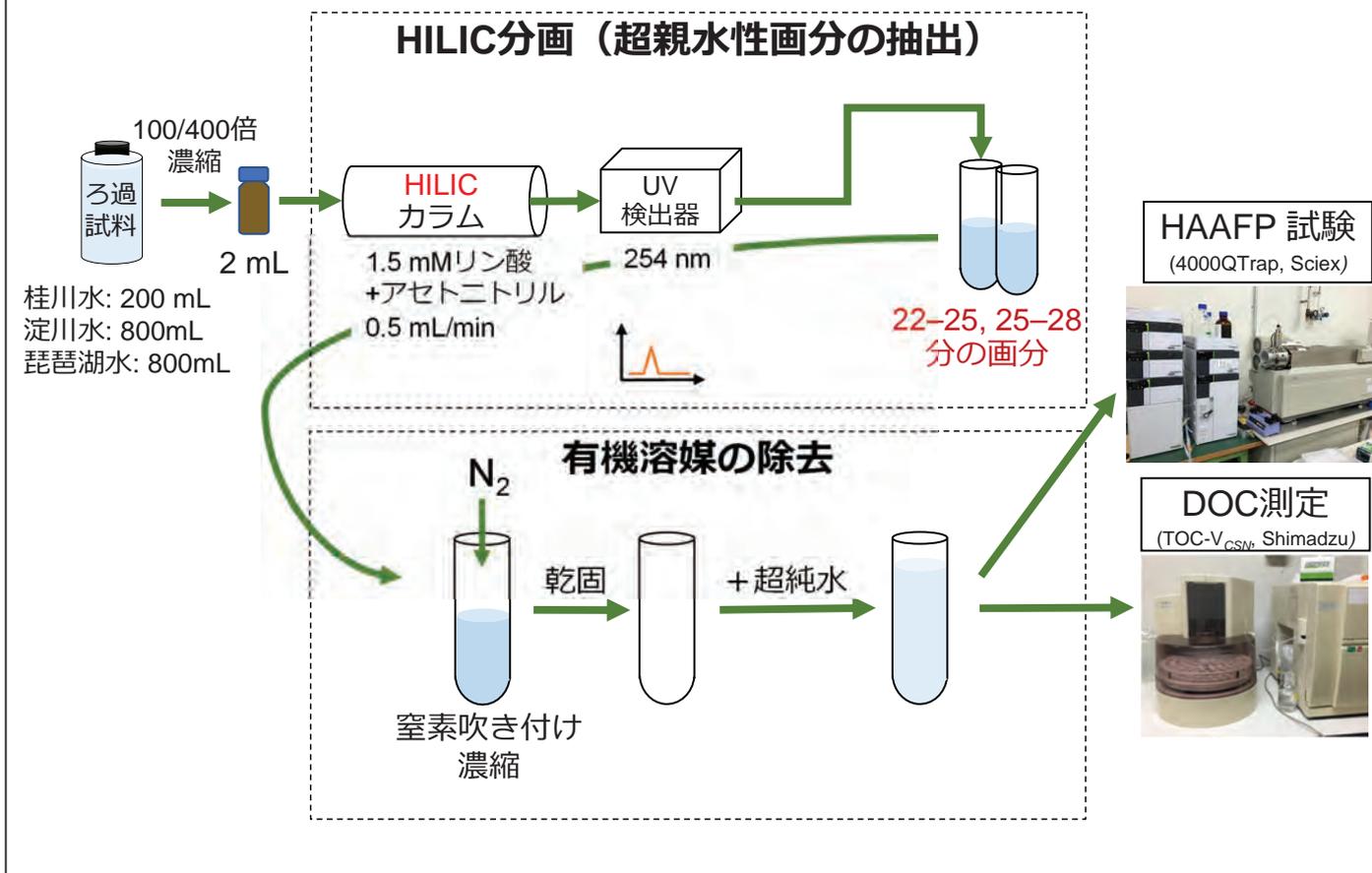


培養の様子

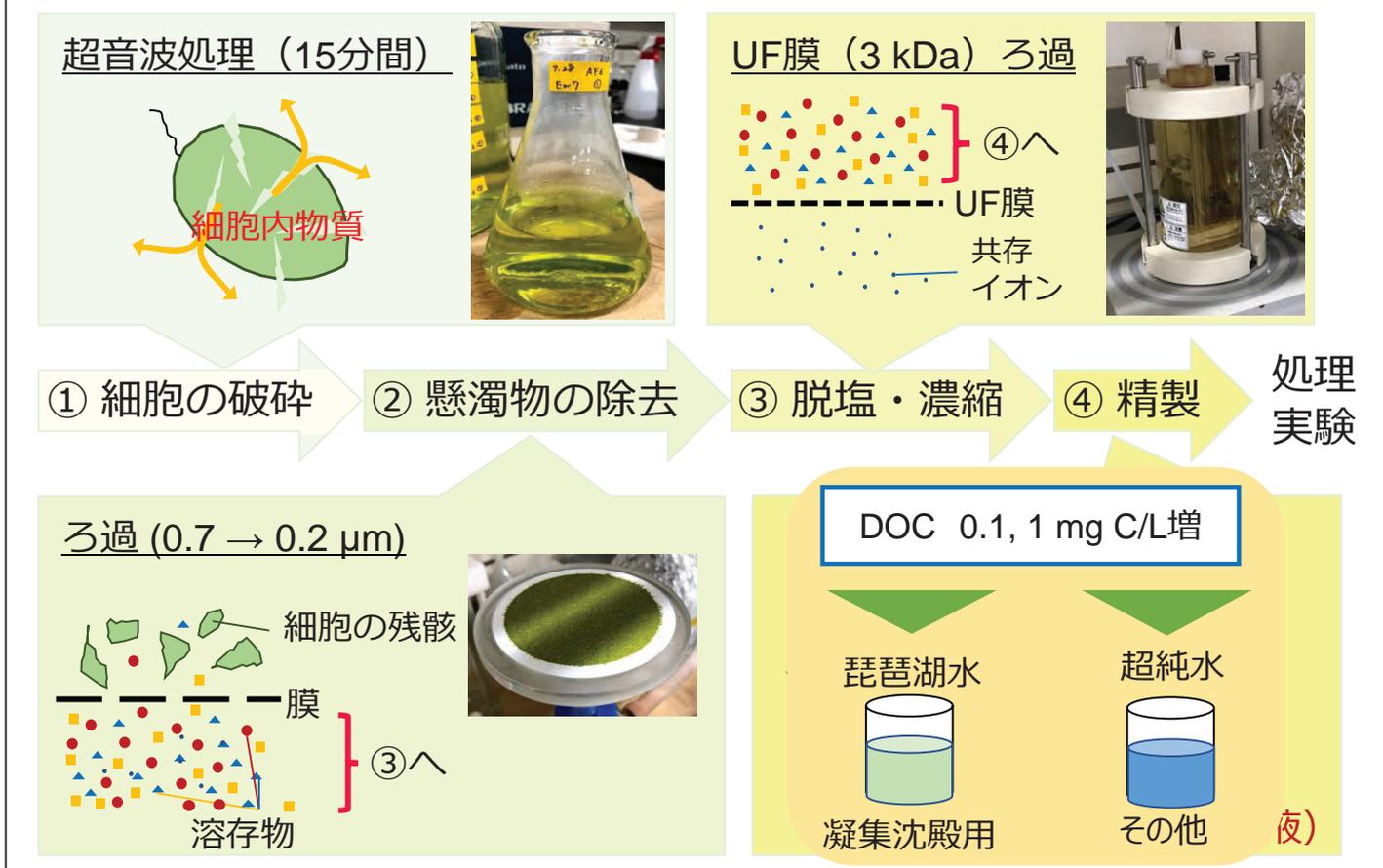


増殖したラフィド藻 (室生ダム)

# 超親水性画分の抽出



# ラフィド藻培養液からのHAA前駆物質の抽出

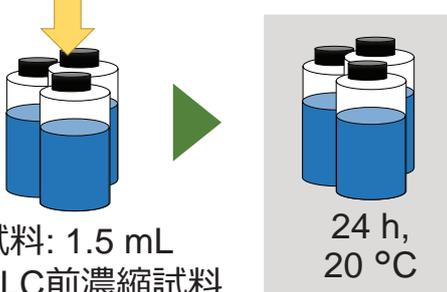


# HAAFP 試験

PBS: 5 mM (pH=7)

塩素添加量:

DOCの10倍 (mgCl<sub>2</sub>/L, 過剰量)

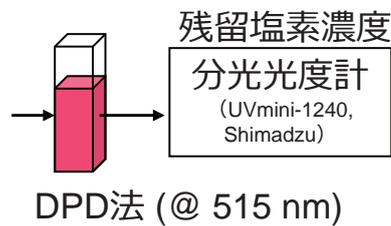
- 
- 試料: 1.5 mL
- HPLC前濃縮試料
  - 超親水性画分

24 h,  
20 °C

NH<sub>4</sub>Cl: 50 mg/L

HAAs 濃度

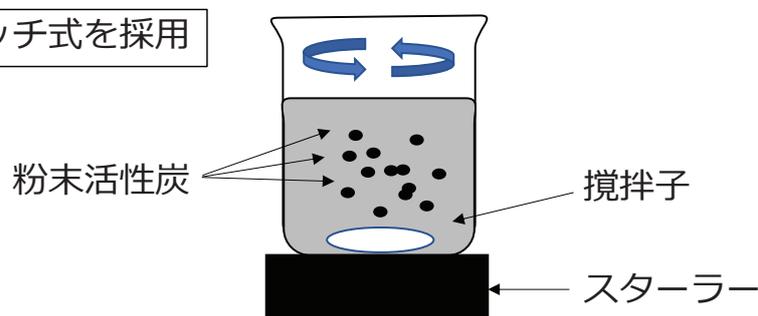
LC-MS/MS



# 粉末活性炭処理方法

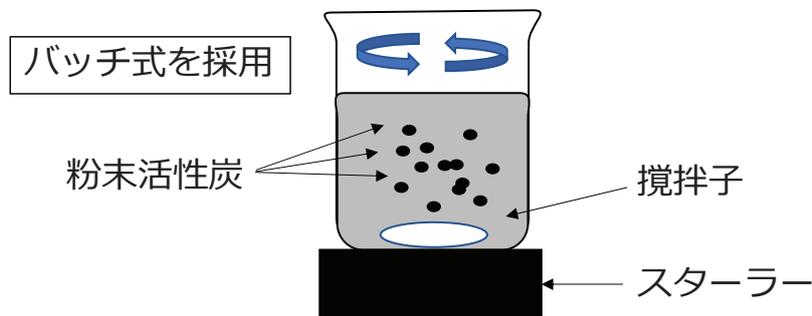
- 粉末活性炭
  - エバダイヤ 5 LPD (一般的に用いられる)
  - Norit SA Super (メソ孔が多い)
- 処理条件
  - pH : 7.0 (0.2 mM PBS)
  - 接触時間 : 1 h
  - 添加量 : 11, 74 mg/mg C (琵琶湖・淀川水系環境水)
  - : 5, 10, 15, 30, 100 mg/L (ラフィド藻)

バッチ式を採用



## 前塩素 + 粉末活性炭処理方法

- 粉末活性炭
  - エバダイヤ 5 LPD (一般的に用いられる)
  - Norit SA Super (メソ孔が多い)
- 処理条件
  - 前塩素処理時間 : 1h
  - 前塩素注入率 : 0.5, 1.0, 2.0 mg/L
  - 粉炭条件は同様



## 凝集・沈殿処理方法

- 凝集剤 : ポリ塩化アルミニウム (PAC)
- 添加量 : 3.0 – 45  $\text{Al}_2\text{O}_3$  mg/L
- 測定項目 : 処理前後のHAAFP, pH, 濁度

急速攪拌  
5 min/150 rpm



緩速攪拌  
30 min/40 rpm



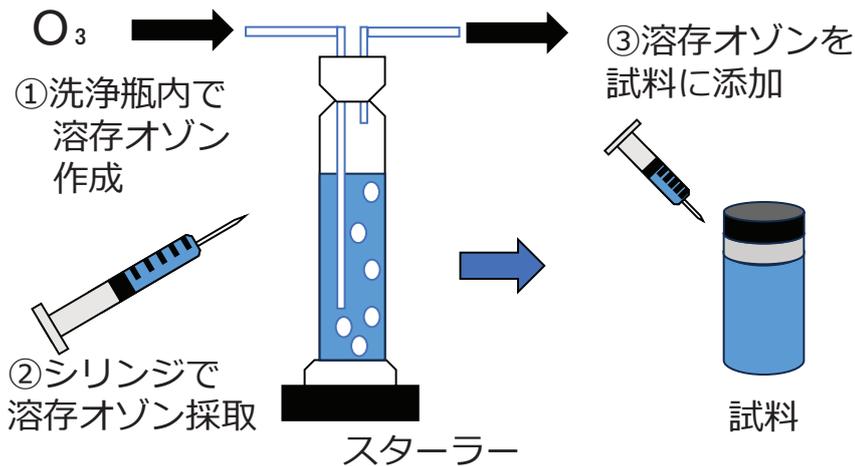
静置  
30 min



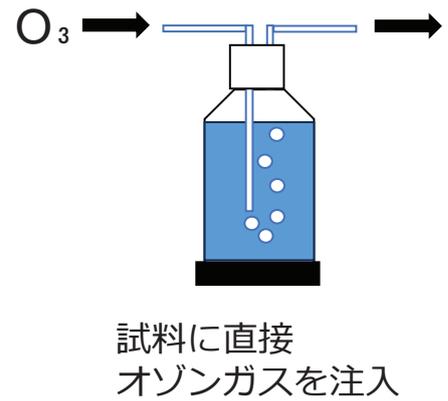
# オゾン処理方法

- pH : 7 (5 mM PBS)
- 注入率 : 0.5, 1.0, 2.0 mg/mg C

注入率が低い場合

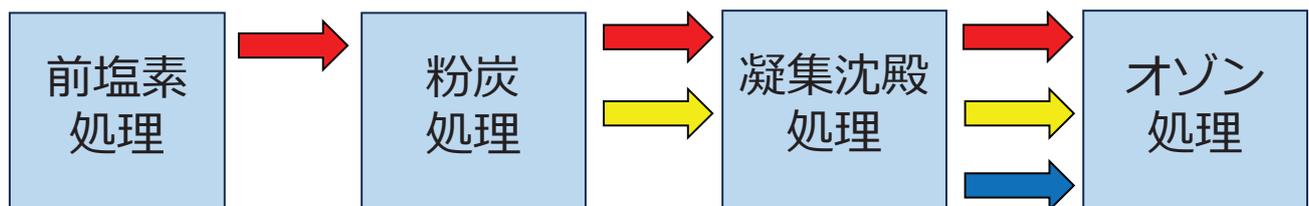


注入率が高い場合



# 連続処理

- パターン1 →
- パターン2 →
- パターン3 →

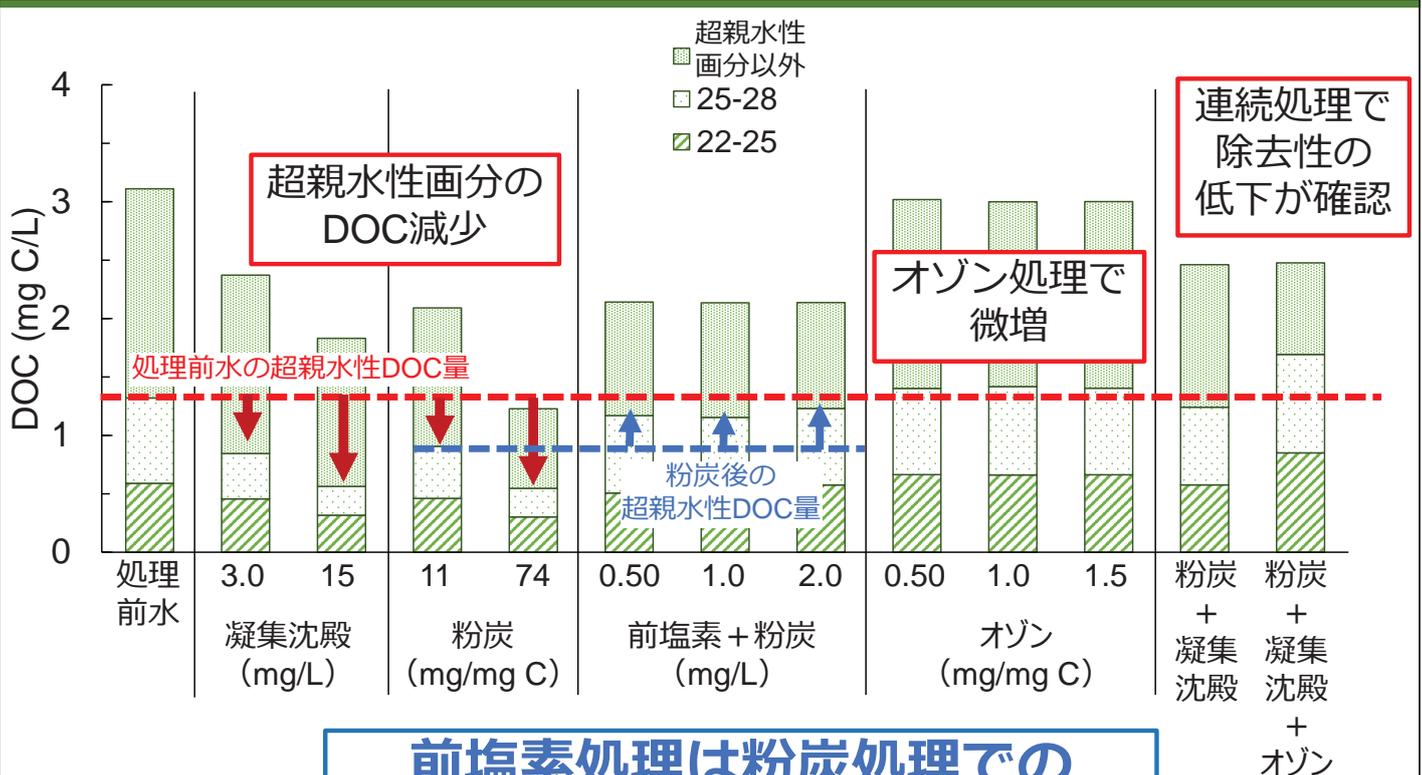


# 実験結果と考察

超親水性DOMの処理性について

## 処理前後のDOC

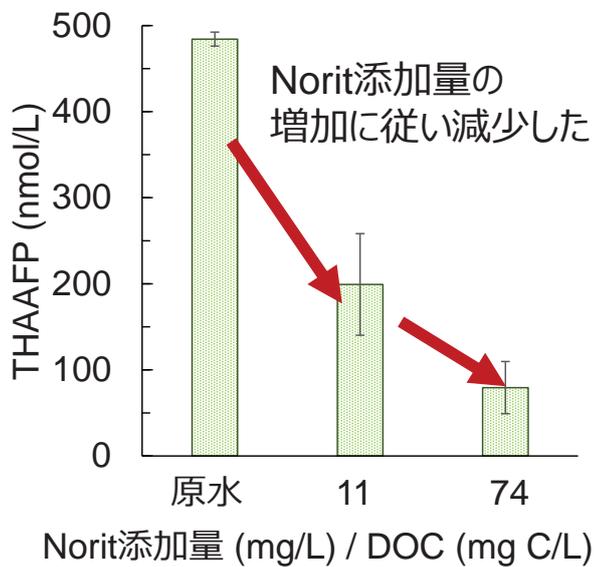
※桂川水の結果のみを示す。  
淀川水、琵琶湖水は同じ傾向を示した。



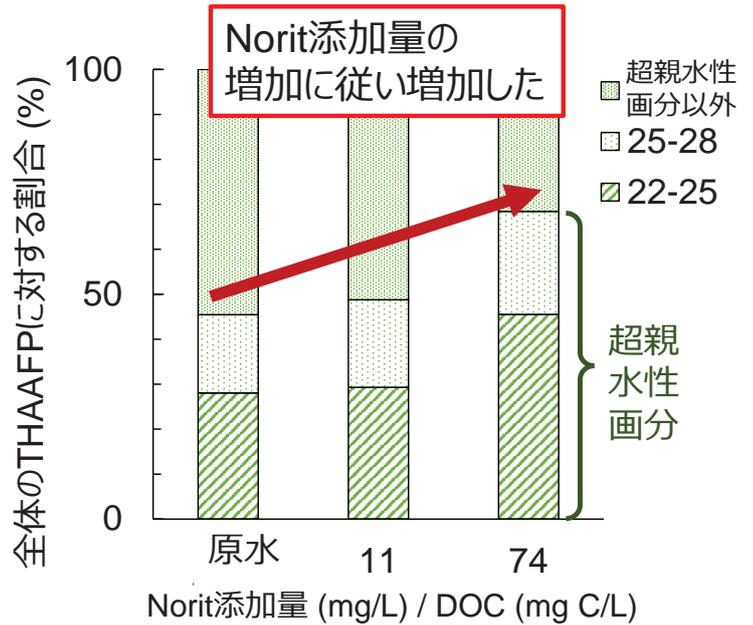
前塩素処理は粉炭処理での処理性を低下させた

## 粉末活性炭処理 (Norit)

## ● 全体のTHAAFP



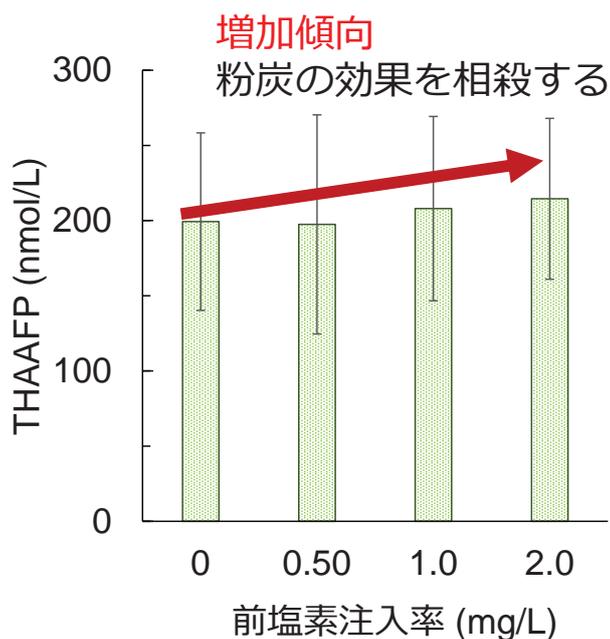
## ● 寄与率



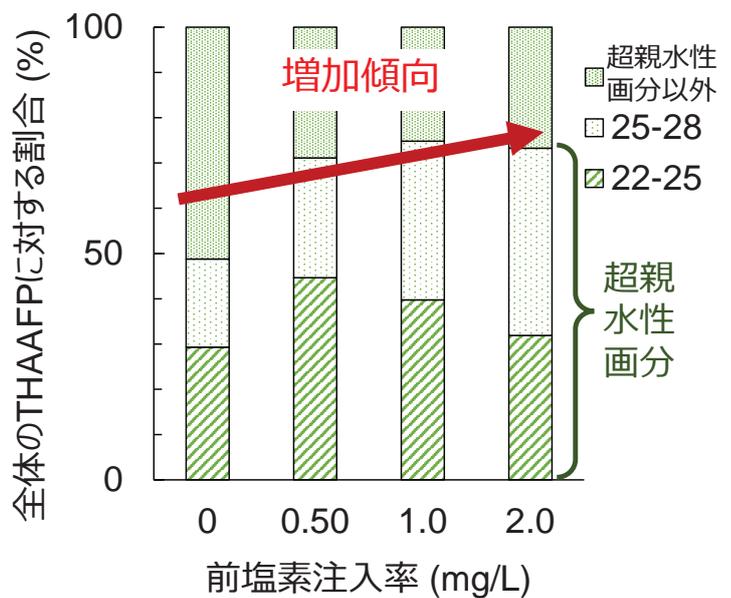
- 粉炭処理は超親水性HAA前駆体の除去に有効
- 総DOMの処理性に比べると低い

## 前塩素 + 粉末活性炭処理

## ● 全体のTHAAFP



## ● 寄与率

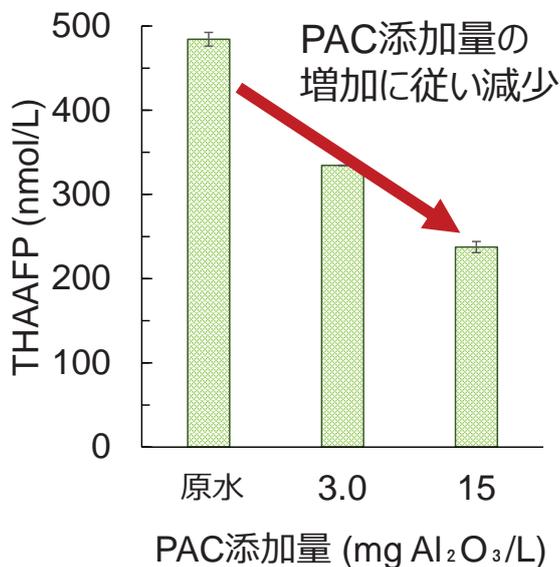


前塩素処理は超親水性HAA前駆体の除去に不適

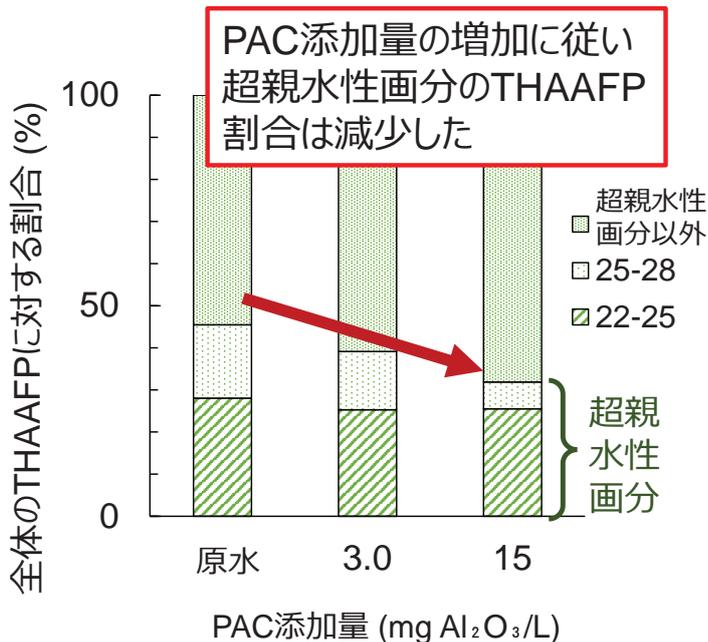
# 凝集・沈殿処理

※DHAAFPはTHAAFPと同じ傾向を、淀川水、琵琶湖水は桂川水と同じ傾向を示した。

## ● 全体のTHAAFP (臭素化・塩素化体の合計値)



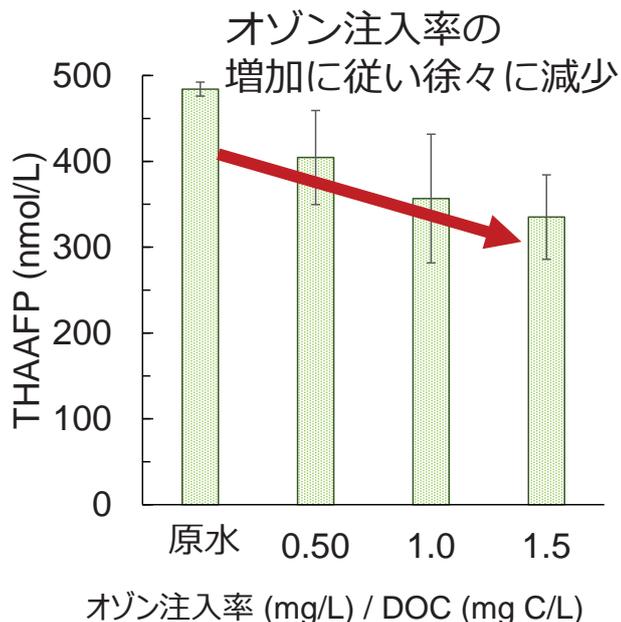
## ● 寄与率



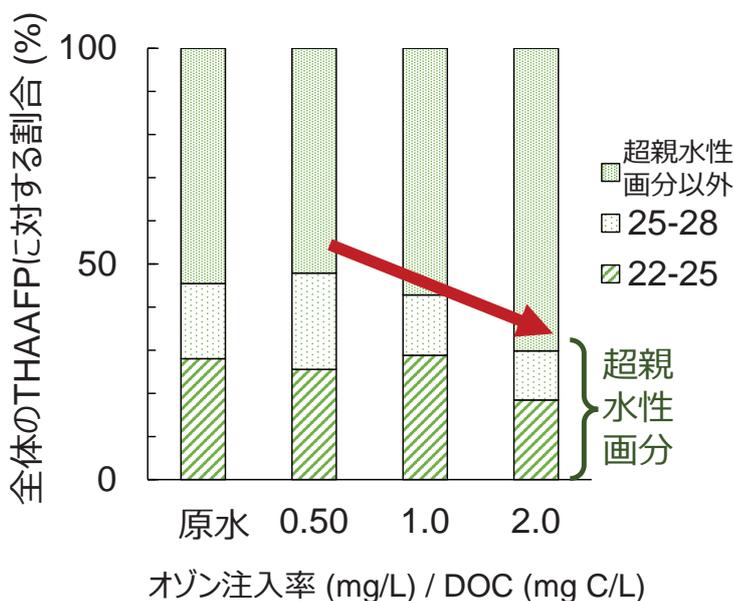
凝集・沈殿処理は超親水性HAA前駆体の除去に効果的

# オゾン処理

## ● 全体のTHAAFP



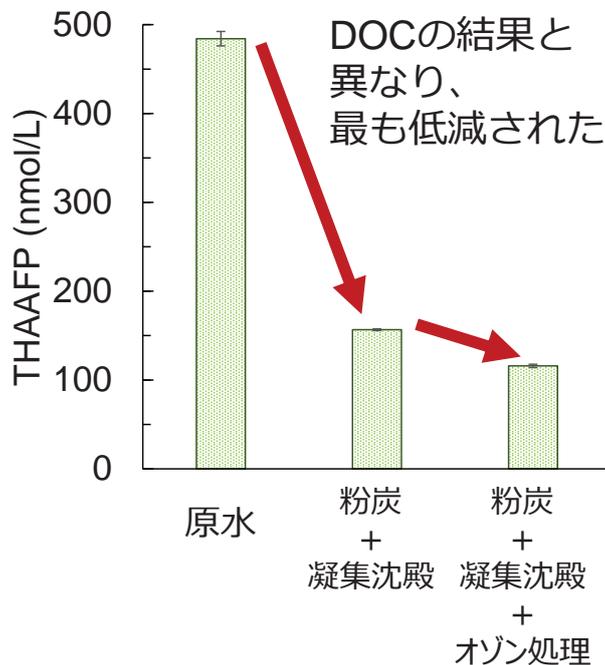
## ● 寄与率



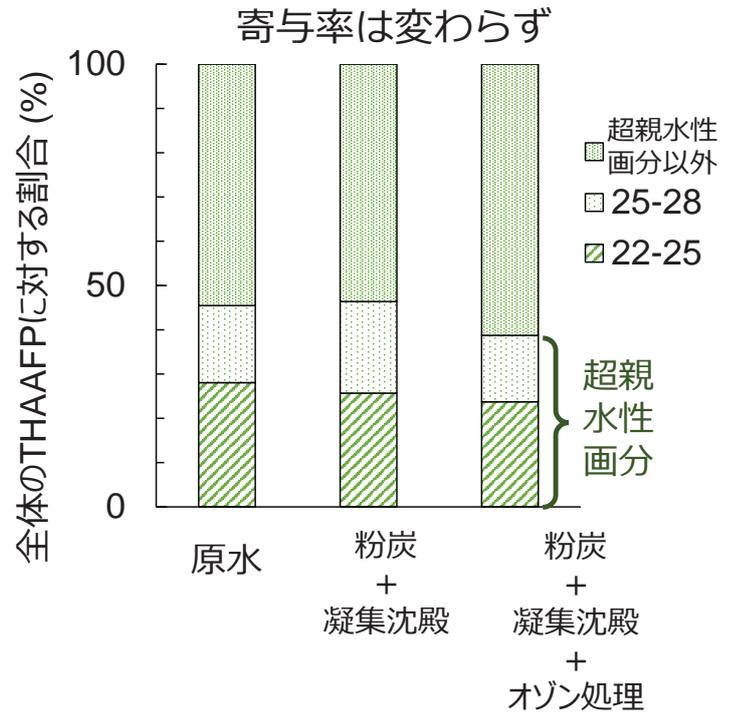
THAAの前駆体は芳香族性を持つ可能性が高く、オゾンで分解した可能性

## 連続処理

## ● 全体のTHAAFP



## ● 寄与率



連続処理がハロ酢酸の生成抑制に最も効果的

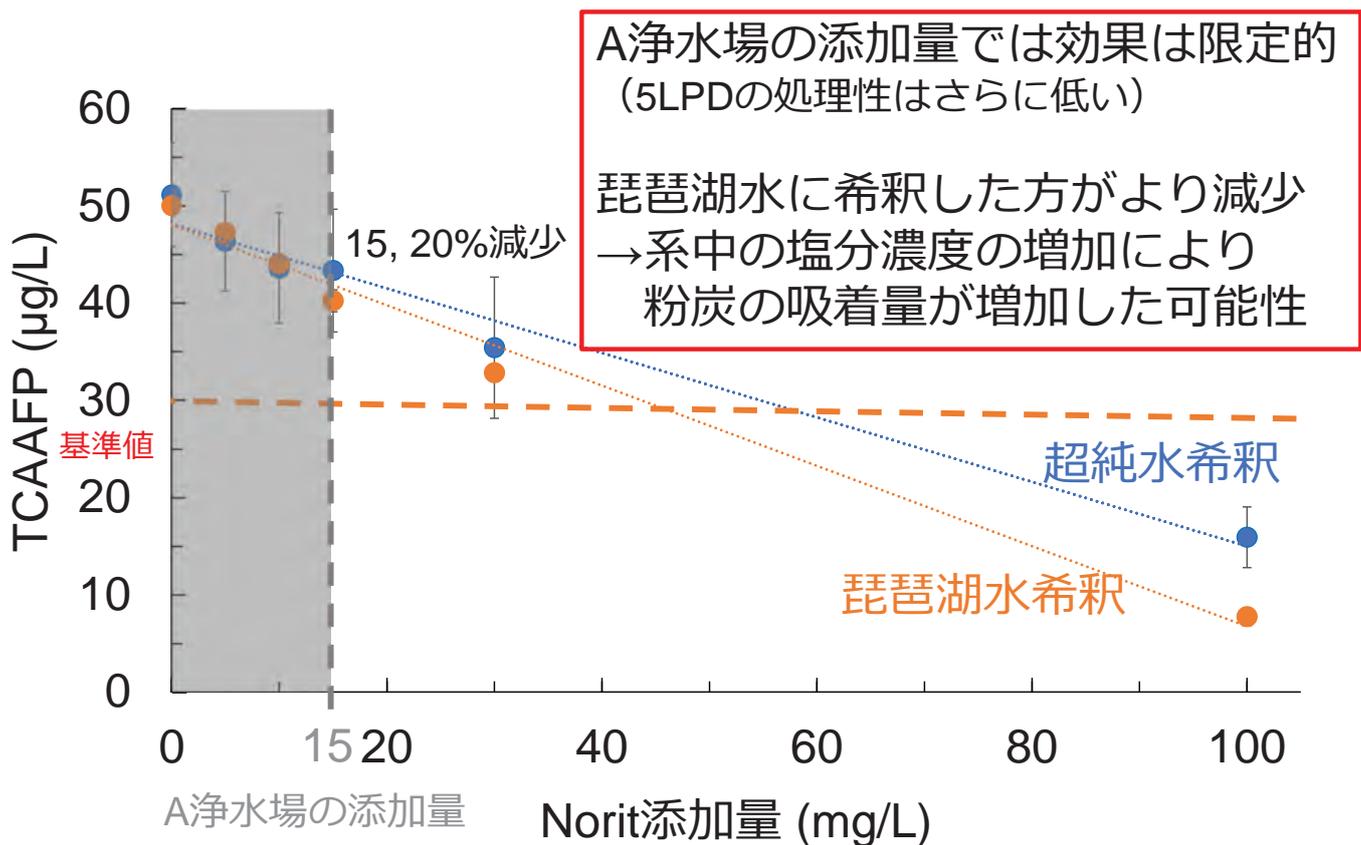
## まとめ: 環境水中の超親水性DOM

- 前塩素処理は後段の粉炭による処理性を大きく低下させることが示された。
- 超親水性溶存有機物に由来するHAAFPを低減させるためには、粉炭処理、凝集・沈殿処理、オゾン処理が効果的であることが示された。
- 連続処理においてDOCの除去性は下がるが、HAA前駆体の除去率が増加することが示された。

# 実験結果と考察

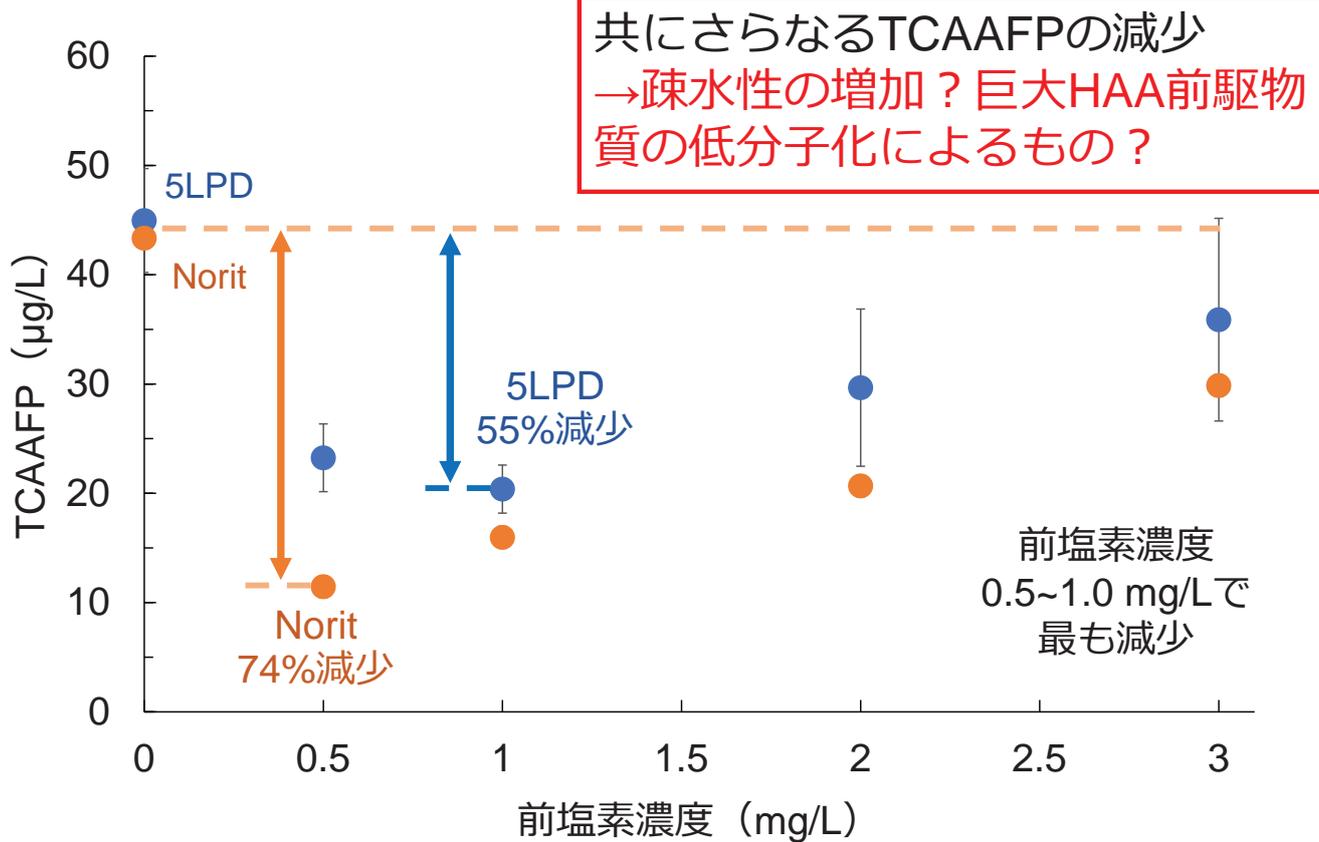
ラフィド藻類由来の超親水性DOMの処理性について

## 粉末活性炭処理（培養試料）



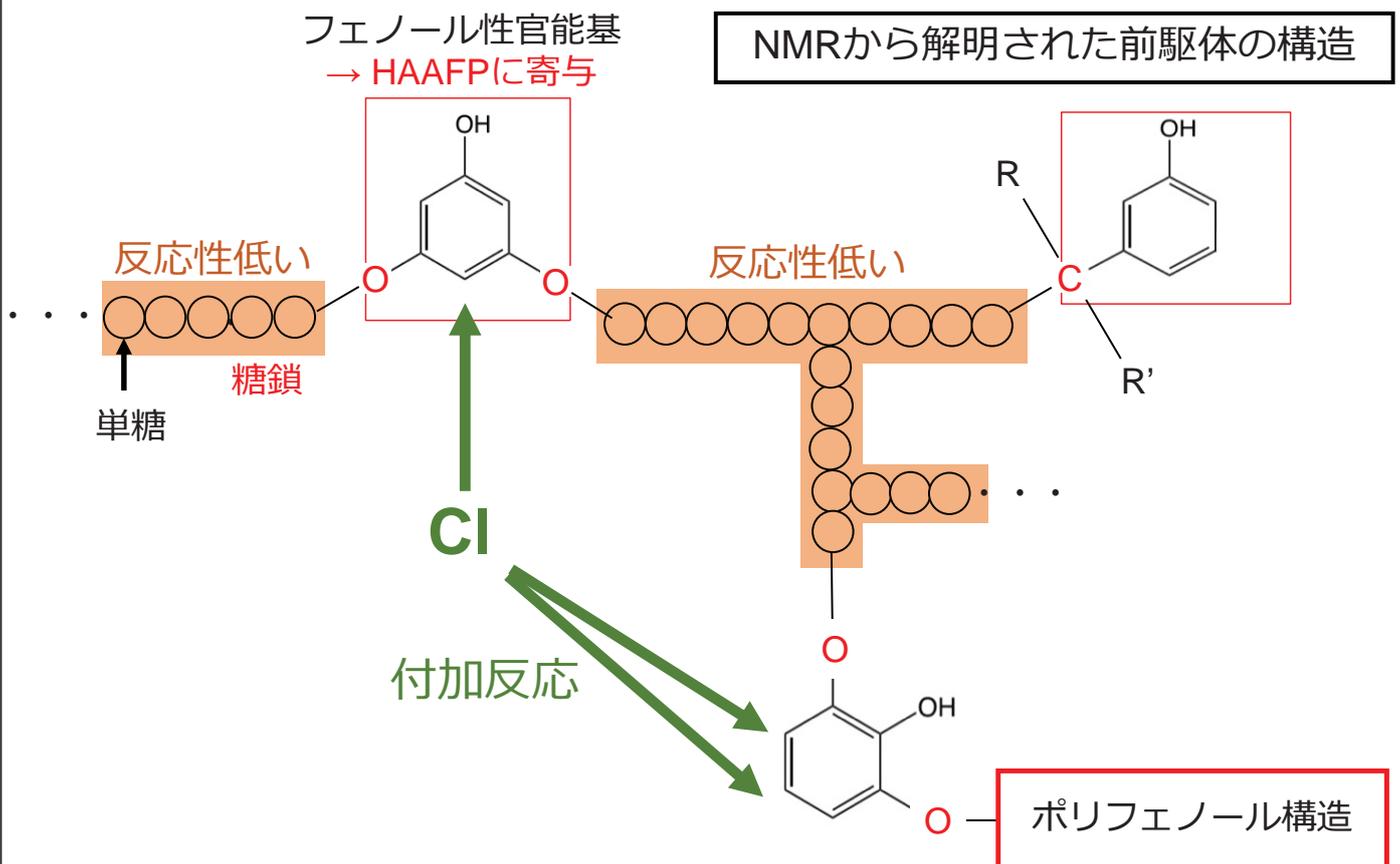
30

## 前塩素 + 粉末活性炭処理 (培養試料)

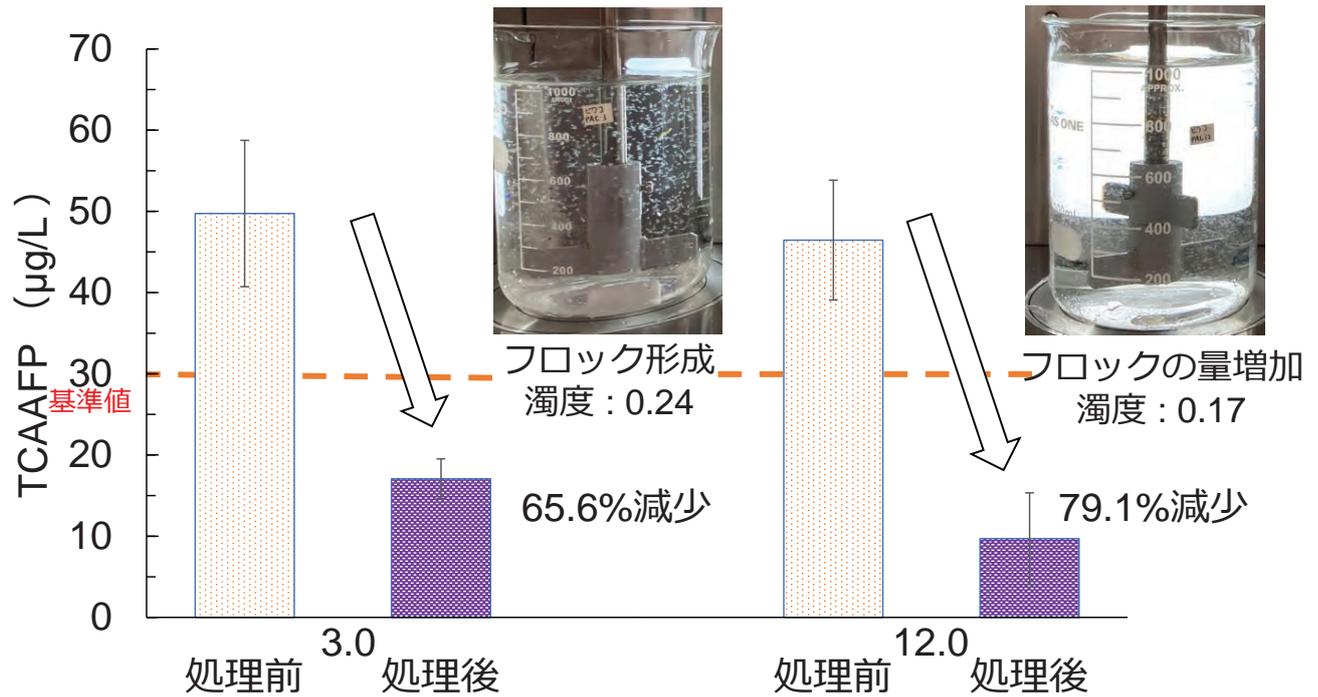


31

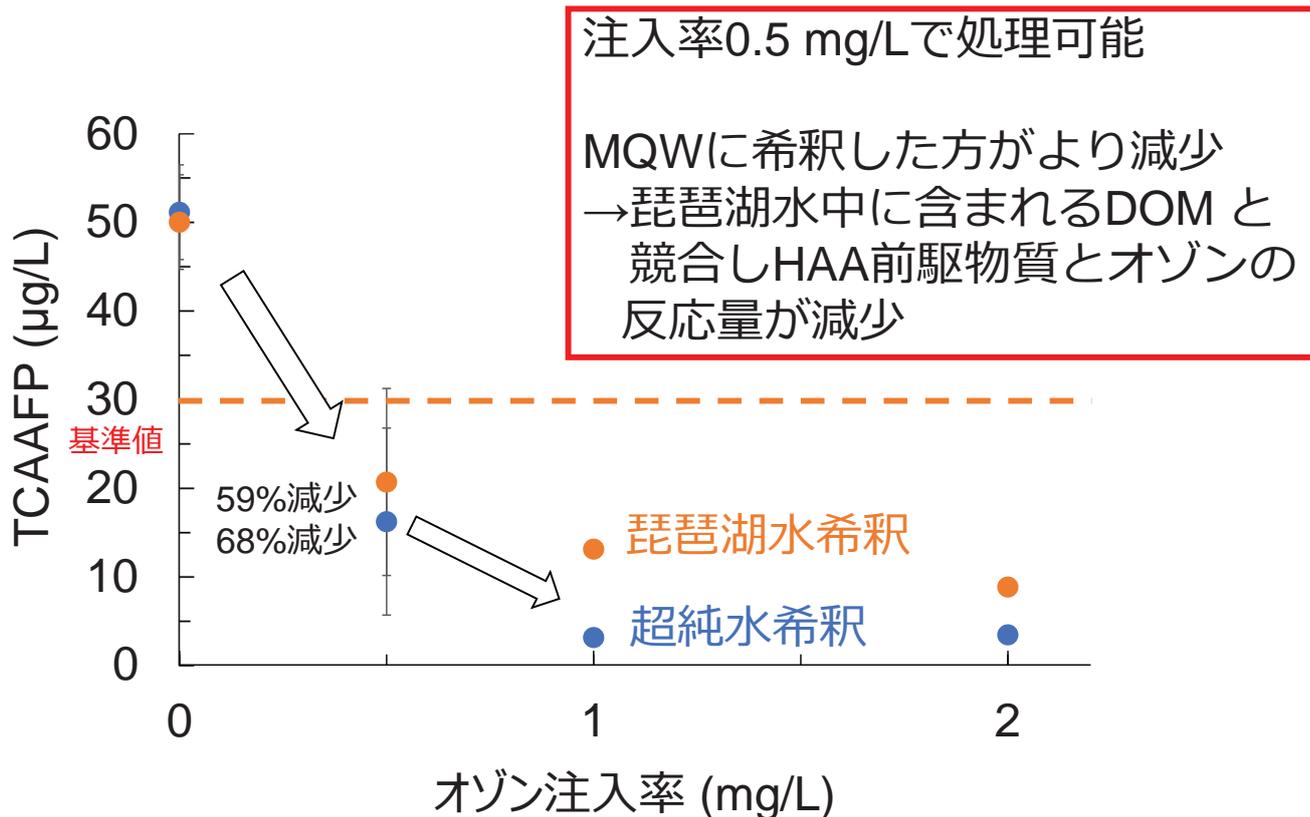
## HAA前駆物質の構造的特徴からの考察



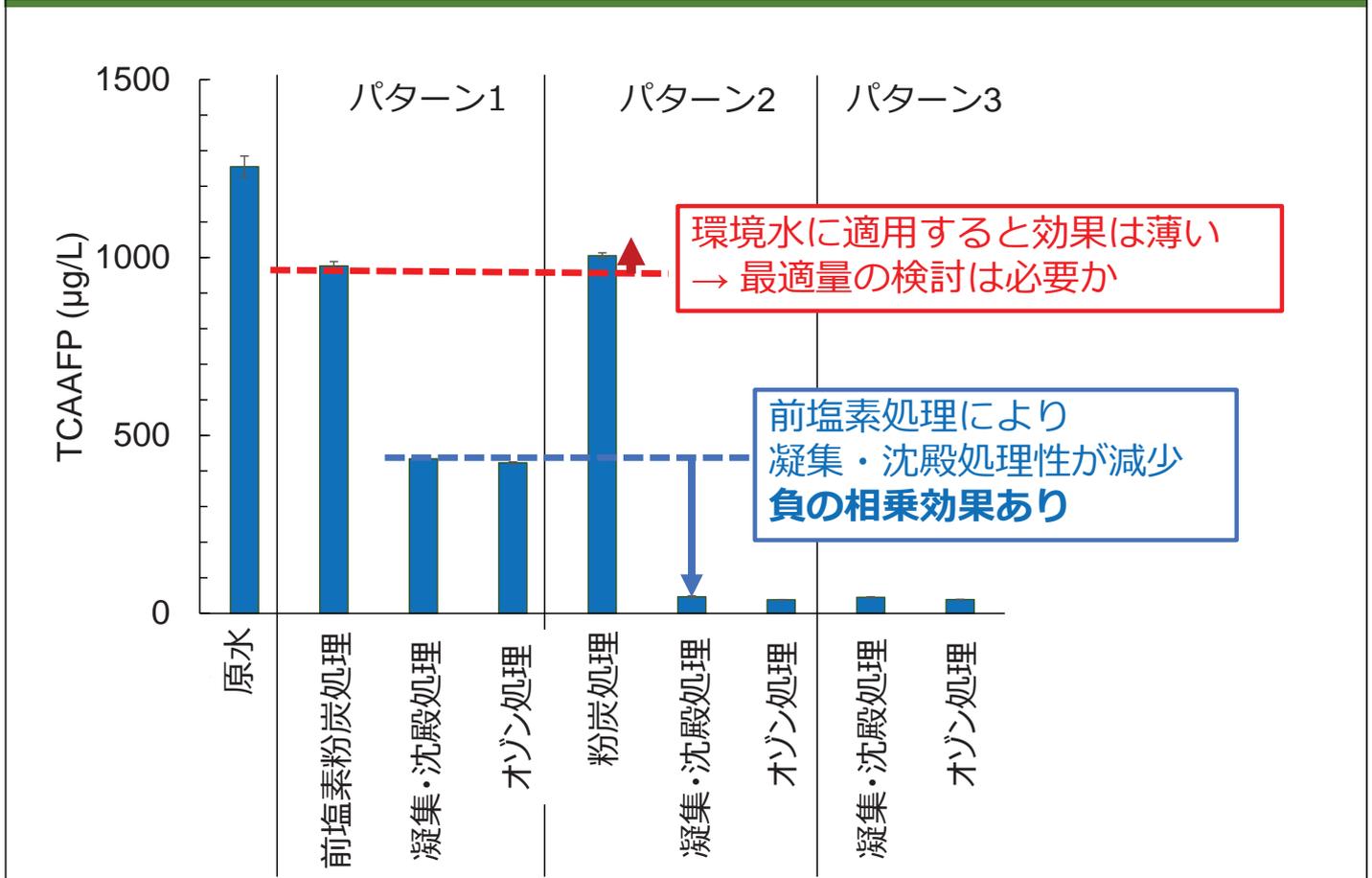
## 凝集・沈殿処理（培養試料）



## オゾン処理（培養試料）



## 連続処理（室生ダム水）



## まとめ: ラフィド藻由来の超親水性HAA前駆物質

- 前塩素処理が粉末活性炭処理の処理性を大きく向上させることが示された。
- ただし、前塩素処理と凝集・沈殿処理の処理性にはネガティブな関係があるため、添加量など考慮が必要である。
- 凝集・沈殿処理は藻類による凝集阻害が見られ、ラフィド藻類発生時にはPACの添加量を増やす必要性がある。
- 種は異なるが培養試料と室生ダムに対する処理性は概ね一致していた。

## 全体のまとめ

- 前塩素 + 粉末活性炭処理は、ラフィド藻由来の高分子HAA前駆物質には有効である。
- 他の超親水性DOM（比較的 low molecular weight 側と想定）には、前塩素 + 粉末活性炭処理は効果的ではない。
- 前塩素 + 粉末活性炭処理が超親水性DOMの除去のための一つの選択肢として、提示することができた。

## 謝辞

ご清聴ありがとうございました

琵琶湖・瀬田川流域における抗生物質による水環境汚染の実態解明

立命館大学（総合科学技術研究機構）  
澤田 和子 専門研究員

令和5年度 琵琶湖・淀川水質保全機構 研究助成  
2023年3月22日(金) 成果報告会

# 琵琶湖・瀬田川流域における 抗生物質による水環境汚染の実態解明

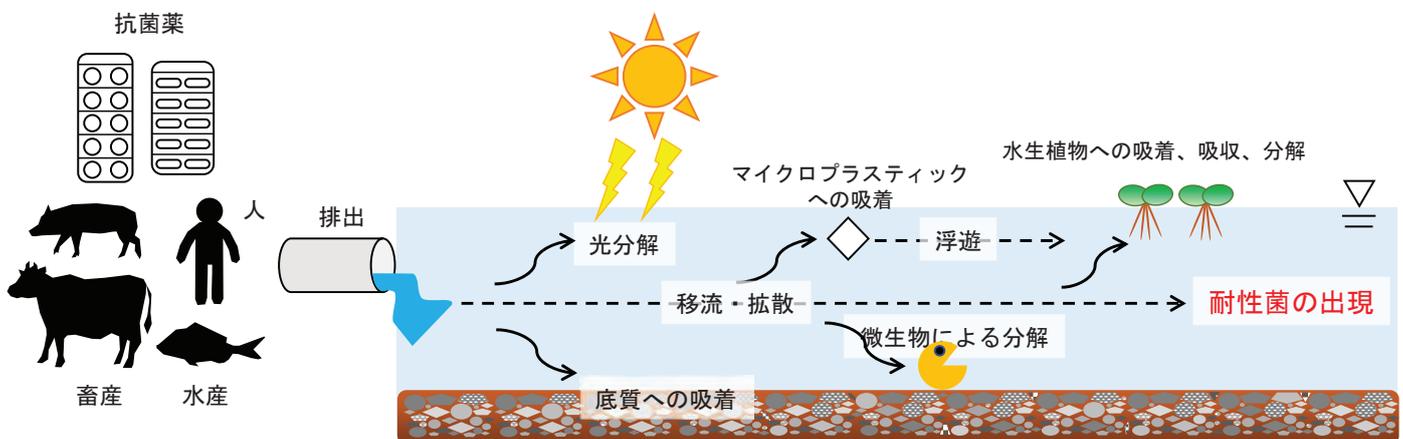


立命館大学 澤田和子

1

## 抗生物質

- ✓ 抗生物質は、細菌や真菌の産生物質であり、他の微生物の細胞壁の合成や機能、DNAの合成を阻害し、静菌・殺菌作用を示す。
- ✓ 抗菌薬は、微生物感染症の予防や治療のため、医療や農畜水産業などの分野において必要不可欠なものである。



アンピシリン、オキシテトラサイクリン、エリスロマイシン、リンコマイシンの物性調査から、リンコマイシンは水環境中に残存しやすいことが示唆された。(澤田ら, 2023)

2

# 本研究の対象抗菌薬

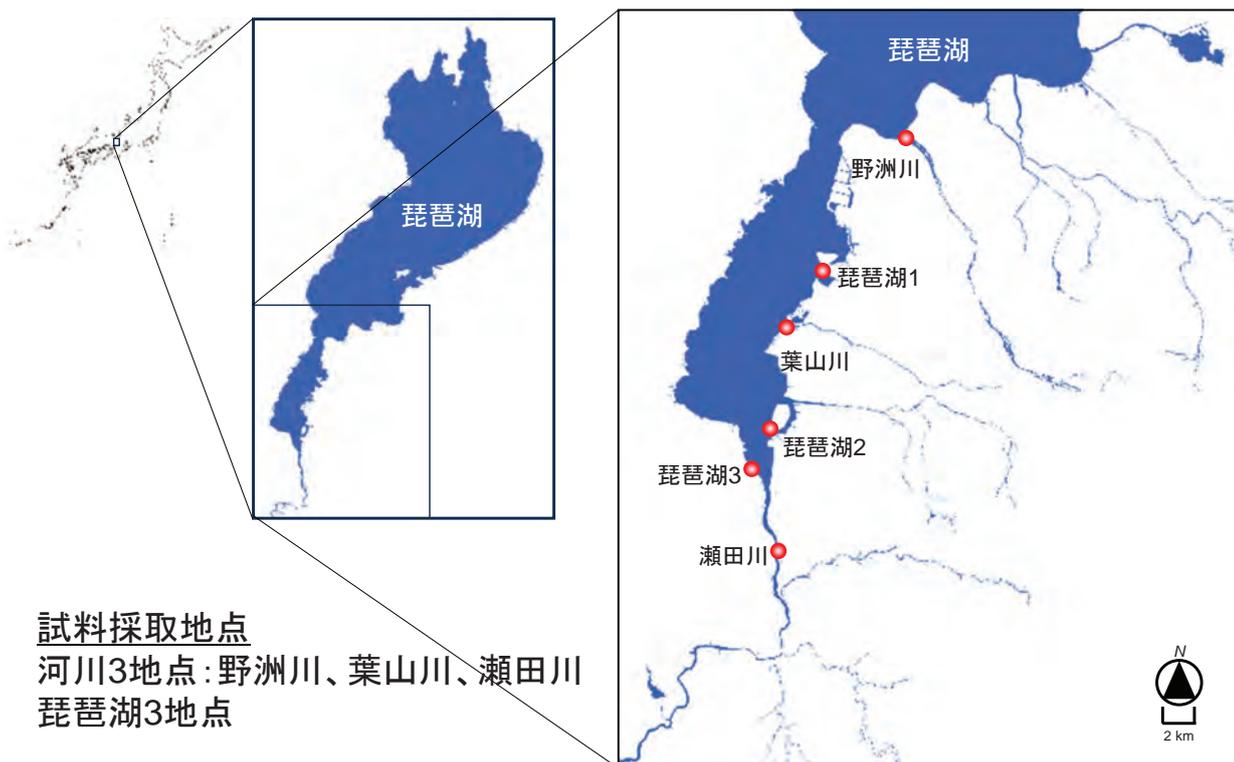
抗菌薬	エリスロマイシン (EM)	リンコマイシン (LCM)	レボフロキサシン(LVFX)
	マクロライド系	リンコマイシン系	ニューキノロン系
構造式	<b>環境リスク初期評価</b>		<b>薬剤耐性(AMR)対策アクションプラン (2016-2020)</b>
分子式	$C_{37}H_{67}NO_{13}$	$C_{18}H_{34}N_2O_6S$	$C_{18}H_{20}FN_3O_4$
分子量 (g/mol)	733.93	406.54	361.38
抗菌スペクトル	グラム陽性菌、マイコプラズマ	グラム陽性菌	グラム陽性菌、陰性菌、マイコプラズマ、緑膿菌
作用機序	リボソーム50Sサブユニットに作用して、タンパク質合成を阻害	リボソーム50Sサブユニットに作用して、タンパク質合成を阻害	DNAの複製を阻害
販売量(2005~2021年)	17~107 t/年	21~48 t/年	17~20 t/年 (2002) (八十島ら, 2004)
予測環境中濃度(PEC)/ 予測無影響濃度(PENC)	0.08	0.12	リスクなし (八十島ら, 2004)

## 研究目的

- ✓ 水環境中に残存し易いと推定されるEM、LCMおよびLVFXを対象として、水環境中の実態を明らかにする

3

# 調査地点



## 試料採取地点

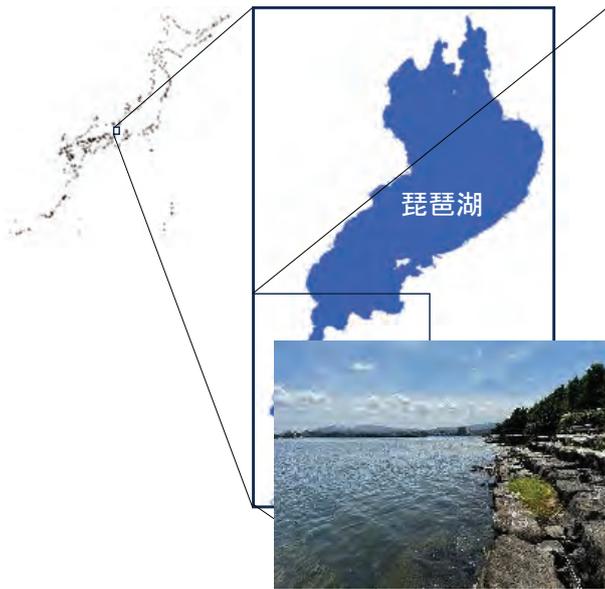
河川3地点:野洲川、葉山川、瀬田川  
琵琶湖3地点

## 試料採取日

2023年8月3日(夏季)、10月13日(秋季)、2024年1月8日(冬季)

4

# 調査地点



## 試料採取地点

河川3地点:野洲川、葉山川、瀬田川  
琵琶湖3地点

## 試料採取日

2023年8月3日(夏季)、10月13日(秋季)

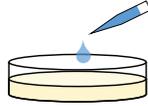
# 実験方法

採取試料

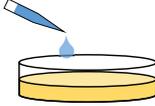
耐性菌の評価

プレーティング

水試料



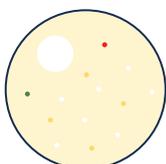
R2A寒天培地  
従属栄養細菌



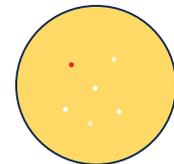
R2A寒天培地  
+EM、LCMまたはLVFX 50 mg/L  
耐性菌

25°C、7日間  
培養

生菌数(CFU/mL)の算出



従属栄養細菌



EMまたはLCM耐性菌

コロニー数を計測

濃度の測定

固相抽出

水試料



Oasis HLB  
カートリッジ

濃縮



定量分析

LC/MS/MS (Shimadzu)  
Prominence UFLCシステム、LCMS-8030

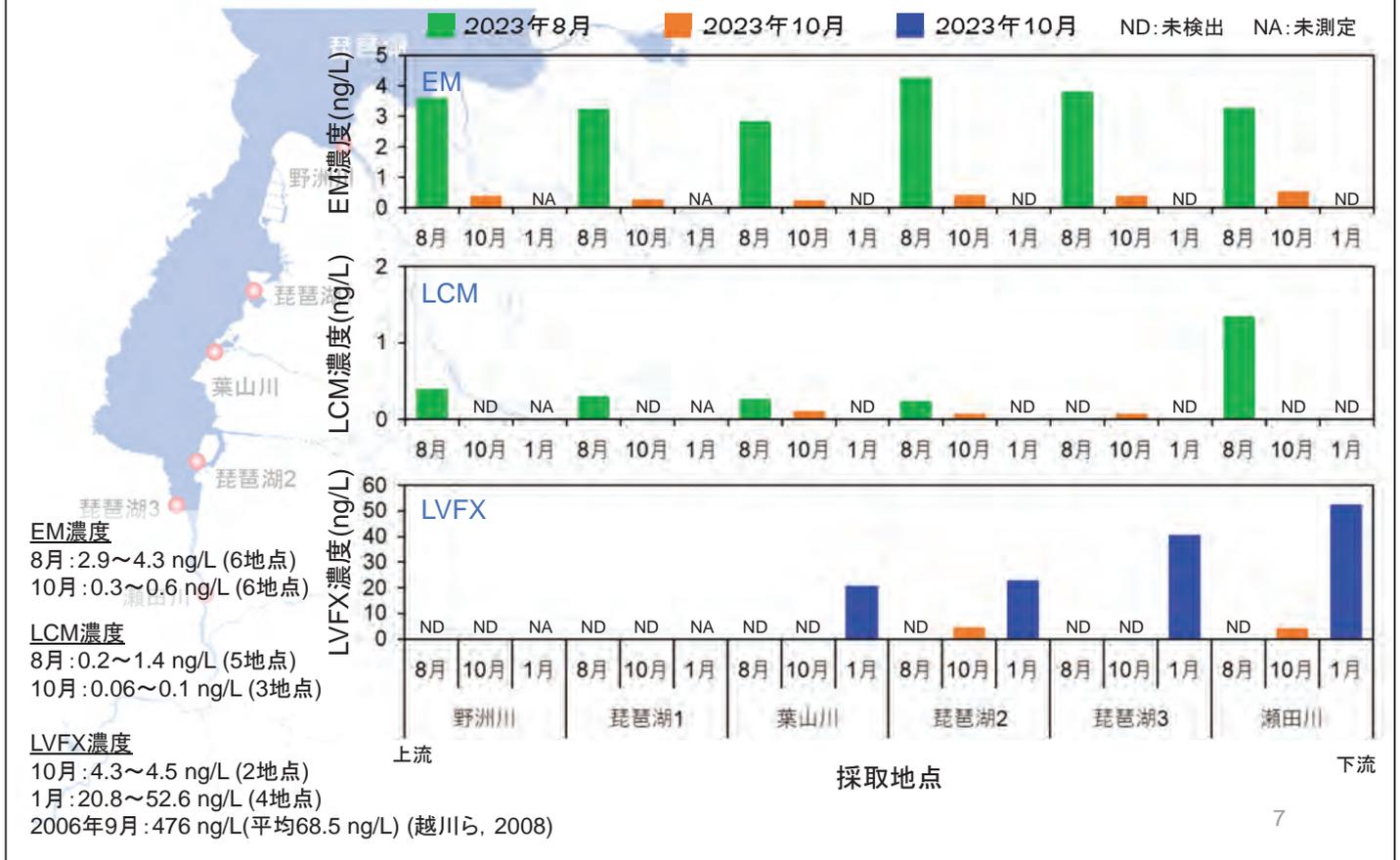


定量下限値

EM、LCM: <math><0.1 \text{ ng/L}</math> LVFX:

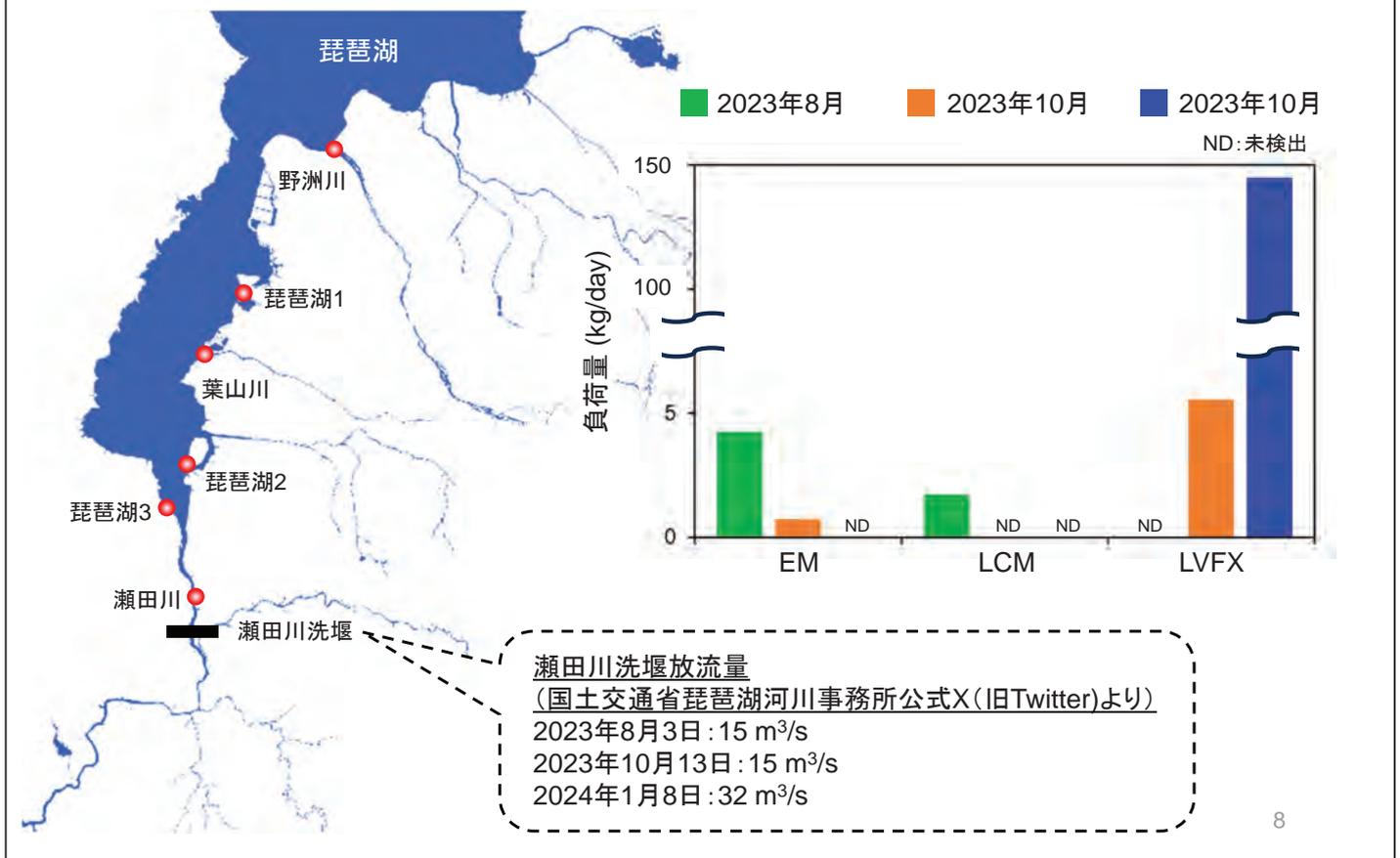
6

# 抗菌薬の存在濃度



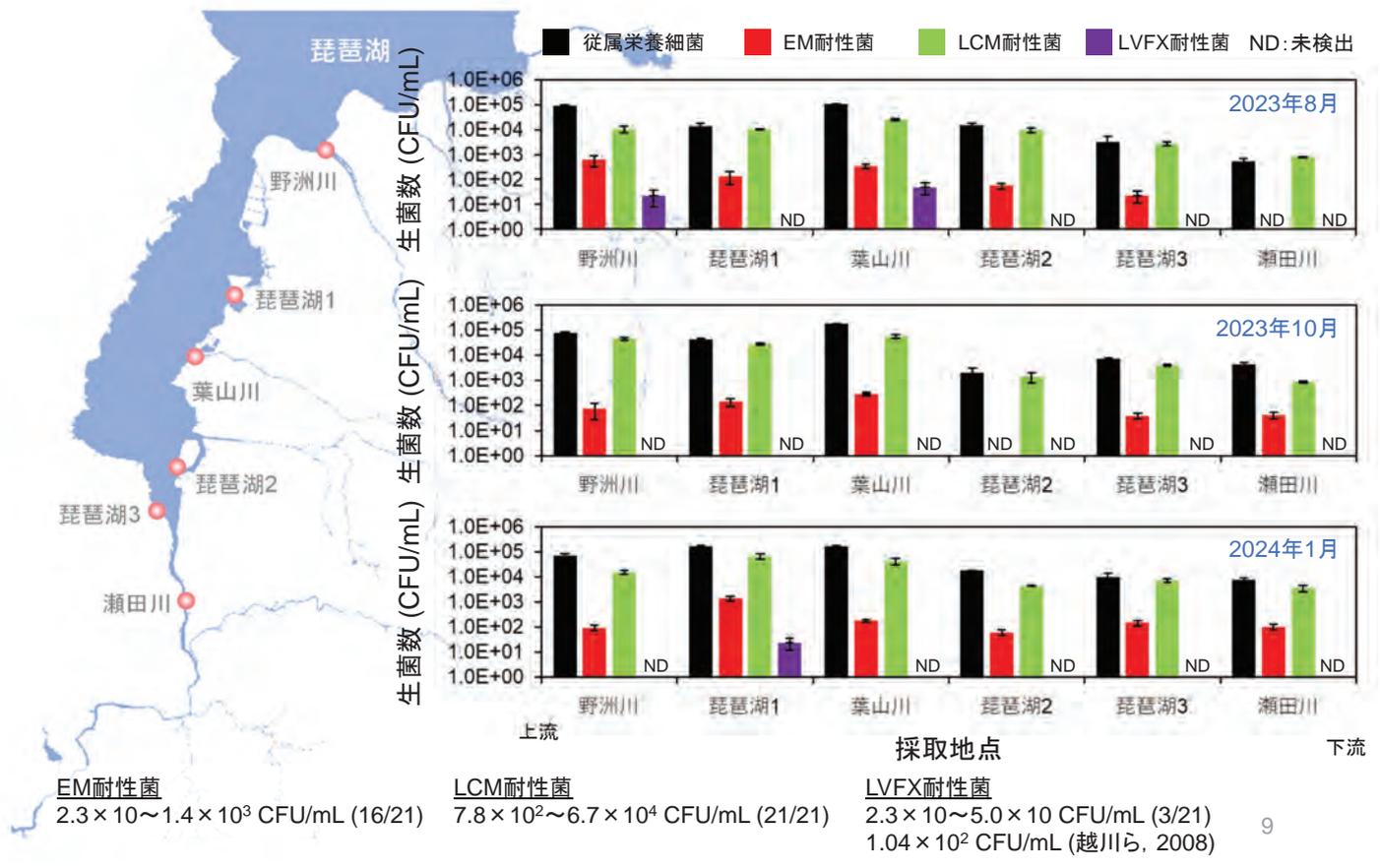
7

# 瀬田川下流への負荷量

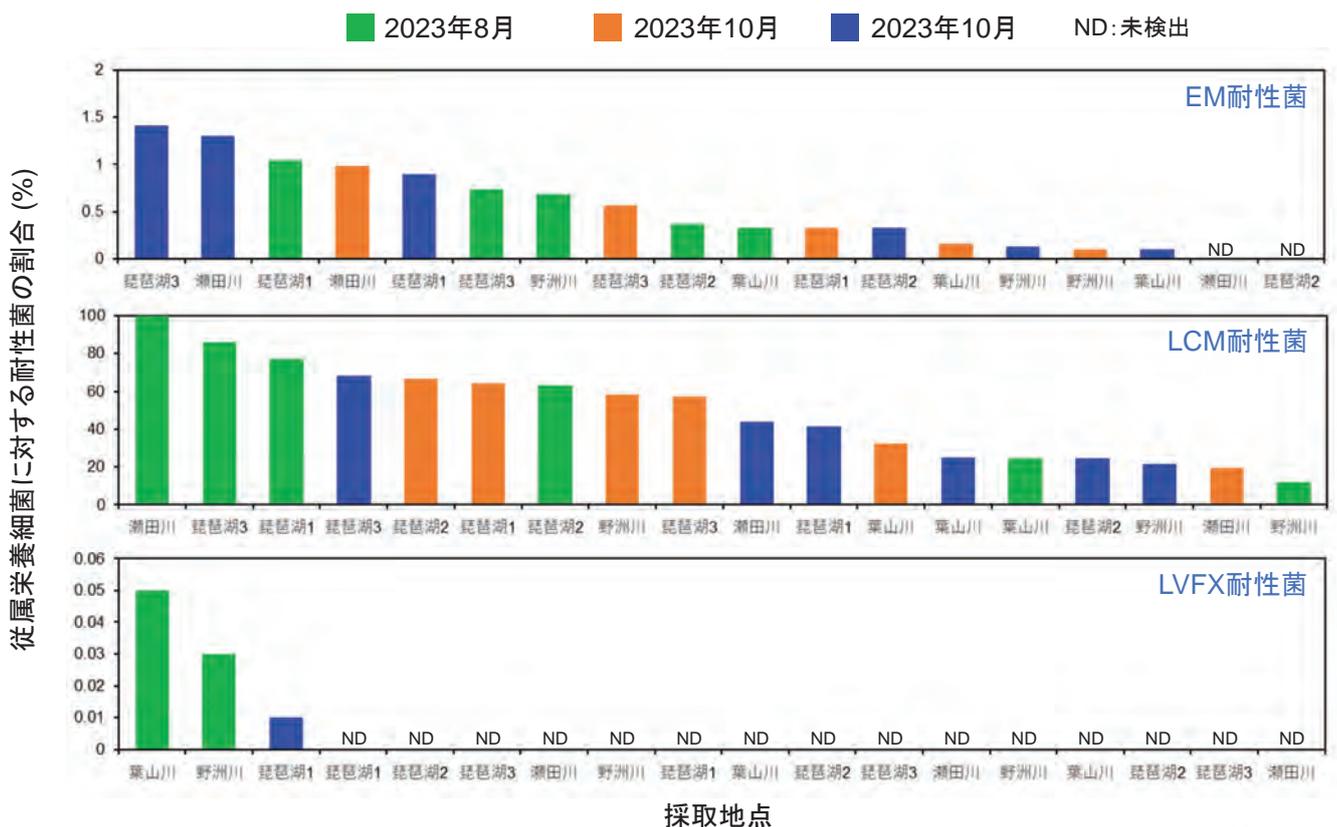


8

# 耐性菌の分布

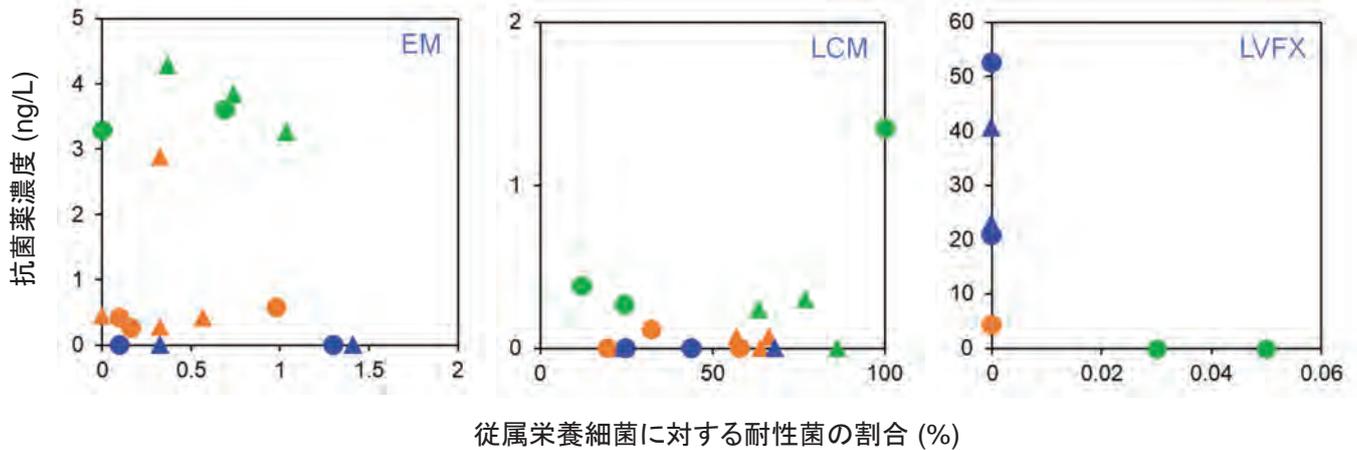


# 耐性菌の割合



# 存在濃度と耐性菌の割合の相関

- 河川:2023年8月      ● 河川:2023年10月      ● 河川:2023年10月  
 ▲ 琵琶湖:2023年8月      ▲ 琵琶湖:2023年10月      ▲ 琵琶湖:2023年10月



11

## まとめ

- EMおよびLCMは夏季(8月)、LVFXは冬季(1月)に高濃度になる傾向
- EMおよびLCM耐性菌は河川・湖水中の広範囲に一定数存在

## 今後の課題

- ✓ EM、LCMおよびLVFXの存在濃度の詳細な季節変動

12

# 謝辞

本研究は、令和5年度 公益財団法人琵琶湖・淀川水質保全機構 水質保全研究助成による助成を受けて実施しました。ここに記して謝意を表します。