

を上げるとオゾンが分解され酸化力が強く殺菌力が強いと考えられる活性ラジカル種によるダメージによって、酵素生成能力の抑制に効果が見られたためと考えられた。

オゾン曝気による消毒では、外膜損傷に関して最も効果が高いが、それと同程度に酵素生成能力および増殖能力に関する抑制能力を発揮していることがわかった。これは気泡中の高濃度オゾンによる作用と考えられる。pH が低い場合は、溶液中の残存オゾンが高くなり、不活化率の向上が見られた。この場合はオゾン溶解水の場合のように損傷レベルが低く増殖可能な細菌を、誤陰性としてしまう可能性は低いといえる。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 廣戸裕子, 大瀧雅寛, 2006, 「流水式紫外線照射装置における一般細菌を用いた生物線量計の実用性」, 用水と廃水, Vol.48, No.11, pp.989-993.
- 2) 廣戸裕子, 神子直之, 大瀧雅寛, 久保田俊夫, 岩崎達行, 「流水式紫外線消毒装置における装置形状の消毒効果へ及ぼす影響」 (水環境学会誌へ投稿中)

2. 学会発表

- 1) 廣戸裕子, 大瀧雅寛, 2006 「流水式UV装置における生物線量計としての一般細菌の妥当性」 第40回日本水環境学会年会講演集, pp.426

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

特になし。

アニュラーリアクターを用いた配水管路内における
微生物再増殖制御に関する検討

主任研究者	国包	章一
分担研究者	島崎	大
研究協力者	高井	正子

アニュラーリアクターを用いた配水管路内における微生物再増殖制御に関する研究

主任研究者	国立保健医療科学院水道工学部長	国包 章一
分担研究者	国立保健医療科学院水道工学部	島崎 大
研究協力者	国立保健医療科学院水道工学部	高井 正子

研究要旨

配水過程における微生物再増殖性（生物膜形成性）に関わる浄水水質側および管路側の要件には残留塩素濃度、栄養源となる有機物質および無機物質濃度、温度、濁度、流速、配水管の材質、管壁面の粗度などが挙げられる。ここでは残留消毒濃度と管内の表面粗度に着目し、生物膜モニタリング装置であるアニュラーリアクターを用いて、各々が配水過程における微生物再増殖性に及ぼす影響について調べた。遊離塩素濃度を3段階（0.5mg/L、0.1mg/L、0.0mg/L）に設定して比較した結果、塩素濃度が高いほど微生物の再増殖が抑制されたが、管内面に付着する生物膜や流出水中の微生物濃度は、いずれの塩素濃度においても、通水開始当初は増加していくものの15～20日程度で定常状態となり、それ以降は増加しなかった。定常期における従属栄養細菌の付着量は、残留塩素濃度0.0mg/Lの場合に比べて、0.1mg/Lでは2log程度、0.5mg/Lでは3log程度抑制され、定常期における従属栄養細菌の流出水中濃度は、残留塩素濃度0.0mg/Lの場合に比べて、0.1mg/L、0.5mg/Lともに2log程度抑制された。また、微生物の付着量および流出水中の微生物濃度が定常に達した後、有効塩素濃度を1.0～1.2mg/Lとして1日中通水したことにより、いずれの遊離塩素濃度の場合も微生物の付着量および流出水中の微生物濃度は一時的に減少したが、5日前後で残留塩素濃度を高める前の数値前後まで回復した。管内の表面粗度については、ガラス製の試験片を加工して表面粗度を3段階（すりガラス2種類と普通のガラス）に設定し、残留塩素なしで通水したところ、生物膜の形成速度は表面が細かい程速くなった。付着した微生物濃度は普通のガラスと比較すると、すりガラス320#（加工するときに吹付ける砂の大きさが320#）は2桁、すりガラス180#（加工するときに吹付ける砂の大きさが180#）は1桁大きくなった。

A. 研究目的

残留塩素に依存しない水道の給配水システムでは、微生物の栄養源となる有機物や無機物の濃度が高い等、浄水中の微生物学的安定性が確保されていない場合において、微生物再増殖性が大いに増大することが想定される。ここでは、生物膜モニタリング装置であるアニュラーリアクターを用いて、残留塩素が存在しない状況下での微生物再増殖ポテンシャル、また遊離残留塩素濃度および試験片の表面粗度が及ぼす影響につき明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

1. 残留塩素濃度による微生物再増殖性の相違

原水として国立保健医療科学院水道水を使用し、チオ硫酸ナトリウムまたは次亜塩素酸ナトリウムを添加することにより、各系統の試料水の遊離塩素濃度がそれぞれ 0.0mg/L、0.1mg/L、0.5mg/L 程度となるように調整し、44 日間連続的にアニュラーリアクターへ通水した。ただし、通水開始後 34 日目は、全ての系統において一時的に遊離塩素濃度を 1.0~1.2mg/L に上げ、形成された生物膜の剥離状況および回復状況を調べた (図. 1)。流入量を 10mL/分に設定し、滞留時間を約 100 分 (容積約 1L) とした。試験片の材料はポリカーボネイトとした。回転ドラムを 180rpm の速度で回転させ、流速 50cm/秒、内径 20mm に相当する給水管内の状況を再現した。各試料水の水温は 20℃前後に維持した。試験片表面に付着した生物膜は、滅菌済みのスクレーパーで剥ぎ取り、試験片 1 枚あたり 10mL の希釈水 (リン酸塩緩衝希釈水) で攪拌したものを試料とした。流入水、流出水および試験片表面に付着した微生物を週 2 回の間隔でサンプリングし、各系統の流入水、流出水および試験片表面における一般細菌と従属栄養細菌を測定した。測定は上水試験方法に準じ、従属栄養細菌は R2A 培地 (Difco 社製) を用いて 20℃で 7 日間培養した。

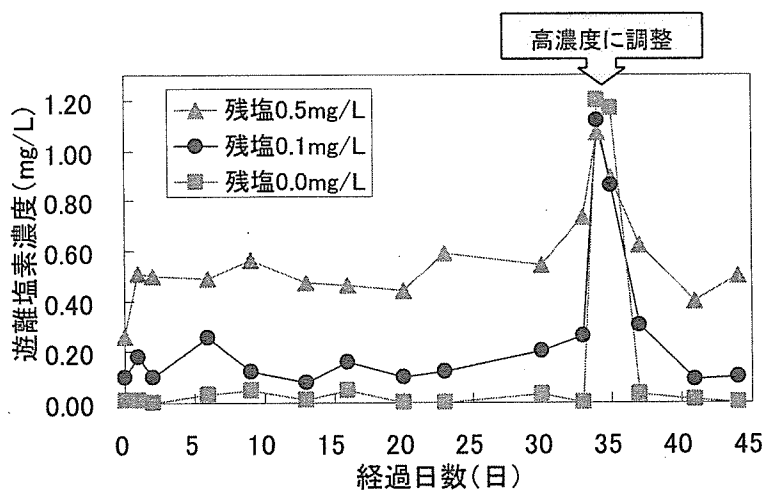


図. 1 各系統の遊離塩素濃度

2. 表面粗度による微生物再増殖性の相違

表面粗度の異なるすりガラス 2 種類 (加工するとき吹付ける砂の大きさ: 180#, 320#) と普通のガラスを試験片として用い、試験片の表面粗度を 3 段階に設定した。原水として国立保健医療科学院水道水を使用し、チオ硫酸ナトリウムを添加することにより全ての系統の試料水の遊離塩素濃度が 0.0mg/L 程度となるように調整し、48 日間連続的にアニュラーリアクターへ通水した。ただし、形成された生物膜の剥離状況および回復状況を調べるため、通水開始後 23 日目は、全ての系統において一時的に遊離塩素濃度 0.9~1.3mg/L に上げ 1 日通水し、36 日目は全ての系統において一時的に遊離塩素濃度を 0.7mg/L に上げ 2 日間通水した (図. 2)。滞留時間、ドラムの回転速度、水温、サンプリング間隔等は「1. 残留塩素濃度による微生物再増殖性の相違について」と同様にした。試験片表面に付着した生物膜は、滅菌済みのスクレーパーで剥ぎ取った後、2 分間超音波にかけ試験片 1 枚あたり 10mL の希釈水 (リン酸塩緩衝希釈水) で攪拌したものを試料とした。

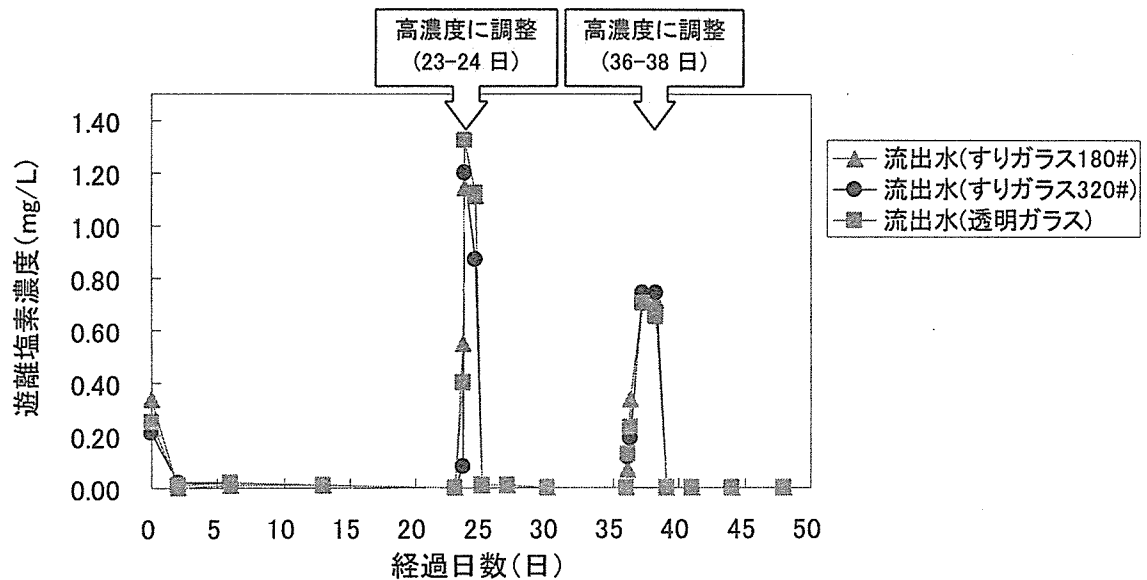


図. 2 各系統の遊離塩素濃度

C. 結果および考察

1. 残留塩素濃度による微生物再増殖性の相違

表. 1に流入水の水質を示す。水温以外の水質項目については、使用した水道水の水質によるが、特に微生物再増殖性の指標となるAOC濃度は平均199 $\mu\text{g/L}$ であり、国内の他の測定例と比べて高く、微生物が比較的再増殖しやすい水質であったといえる。

試験片表面の一般細菌密度および従属栄養細菌密度を図. 3および図. 4に示す。一般細菌密度は、残留塩素濃度0.0mg/Lの場合は通水開始当初から、残留塩素濃度0.1、0.5mg/Lの場合は6日目以降から増加し始めた。その後15~20日以降は、全ての系統において、小さな変動はあるものの増加しなくなり定常期に達した。定

常期(16~23日)における試験片表面の一般細菌密度は、残留塩素濃度0.0mg/Lで $4.3 \times 10^5 \sim 1.3 \times 10^6 \text{CFU/cm}^2$ であり最も大きかった。残留塩素濃度0.1mg/L、0.5mg/Lの場合は、それぞれ $1.8 \times 10^2 \sim 6.1 \times 10^2 \text{CFU/cm}^2$ 、 $3.5 \times 10^2 \sim 1.8 \times 10^2 \text{CFU/cm}^2$ となった。試験片表面における一般細菌密度は、残留塩素が無い場合に比べて、残留塩素濃度0.1mg/Lで3~4桁程度、0.5mg/Lで4桁程度抑えられた。従属栄養細菌密度は、いずれの残留塩素濃度においても、通水開始当初から増加し始め、15~20日以降は定常期に達した。増殖期における試験片表面の従属栄養細菌増加速度は残留塩素濃度0.0mg/Lが最も速く、残留塩素により微生物膜の増殖が抑制されていた。定常期(16~23日)における試験片表面の従属栄養細菌密度は、残留塩素濃度0.0mg/Lで $6.5 \times 10^5 \sim 3.1 \times 10^6 \text{CFU/cm}^2$ であり最も大きく、0.1mg/Lと0.5mg/Lの場合は、それぞれ $6.4 \times 10^3 \sim 1.3 \times 10^4 \text{CFU/cm}^2$ 、 $3.5 \times 10^2 \sim 5.7 \times 10^3 \text{CFU/cm}^2$ となった。試験片表面における従属栄養細菌密度は、残留塩素が無い場合に比べて、残留塩素濃度0.1mg/Lで2桁程度、0.5mg/Lで3桁程度抑えられた。また、一般細菌、従属栄養細菌ともに残留塩素濃度0.5mg/Lの場合は変動が大きく、不安定な微生物膜が形成されたと考えられる。

表. 1 流入水の水質

(平均値、11/7~12/21に測定)

水温	19.1 $^{\circ}\text{C}$
pH	7.93
TOC	1.35mg/L
AOC*	199 $\mu\text{g/L}$
$\text{NO}_3\text{-N}$	2.2mg/L
$\text{NO}_2\text{-N}$	0.006mg/L
PO_4	0.24mg/L

※給水栓から直接採水

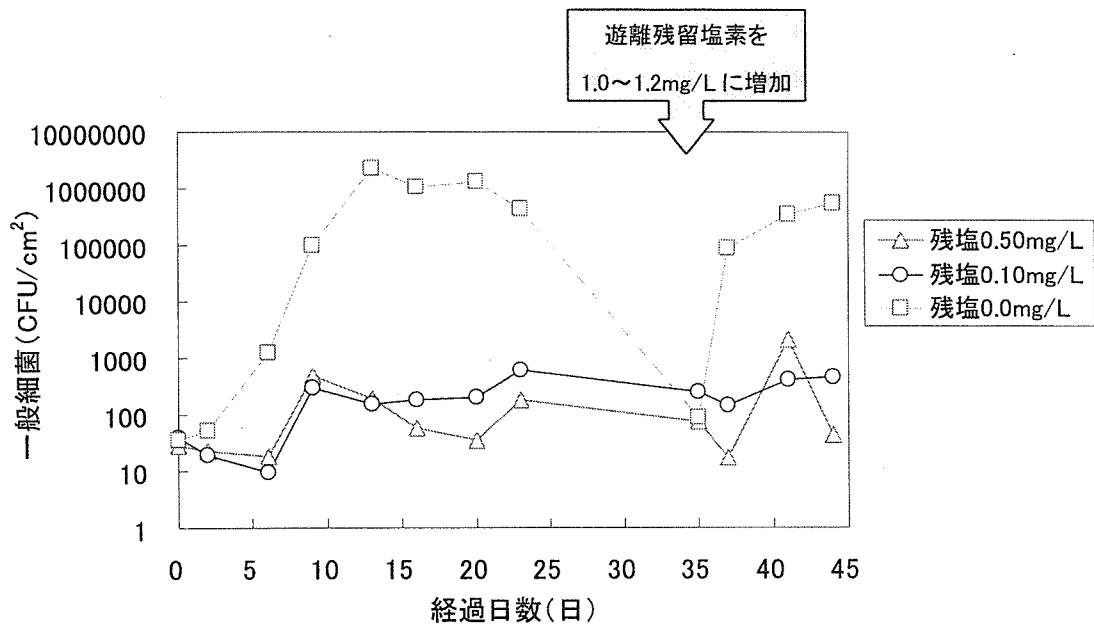


図. 3 一般細菌経日変化(試験片表面)

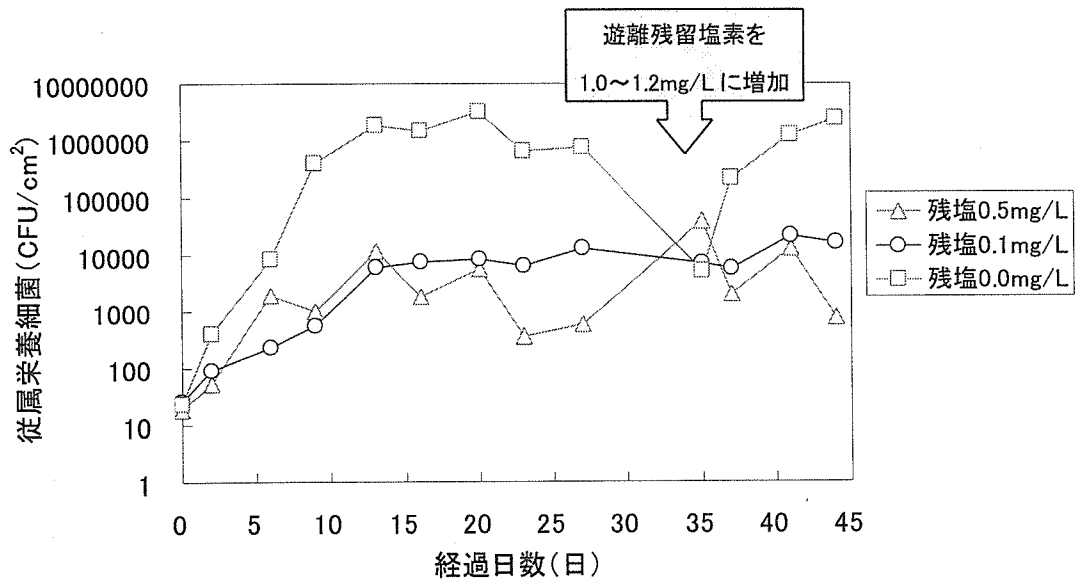


図. 4 従栄養細菌経日変化(試験片表面)

34日目に塩素濃度を1.0~1.2mg/Lに高めて一日通水したところ、残留塩素濃度0.0mg/Lではその影響を受け35日目の一般細菌密度、従属栄養細菌密度がともに大幅に減少した。35日以降、塩素濃度を元の0.0mg/Lに戻して通水すると、再び増加に転じ、約5日後には残留塩素濃度を高める前の数値前後まで達した。35~37日目の微生物増殖速度(一般細菌： 4.4×10^4 CFU/cm²/日、従属栄養細菌： 1.0×10^5 CFU/cm²/日)は、0~9日目の微生物増殖速度(一般細菌： 1.1×10^4 CFU/cm²/日、従属栄養細菌： 4.3×10^4 CFU/cm²/日)に比べて大きい。塩素濃度を高めたことにより試験片表面の微生物が完全に死滅したのではなく、培地での増殖性を失う程度に損傷したため、測定では検出されないものの、試験片表面には微生物が生残しており、塩素消去後に急速に回復することができた可能性がある。残留塩素濃度0.1mg/L、0.5mg/Lの場合は、塩素濃度を高くした影響が見られず、塩素が存在する環境で生成された微生物膜は、塩素に対する耐性を持

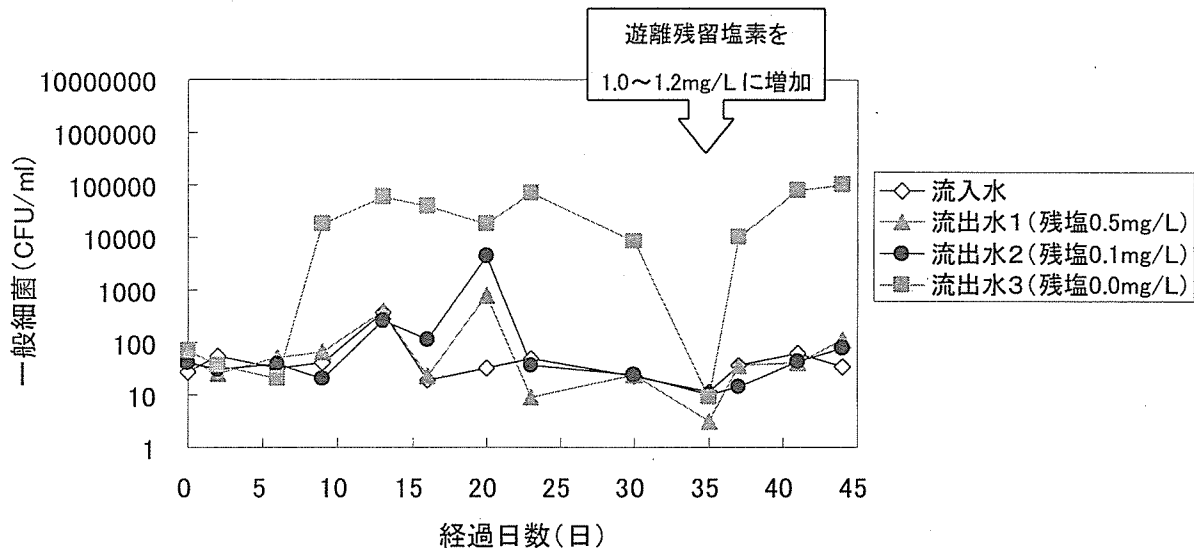


図. 5 一般細菌経日変化(流入水・流出水)

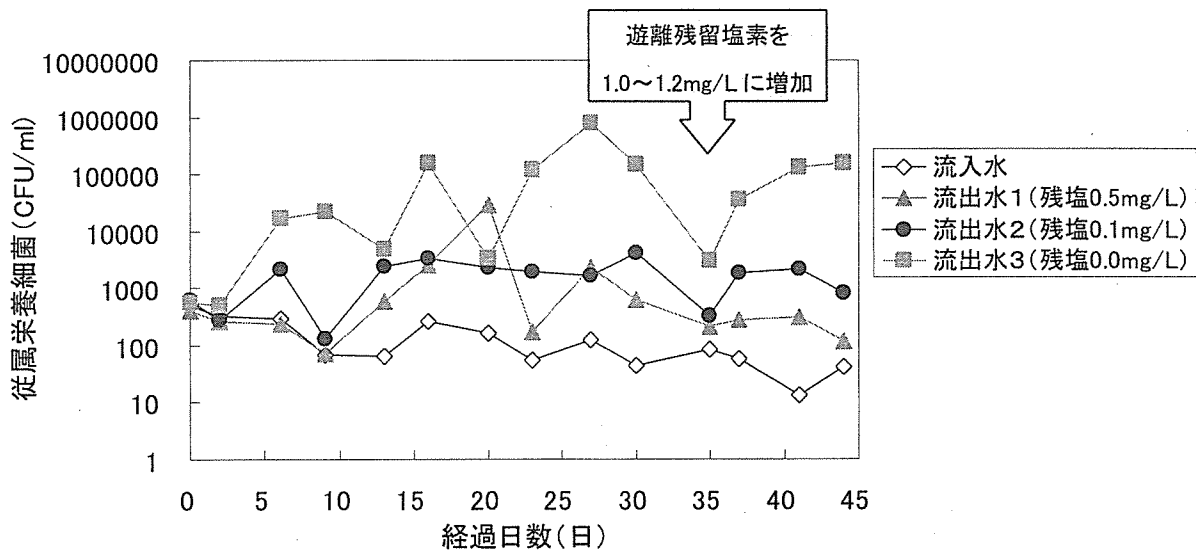


図. 6 従属栄養細菌経日変化(流入水・流出水)

っていると考えられる。

流入水・流出水中の一般細菌濃度および従属栄養細菌濃度を図. 5および図. 6に示す。流出水中の一般細菌濃度は、塩素濃度 0.1mg/L、0.5mg/L では 20 日目を除いて、流入水中との差がほとんどなく、残留塩素により一般細菌濃度の増加が抑えられたといえる。塩素濃度 0.0mg/L の場合も、0~6 日は流入水とほとんど差がないが、その後は増加して 15~20 日で定常期に達しており、定常期 (16~30 日) の一般細菌濃度は $8.4 \times 10^3 \sim 7.1 \times 10^4$ CFU/ml であった。試験片表面の微生物膜が増殖し始めてしばらくは流出水中の濃度に変化はないが、ある程度 (1.0×10^5 CFU/cm²) まで大きくなると剥離して流出水中に入ると考えられる。

流出水中の従属栄養細菌濃度については、いずれの残留塩素濃度の場合でも流入水中より多い。塩素が存在することで一般細菌の増加は抑えられていたが、従属栄養細菌では塩素が存在するにもかかわらず増加していることから、一般細菌に比べて塩素に対する耐性が強いといえる。従属栄養細菌濃度は、いずれの残留塩素濃度においても 15~20 日で定常期に達した。定常期 (16~

30日)の従属栄養細菌濃度は、残留塩素濃度0.0mg/Lの場合は $3.4 \times 10^3 \sim 8.0 \times 10^5$ CFU/ml、残留塩素濃度0.1mg/L $1.6 \times 10^3 \sim 4.2 \times 10^3$ CFU/mlであった。残留塩素濃度0.5mg/Lでは増減を繰り返しているが、20日目を除き、他の残留塩素濃度における値以下を示し、最高で 2.3×10^3 CFU/mlであった。

35日目は、一般細菌、従属栄養細菌ともに残留塩素濃度を高めた影響を受けて流出水中の濃度が減少しているが、一時的なものであり5日前後で回復した。また、この時、試験片表面、流出水ともに従属栄養細菌では最大で2桁程度下がったが、一般細菌では最大で4桁程度下っており、従属栄養細菌は塩素濃度の変化による影響が一般細菌に比べて小さいといえる。

2. 表面粗度による微生物再増殖性の相違

表. 2に流入水の水質を示す。試験片表面の一般細菌密度および従属栄養細菌密度を図. 7および図. 8に示す。すべての表面粗度において、15日以降は変動が小さくなり、定常期に達した。増殖期における試験片表面の微生物増加速度は、すりガラス320# > すりガラス180# > 透明ガラスの順になり、表面の凹凸が多いほど微生物膜は速く増殖した。透明ガラスの試験片表面では通水開始直後(0~2日目)は一般細菌の増殖がみられないが、これは表面が滑らかであるために微生物膜を形成する微生物が付着しづらく

表. 2 流入水の水質

(平均値、1/30~2/12に測定)

水温	20.0℃
pH	7.57
TOC	1.94mg/L
NO ₃ -N	2.9mg/L
NO ₂ -N	0.006mg/L
PO ₄	0.21mg/L

増殖期に入るまでに時間がかかるためと思われる。一旦増加が始まると他の系統と同様に増加している。定常期(15~23日)における試験片表面の微生物密度はすりガラス320# > すりガラス180# > 透明ガラスの順になった。定常期における試験片表面の一般細菌密度は、すりガラス320#が $8.3 \times 10^5 \sim 2.1 \times 10^6$ CFU/cm²、すりガラス180#が $2.5 \times 10^4 \sim 3.9 \times 10^5$ CFU/cm²、透明ガラスが $9.4 \times 10^3 \sim 7.4 \times 10^4$ CFU/cm²であった。定常期における試験片表面の従属栄養細菌密度は、一般細菌に比べて変動幅が小さく、すりガラス320#は $2.8 \times 10^6 \sim 4.0 \times 10^6$ CFU/cm²、すりガラス180#は $1.3 \times 10^5 \sim 4.8 \times 10^5$ CFU/cm²、透明ガラスで $2.5 \times 10^4 \sim 7.1 \times 10^4$ CFU/cm²となった。流出水中の一般細菌濃度および従属栄養細菌濃度を図. 9および図. 10に示す。いずれの流出水においても通水開始当初より増加し始め10日前後で定常期に達した。増殖期(2日目)においては、一般細菌濃度、従属栄養細菌濃度ともに、すりガラス320# > すりガラス180# > 透明ガラスの順になり、試験片表面の微生物密度が高い程、微生物増加速度が速く、流出水中の微生物濃度も高くなっていた。一方、定常期(9~23日)における流出水中の微生物濃度は、表面粗度の違いによる影響を受けず、一般細菌濃度は、すりガラス320#が $8.4 \times 10^3 \sim 4.4 \times 10^4$ CFU/ml、すりガラス180#が $9.9 \times 10^3 \sim 5.3 \times 10^4$ CFU/ml、透明ガラスが $1.3 \times 10^4 \sim 1.1 \times 10^5$ CFU/ml、従属栄養細菌濃度は、すりガラス320#が $9.7 \times 10^4 \sim 1.8 \times 10^5$ CFU/ml、すりガラス180#が $2.9 \times 10^4 \sim 2.8 \times 10^5$ CFU/ml、透明ガラスが $3.0 \times 10^4 \sim 2.3 \times 10^5$ CFU/mlであった。試験片の表面粗度は、定常期に達した後の流出水中の微生物濃度に対してはあまり影響がないと考えられる。

23日目に遊離塩素濃度を0.9~1.3mg/Lに上げ1日通水したところ、試験片表面の一般細菌密度は最高5桁程度、従属栄養細菌密度は最高3桁程度下がったが、36日目に遊離塩素濃度を0.7mg/Lに上げ2日間通水したときは、一般細菌密度が最高4桁程度、従属栄養細菌密度が最高2桁しか下がらず、高い濃度で消毒した方が効果的であった。流出中の微生物に対する消毒効果

についても同様であり、0.9~1.3mg/Lで1日通水したときは一般細菌濃度が最高4桁程度、従属栄養細菌密度が最高3桁程度下がったのに対し、0.7mg/Lに上げ2日間通水したときは、一般細菌密度と従属栄養細菌密度ともに最高2桁程度しか下がらなかった。

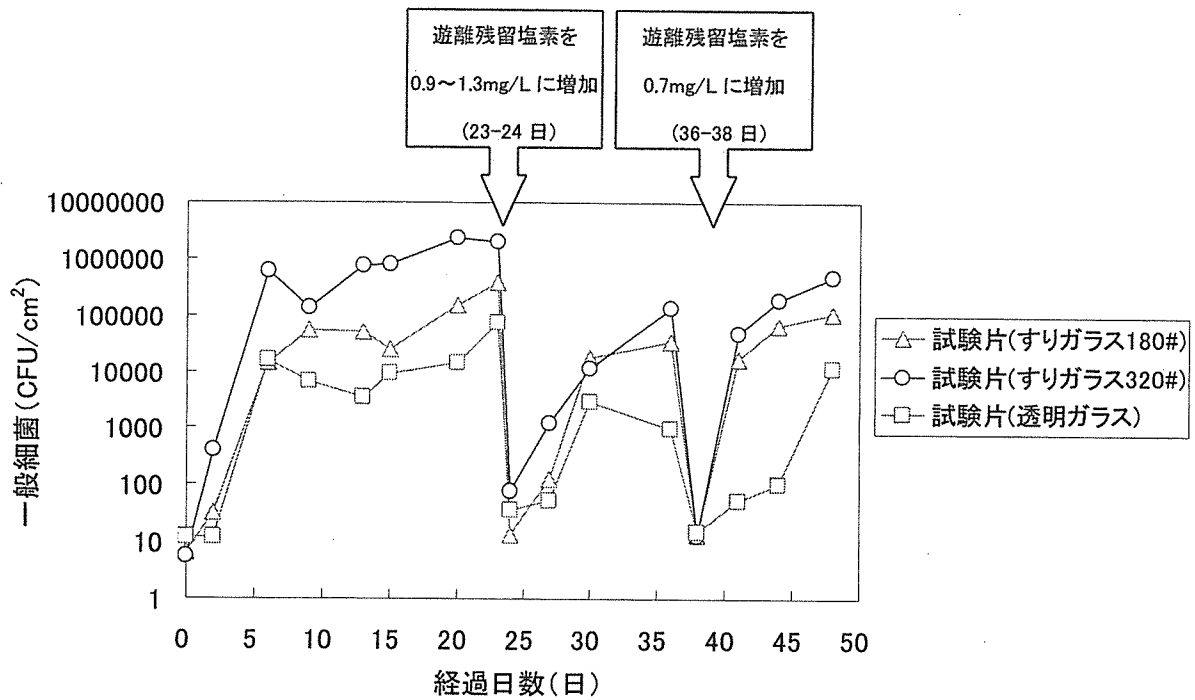


図. 7 一般細菌経日変化(試験片表面)

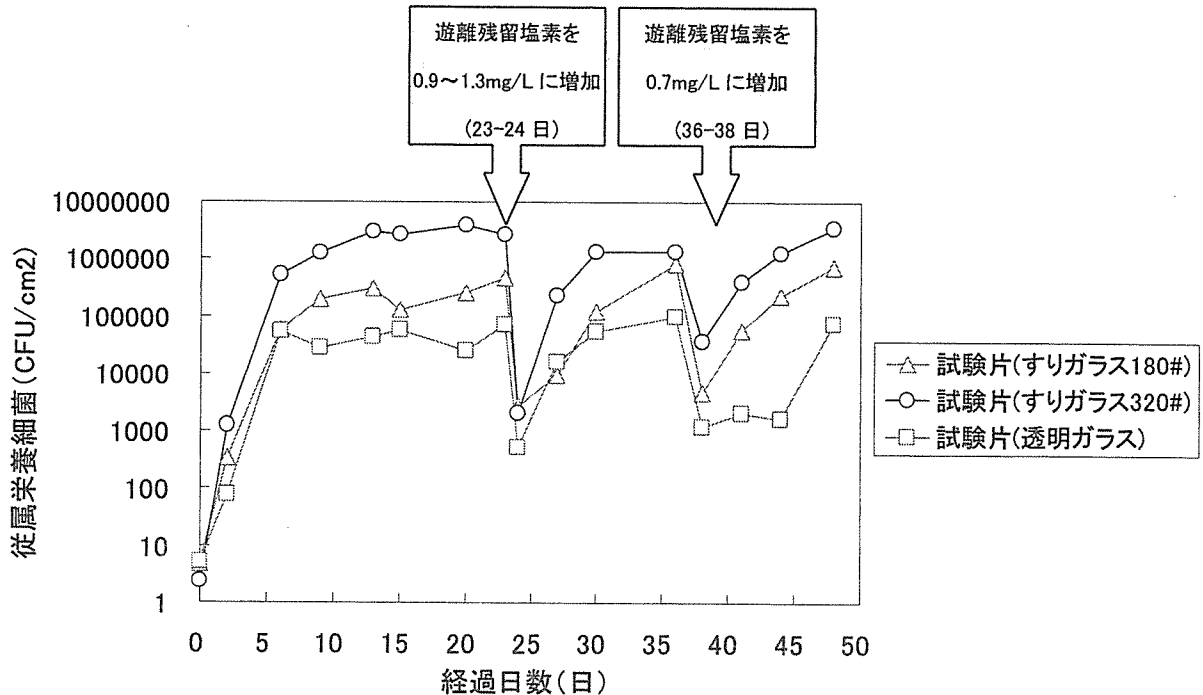


図. 8 従属栄養細菌経日変化(試験片表面)

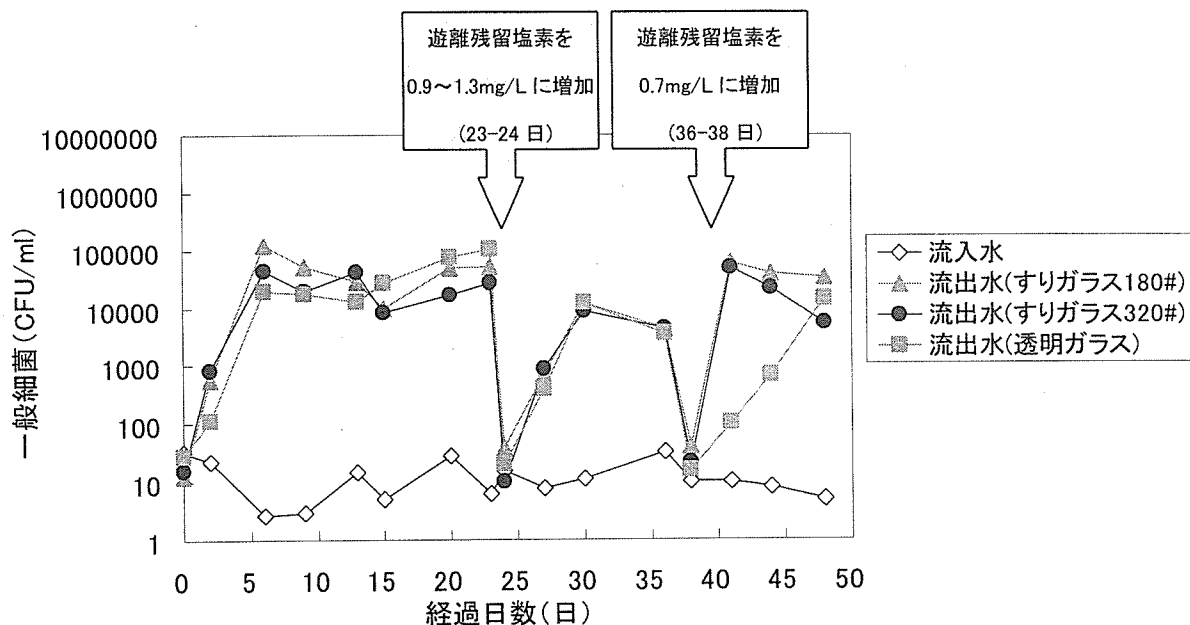


図. 9 一般細菌経日変化(流入水・流出水)

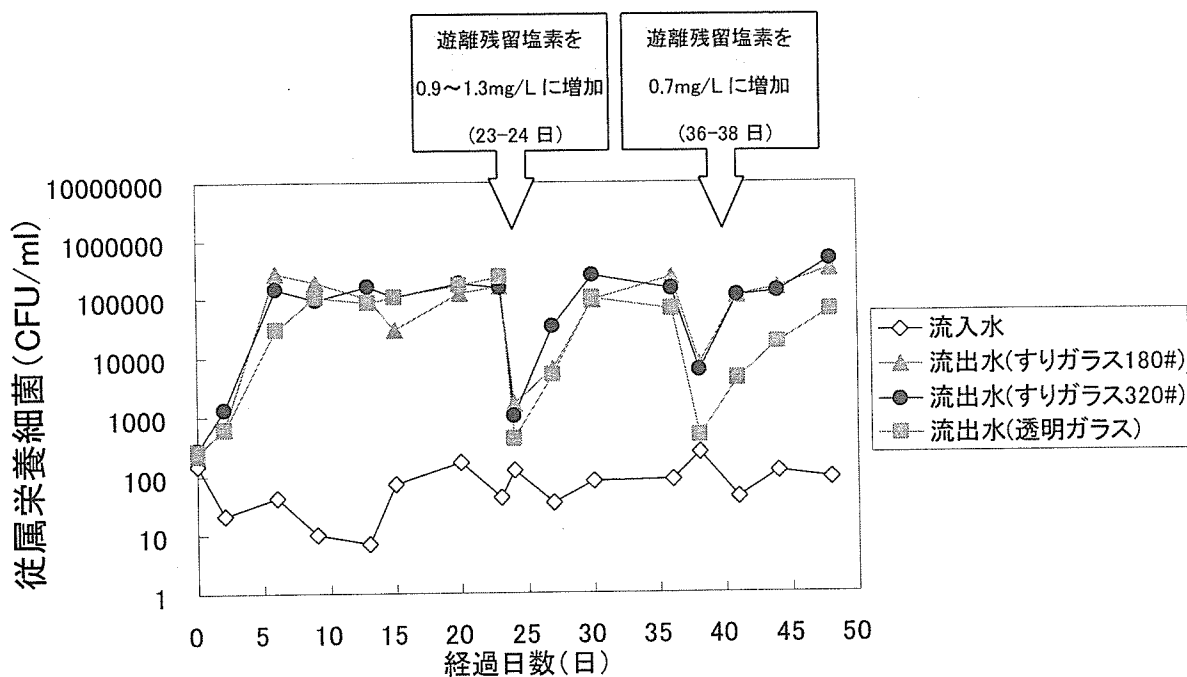


図. 10 従属栄養細菌経日変化(流入水・流出水)

D. 結論

1. 残留塩素濃度による微生物再増殖性の相違

水道水中における残留塩素の有無や濃度にかかわらず、試験片上の細菌付着量はいずれも通水開始後 15~20 日間で定常状態に達することが示された。ただし当研究で用いた水道水は、AOC やリン酸が高濃度であり微生物学的安定性が低い（微生物の再増殖性が高い）点に留意する必要がある。

試験片上の細菌付着密度は、残留塩素が高濃度であるほど低下した。一般細菌と従属栄養細菌の密度を比較すると、従属栄養細菌の方が残塩による細菌密度減少の程度が小さい為、一般細菌よりも残留塩素に対する耐性が比較的強い細菌叢が形成されていると考えられる。

一時的な残留塩素濃度の上昇に対して、残留塩素なしの系で増殖した生物膜の感受性は高く、大幅に細菌密度が低下した。一方、残留塩素が存在する系ではほとんど影響は見られず、塩素の変動に対する耐性を持つことが示された。ただし残留塩素濃度を元に戻した後、残留塩素なしの系では速やかに元の細菌密度まで回復した。培地での増殖性を失う程度に損傷していた可能性や、試験片表面に残存する有機物を基質として急速に再増殖した可能性が考えられる。

流出水中の細菌数は、試験片上の細菌付着密度と同様の傾向を示し、残留塩素が高濃度であるほど低下した。特に一般細菌では、残留塩素が存在する場合には流入水との差がほとんど観察されず、生物膜からの流出が抑えられることが示された。しかし従属栄養細菌はいずれの残留塩素濃度でも流入水より増加しており、試験片上と同様に、残留塩素に対する耐性が比較的強い細菌叢であることが示された。

2. 表面粗度による微生物再増殖性の相違

一般細菌、従属栄養細菌ともに、試験片の表面粗度が細かいほど（すなわち表面の凹凸が多いほど）細菌の増殖速度は速くなり、また定常期における細菌密度も高まった。各試験片の表面積の相違や、表面近傍での水流による剪断応力の相違により差が生じたと考えられる。一方、流出水中の細菌濃度は表面粗度の影響を受けず、いずれも同程度のオーダーであった。

形成された生物膜に対して異なる残留塩素濃度および通水期間による消毒効果を比較したところ、短期間であっても高濃度の残留塩素で消毒を行った場合に、細菌密度がより大きく低下した。再び残留塩素を消去すると一般細菌数、従属栄養細菌数ともに速やかに回復したが、透明ガラス片の場合のみ回復に数日から一週間程度の遅れが生じることが観察され、消毒剤の通水による生物膜制御に有利となる可能性が示唆された。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

(該当なし)

2. 学会発表

- 1) 高井正子, 島崎大, 国包章一(2007) 配水過程における微生物再増殖に及ぼす残留塩素濃度の影響, 第58回全国水道研究発表会(発表予定).

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

1. 論文発表

- 1) Itoh, S., Nakano, A., and Araki, T. (2006) Reevaluation of the toxicity of chlorinated water and the usefulness of MX as an index, *Journal of Water and Health*, 4, pp. 523-531.
- 2) 廣戸裕子, 大瀧雅寛 (2006) 流水式紫外線照射装置における一般細菌を用いた生物線量計の実用性, *用水と廃水*, Vol.48, No.11, pp.989-993.
- 3) Itoh, S., Murakami, H., Fukuhara, M., and Nakano, A. (2007) Limitations of chlorine dioxide as an alternative disinfectant in comparison with chlorine from the viewpoint of mutagenicity, *Journal of Water Supply: Research and Technology-AQUA*, 56 (2), pp. 95-104.
- 4) 廣戸裕子, 神子直之, 大瀧雅寛, 久保田俊夫, 岩崎達行 流水式紫外線消毒装置における装置形状の消毒効果へ及ぼす影響, *水環境学会誌* (投稿中) .

2. 学会発表

- 1) 大河内由美子, 高橋恭介, 小寺恵介, 伊藤禎彦 (2006)環境水中のエンドトキシン検出と塩素処理による微生物細胞からの生成評価, *京都大学環境衛生工学研究会第28回シンポジウム講演論文集*, p. 181-184.
- 2) 廣戸裕子, 大瀧雅寛, 2006「流水式UV装置における生物線量計としての一般細菌の妥当性」第40回日本水環境学会年会講演集, pp.426.
- 3) 高橋恭介, 小林憲太郎, 大河内由美子, 伊藤禎彦 (2007)表皮角化細胞を用いた水中エンドトキシンの毒性評価, *第41回日本水環境学会年会講演集*, p. 213.
- 4) 大河内由美子, 石川卓, 高橋恭介, 伊藤禎彦 (2007)浄水処理過程における微生物およびその由来物質の挙動に関する研究, *第58回全国水道研究発表会* (発表予定) .
- 5) 高井正子, 島崎大, 国包章一(2007) 配水過程における微生物再増殖に及ぼす残留塩素濃度の影響, *第58回全国水道研究発表会* (発表予定) .
- 6) 西村和之, 国包章一(2007) 流出クリプトスポリジウム・オーシスト量算出のための予備的調査, *第58回全国水道研究発表会* (発表予定) .

研究成果の刊行物・別刷

Reevaluation of the toxicity of chlorinated water and the usefulness of MX as an index

Sadahiko Itoh, Atsushi Nakano and Toshiaki Araki

ABSTRACT

Changes in the toxicity in chlorinated water after chlorine addition were examined. For toxicity evaluation, the chromosomal aberration test and the transformation test were conducted as indexes of initiation activity and promotion activity, respectively, in the carcinogenesis process. Activity inducing chromosomal aberrations in chlorinated Lake Biwa water gradually decreased over time after chlorination. In contrast, activity inducing transformations determined by the two-stage assay gradually increased. Thus, toxicity that decreases or increases is present in chlorinated water. Furthermore, activity inducing transformations determined by the non-two-stage assay gradually decreased over time. This direction of change is opposite to that of activity inducing transformations determined by the two-stage assay and is consistent with that of activity inducing chromosomal aberrations. The drastic decrease in initiation activity detected as activity inducing chromosomal aberrations could be the main cause for the decrease in activity inducing transformations determined by the non-two-stage assay (an index of the sum of initiation and promotion activity). MX change was quantitatively consistent with those of activity inducing chromosomal aberrations and transformations determined by the non-two-stage assay. On the other hand, directions of changes in concentrations of typical by-products such as chloroform were consistent only with that of activity inducing transformations determined by the two-stage assay. Findings of this study suggest that MX is appropriate as an index for comparing the carcinogenicity of tap water near and far from a water purification plant.

Key words | chlorination, chromosomal aberration test, disinfection by-products, MX, transformation test

Sadahiko Itoh (corresponding author)
Department of Urban Management,
Kyoto University, Sakyo-ku,
Kyoto 606-8501,
Japan
Tel.: +81 75 753 5152,
Fax: +81 75 753 5153
E-mail: itoh@urban.env.kyoto-u.ac.jp

Atsushi Nakano
TOHO GAS Co, Ltd.,
19-18 Sakurada-cho, Atsuta-ku
Nagoya 456-8511,
Japan

Toshiaki Araki
Murata Manufacturing Co., Ltd.,
2-26-10, Tenjin, Nagaokakyo 617-8555,
Japan

INTRODUCTION

In general, concentrations of trihalomethanes and haloacetic acids in chlorinated drinking water increase in water distribution systems. This strongly suggests that the toxicity of disinfected water is not stable and changeable. From this viewpoint, the change in the toxicity of chlorinated humic acid after chlorine injection has been examined by authors (Itoh *et al.* 2001). For the measurement of toxicity, *in vitro* bioassays as indexes in the carcinogenesis process were carried out. A chromosomal aberration test using Chinese hamster lung cells was carried out as an index to initiation

activity, and a transformation test using mouse fibroblast cells was carried out as an index to promotion activity.

As a result, it was found that activity inducing chromosomal aberrations in chlorinated humic acid gradually decreased over time after chlorination. In contrast, activity inducing transformations gradually increased. Thus, toxicity that decreases or increases is present in chlorinated water. Since typical by-products such as trihalomethanes and haloacetic acids increase after chlorination, it is widely believed that the toxicity of drinking water also increases.

We have pointed out, however, that it might be early to conclude that the toxicity of drinking water increases in water distribution systems.

In this study, MX (3-Chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5H)-furanone) known as a strong mutagen is focused on in addition to typical chlorination by-products. MX has received much attention because of the strong genotoxic activity. After Komulainen *et al.* (1997) reported the carcinogenic potency of MX in rat, the necessity of the water quality management of MX has been discussed (Melnick *et al.* 1997; Hirose *et al.* 1999).

In addition, it has been found that MX is unstable in water and reacts with residual chlorine (Meier *et al.* 1987; Kinae *et al.* 1992). This means that a concentration of MX might decrease after it is formed by chlorine. This direction of change is in reverse to those of concentrations of trihalomethanes and haloacetic acids. A problem is which of these carcinogenic by-products is appropriate as an index of the change of the toxicity of chlorinated water. In the previous study (Itoh *et al.* 2001), experiments were conducted using commercial humic acid as the first step. Natural water was used in this study in order to propose an appropriate index for comparing the toxicity of chlorinated drinking water in distribution systems.

MATERIALS AND METHODS

Chlorination and concentration of Lake Biwa water

Lake Biwa is the largest lake in Japan and also the major water source for 14 million people in Kansai area in Japan. The surface water of Lake Biwa was used in this study. Lake Biwa water filtered with a 1.0 μm membrane filter of which DOC (dissolved organic carbon) was 1.9 mg l^{-1} was chlorinated at an initial concentration of 2.0 mg l^{-1} . Sodium hypochlorite stock solution (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) was used for chlorination. Available chlorine in the stock solution was analyzed by the DPD ferrous titrimetric method (APHA/AWWA/WEF 1998) just prior to use. The chlorination proceeded at 20°C in a dark room. The pH was not adjusted, however, it was maintained at 7.4 to 7.8 during the chlorination. Residual chlorine was detected during the chlorination, however, dechlorination

was not carried out so as not to change the activity inducing chromosomal aberrations and transformations in chlorinated waters. It was confirmed that the trace residual chlorine had no influence on bioassays.

Organic matters in a sample water were concentrated by adsorption and desorption method using Sep-Pak Plus(Long) CSP800 (Nihon Waters K.K.) resin according to the procedure described by Urano *et al.* (1994). 20 l of a sample water adjusted at pH 2 was fed to CSP800 cartridges at a flow rate of 50 ml min^{-1} . The adsorbed substances were desorbed by DMSO (dimethylsulfoxide). The final volume of DMSO was 2 ml, and the concentration factor was 10000 times.

Chromosomal aberration test

Chinese hamster lung cell (CHL/IU) was obtained from Dainihon Pharmaceutical Co., Ltd. Cells were cultured with Eagle's MEM (Nissui Pharmaceutical Co., Ltd) supplemented with 10% fetal bovine serum (Gibco Oriental Co., Ltd). CHL culture was grown in 12 ml media, in a glass silicon-capped bottle. 0.06 ml of a concentrated solution in DMSO was added to a 1-day-old culture. As a result, a concentration of DMSO in the media was 0.5%. Bacteria in a sample were eliminated by a 0.22 μm filter. Only activity inducing chromosomal aberrations without activation was measured in this study. Chromosome preparation was made after 24 hours culturing of the addition (Sofuni 1999).

The previously developed image analysis was used to objectively evaluate results of chromosomal aberration test (Itoh *et al.* 1992). The shapes of chromosomes were analyzed by an image analyzer (Image-Pro Plus Ver4.0). Chromosomal aberrations can be divided into broken-type and exchanged-type. Exchanged-type aberrations are detected by the developed method. 50 metaphases in a specimen were analyzed. As a CHL cell has 25 chromosomes, 1250 of chromosomes were analyzed by each specimen. Image analysis of negative control gave a mean of 4.5 chromosomes/50 metaphases and a standard deviation of 2.6. Activity inducing chromosomal aberrations is expressed as a mean value of test results of triplicate specimens.

When activity inducing chromosomal aberrations of certain chemical has to be judged, and when a test result has

to be compared with data obtained by other laboratories, the standard method (Sofuni 1999) should be used and the method developed by ourselves cannot be used. The developed method is effective in order to compare the relative intensity of activity inducing chromosomal aberrations only in this study.

Transformation test

The *in vitro* cell transformation assay utilizing BALB/3T3 A31-1-1 cells (Japan Health Sciences Foundation) was carried out as an indicator of tumor-promotion activity. The standard method of transformation test using BALB/3T3 cells had been established by IARC/NCI/EPA Working Group (1985), however, it has been improved by Tsuchiya and Umeda (1995) to enhance transformation frequency and shorten the culture period. Culture conditions of the assay in this study followed the procedure described by Tsuchiya and Umeda (1995). 3-methylcholanthrene (3-MC) was used to induce DNA lesions in the cells as the initiation step. The cells were treated with 0.5 mg l^{-1} of 3-MC for two days. After the initiation, 0.015 ml of a concentrated solution was added to the cells cultured in 6 ml media. As a result, a concentration of DMSO in the media was 0.25%. This testing method is called the two-stage transformation assay, since a chemical or a sample is given to the cells in two steps. Only activity inducing transformations without activation was measured.

In contrast, in the case of the non-two-stage transformation test, a sample is added from the beginning without adding 3-MC. The assay is completed by the continuing addition of a sample. This testing method is useful for measuring the toxicity including genotoxicity of a sample.

The image analysis was also used for detecting transformed foci (Sumitomo *et al.* 1998). Since this method is not the standard method of transformation test, it is effective to compare the relative intensity of activity inducing transformations only in this study. More than 100 colonies were analyzed by each specimen. Image analysis of negative control cells initiated with 3-MC gave a mean of 3.2% transformation foci and a standard deviation of 0.5%. Image analysis of negative control cells without 3-MC in the non-two-stage transformation assay gave a mean of 1.1% transformation foci and a standard deviation of 0.2%.

Transformation efficiency is expressed as a mean value of test results of triplicate specimens.

Assays of chemicals

Chromosomal aberration tests and transformation tests of some chemicals including chlorination by-products were carried out. 14 chemicals that are suspected to have initiation and/or tumor-promotion activity were selected from review papers (Ishidate *et al.* 1988; Sakai *et al.* 1993; Budunova & Williams 1994; Sofuni 1999). When ethyl alcohol and DMSO were used to dissolve a chemical, the final concentrations of ethyl alcohol and DMSO are needed less than 1% and 0.5%, respectively, in the media. It has been confirmed that ethyl alcohol and DMSO do not influence the chromosomal aberration test up to concentrations of 1% and 0.5%, respectively (Sofuni 1999). No influence was confirmed in the transformation test either.

Analytical procedures

Chloroform was extracted with hexane, and the concentration was determined by a gas chromatograph with an electron capture detector (GC-ECD, Shimadzu GC-14B) using a $2 \text{ m} \times 2.6 \text{ mm}$ i.d. column packed with silicone GE SE-30 on Chromosorb W AW-DMCS 80/100 mesh. The usual operating conditions were as follows. The injector temperature was 150°C . The column oven temperature was initially held at 70°C for 3 min, ramped to 145°C at $15^\circ\text{C min}^{-1}$, and held at 145°C for 2 min. The detector temperature was 200°C . Haloacetic acids were methylated with diazomethane and analyzed by a GC-ECD. TOX (total organic halides) was measured by a TOX-10 Σ analyzer (Mitsubishi Chemical Corporation). TOC (total organic carbon) was measured by a TOC-5000A analyzer (Shimadzu).

Measurement of MX

20 l of a sample water adjusted at pH 2 was fed to CSP800 cartridges at a flow rate of 30 ml min^{-1} . The adsorbed substances were desorbed by 15 ml of ethyl acetate at a flow rate of 0.3 ml min^{-1} . The eluate was concentrated to $200 \mu\text{l}$ after the addition of mucobromic acid (MBA) as the

internal standard. 100 μl of BSTFA + 1% TMCS (N,O-bis(Trimethylsilyl)trifluoroacetamide with 1% Trimethylchlorosilane, PIERCE) was added to derivatize MX in the residue. This solution was concentrated to 200 μl for the analysis by a gas chromatograph (Agilent, 6890plus) with a mass spectrometer (JOEL, JMS-AX505). 40 μl of the sample was injected by multiple injection ($2\ \mu\text{l} \times 20$) with the programmed temperature vaporizing (PTV) mode. The gas chromatography column was a DB-5 capillary column (15 m \times 0.25 mm i.d., 0.25 μm film thickness, J&W Scientific). The injector temperature was 78°C (10.5 min) \rightarrow 720°C min⁻¹ 200°C (21 min), and the column oven temperature was 80°C (10.5 min) \rightarrow 6°C min⁻¹ \rightarrow 200°C (0 min) \rightarrow 25°C min⁻¹ \rightarrow 250°C (2 min). The $m/z = 135, 273, 275$ ions were selected for TMS-MX and the $m/z = 313, 315, 317$ ions for TMS-MBA analyses.

RESULTS AND DISCUSSION

Result of bioassays of chlorinated Lake Biwa water

Figure 1 shows the result of bioassays of Lake Biwa water after the addition of chlorine. The residual chlorine after four days was 0.8 mg l⁻¹, and pH was maintained at 7.4 to 7.8 during the chlorination. Activity inducing chromosomal aberrations of Lake Biwa water was produced by chlorine, however, it was unstable and gradually decreased over time

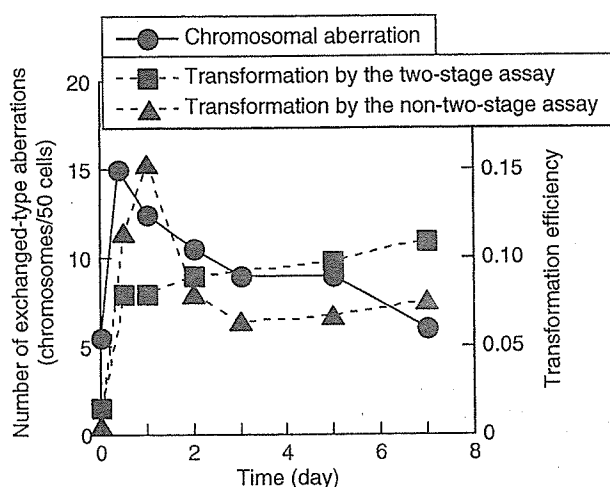


Figure 1 | Activity inducing chromosomal aberrations and transformations of chlorinated Lake Biwa water.

after chlorination. In contrast, activity inducing transformations measured by the two-stage assay gradually increased. Thus, the toxicity that decreases or increases is present in chlorinated water.

In addition to these two kinds of assays, the non-two-stage transformation test, which is useful for measuring the whole toxicity including genotoxicity of a sample, was carried out. Figure 1 shows activity inducing transformations measured by the non-two-stage assay gradually decreased. This direction of change was reverse to that of activity inducing transformations by the two-stage assay and consistent with that of activity inducing chromosomal aberrations. The non-two-stage transformation test can detect the toxicity including initiation and promotion step. It is important to note that the index of the sum of initiation and promotion activity gradually decreases. These results are qualitatively consistent with those in the case of commercial humic acid conducted by authors (Itoh *et al.* 2001).

Comparison with activity of some chemicals

Figure 2 shows activity inducing chromosomal aberrations and transformations measured by the two-stage assay of 15

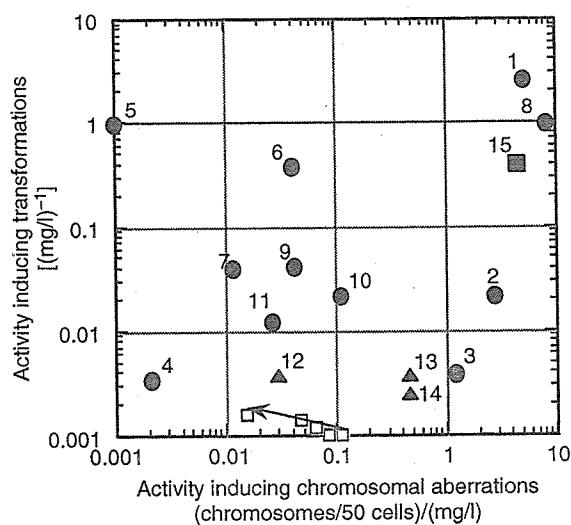


Figure 2 | Relationship between activity inducing chromosomal aberrations and transformations. Activity inducing transformations were measured by the two-stage assay. ($\square \rightarrow \square$) change of activity of chlorinated Lake Biwa water. 1, 4-NQO; 2, quercetin; 3, 5-fluorourasil; 4, sodium nitrite; 5, TPA; 6, mezelein; 7, BHA; 8, 3-MC; 9, teoferin; 10, urea; 11, caffeine; 12, chloroform; 13, dichloroacetic acid; 14, trichloroacetic acid; 15, MX.

tested chemicals including MX. The horizontal axis shows activity inducing chromosomal aberrations expressed as (chromosomes/50 cells)/(mg l⁻¹), and the vertical axis shows activity inducing transformations expressed as (mg l⁻¹)⁻¹. mg l⁻¹ in these units means the weight per liter of the 15 tested chemicals in the culture media and TOC of Lake Biwa water before chlorination.

The change in activity inducing chromosomal aberrations and transformations by the two-stage assay of chlorinated Lake Biwa water shown in Figure 1 is plotted in Figure 2. The toxicity changed in the direction of the arrow. Firstly, it was found that activity inducing chromosomal aberrations of chlorinated water is relatively stronger than activity inducing transformations, when the plotting position of initial chlorinated water (the initial point of the arrow) is compared with those of other chemicals. Secondly, activity inducing chromosomal aberrations decreases sharply, while activity inducing transformations increases slightly.

Since the chromosomal aberration test and transformation test are carried out as indexes to initiation activity and promotion activity, respectively, it appears that initiation activity in chlorinated water is stronger than promotion activity. It also seems that initiation activity of chlorinated water decreases sharply and promotion activity increases slightly. It is assumed that the decrease of activity inducing transformations measured by the non-two-stage assay shown in Figure 1 can be attributed to this reason.

This phenomenon is illustrated in Figure 3. The increasing toxicity (promotion activity) is present in chlorinated water, however, initiation activity drastically

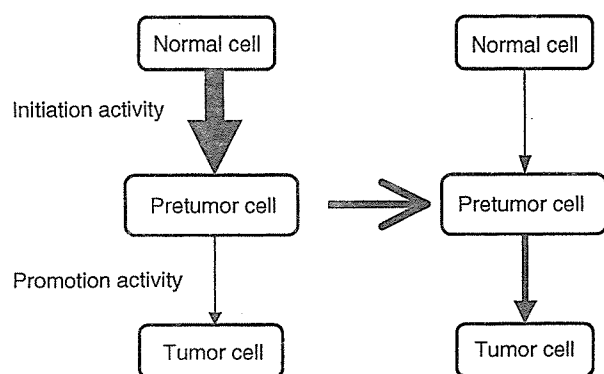


Figure 3 | Proposed change of the toxicity of chlorinated water.

decreases. Since the toxicity of water is measured by *in vitro* assays in this study, it is not possible to get a conclusion on the change of toxicity on the human body. However, it should be noted that the whole toxicity associated with carcinogenic activity can be mainly attributed to initiation activity and presumably decreases over time after chlorination.

Changes of typical by-products and MX

Figure 4 shows changes in concentrations of chlorination by-products and TOX. All by-products and TOX increased after chlorine injection. These directions of changes of typical by-products are consistent only with that of activity inducing transformations by the two-stage assay and reverse to those of activity inducing chromosomal aberrations and transformations by the non-two-stage assay. By-products shown in Figure 4 are widely measured, however, they would not be appropriate as indexes to compare the toxicity of chlorinated drinking water in distribution systems.

In contrast, Figure 5 shows the change in concentration of MX. It was found that MX decreases over time after it is formed by chlorine. This decrease could be attributed to hydrolysis and the reaction of MX with residual chlorine (Meier *et al.* 1987; Kinae *et al.* 1992). Figures 1 and 5 show that the change of MX is qualitatively consistent with those of activity inducing chromosomal aberrations and

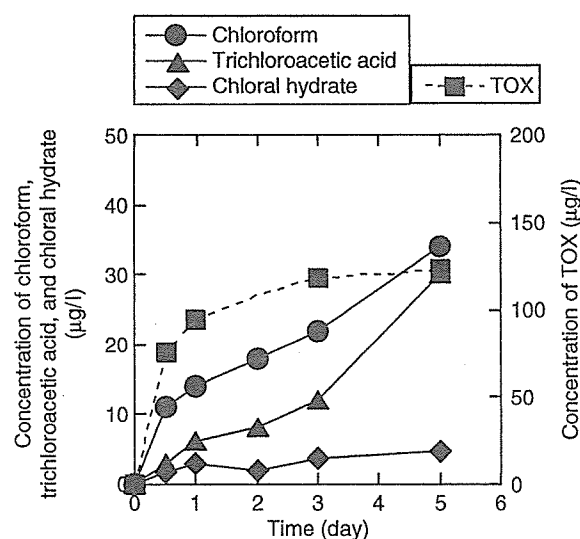


Figure 4 | Concentrations of by-products in chlorinated Lake Biwa water.

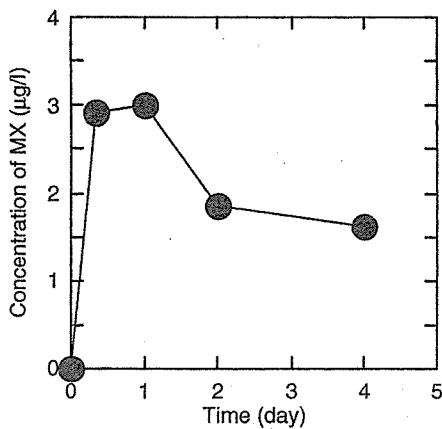


Figure 5 | Concentration of MX in chlorinated Lake Biwa water.

transformations by the non-two-stage assay. This suggests that MX can be one of the indexes for the toxicity detected by these bioassays.

Behavior of MX in water

The stability and the toxicity change of MX in distilled water and chlorine aqueous solution were examined. The MX aqueous solution in a phosphate buffer of 67 mM at pH 7.0 was treated with chlorine. The chlorination proceeded at 20°C in a dark room. Figure 6 shows the change in concentration of MX. It shows MX decreases slightly even in water without chlorine, and the decreasing rate of MX increases with increasing chlorine added to the solution.

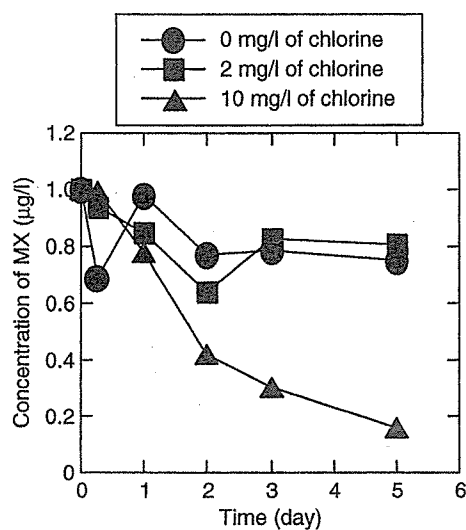


Figure 6 | Change of concentration of MX in water and chlorinated water.

Figure 7 shows the change in activity inducing chromosomal aberrations of MX after chlorine was added to the MX aqueous solution. It shows that activity inducing chromosomal aberrations of MX decreases slightly even in water without chlorine, and it decreases gradually after chlorine is added to the solution. This change is almost correspondent to the change of MX concentration shown in Figure 6. It is reasonable to suppose that activity inducing chromosomal aberrations of MX decreases while MX is decomposed by reacting with residual chlorine.

The usage of MX as an index

To evaluate the usage of MX as an index, reaction rates of changes in the toxicity and the concentration of MX are determined. Decreasing rate constant k for MX is given by assuming first-order reaction at the initial stage after reaching the maximum.

$$\frac{dC}{dt} = -kC \quad (1)$$

where C is concentration of MX (ngl^{-1}), t is reaction time (day), and k is decreasing rate constant (day^{-1}). Decreasing rate of MX was taken as the slope of the decrease in Figure 5, and calculated constant k was 0.19 day^{-1} . Subsequently, decreasing rate constants were calculated with Figure 1, by replacing C in the equation (1) with results of bioassays. Obtained observed rate constants of activity

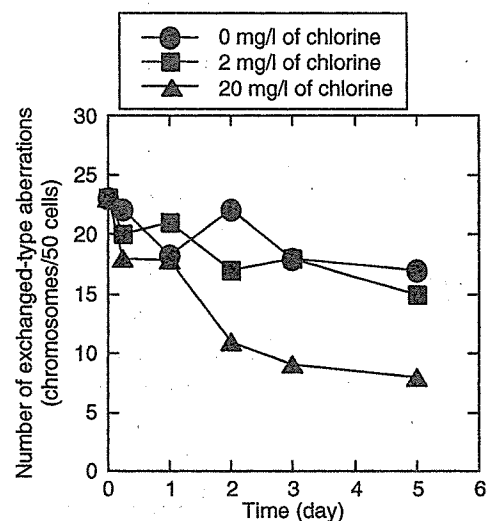


Figure 7 | Change of activity inducing chromosomal aberrations of MX in water and chlorinated water.