

表-1 琵琶湖淀川水系におけるエンドトキシン調査結果

地点No.	水系	採水地点	採水日	総エンドトキシン (EU/mL)	遊離エンドトキシン (EU/mL)	遊離エンドトキシン比率
E-1	琵琶湖南湖	大津港	2005.12.19	4.28×10 ²	2.20×10 ²	0.514
E-2	琵琶湖南湖	なぎさ公園	2005.12.19	3.31×10 ²	2.30×10 ²	0.695
E-3	琵琶湖南湖	矢橋	2005.12.19	2.43×10 ³	3.30×10 ²	0.136
E-4	瀬田川	瀬田唐橋	2006.2.9	3.11×10 ²	2.25×10 ²	0.723
E-5	宇治川	宇治橋	2006.2.9	3.11×10 ²	1.92×10 ²	0.617
E-6	木津川	三川合流地点	2005.12.27	6.21×10 ²	1.77×10 ³	>1
E-7	宇治川	三川合流地点	2005.12.27	2.03×10 ³	8.26×10 ²	0.407
E-8	桂川	三川合流地点	2006.3.21	1.80×10 ³	4.80×10 ²	0.267
E-9	淀川	枚方大橋	2005.12.27	1.51×10 ³	2.87×10 ²	0.19
E-10	淀川	豊里大橋	2006.1.23	3.40×10 ²	2.50×10 ²	0.735
S-1	琵琶湖第一疏水	洛東高校前	2006.2.9	6.27×10 ²	1.18×10 ³	>1
S-2	琵琶湖疏水	蹴上	2006.1.11	1.55×10 ²	1.82×10 ²	>1
S-3	疏水分線	若王子橋	2006.1.11	1.46×10 ²	1.77×10 ²	>1
S-4	疏水分線	一乗寺西橋	2006.1.11	1.16×10 ²	2.95×10 ²	>1
S-5	琵琶湖疏水	冷泉橋	2006.1.11	2.57×10 ²	1.94×10 ²	0.755
A-1		下水処理場放流水	2005.12.16	1.08×10 ⁴	1.26×10 ³	0.117

の循環利用を推進していく上では、生菌数のみならずエンドトキシンなどの微生物由来化学物質にも着目して微生物管理を行うことが不可欠と考えられる。

ここで、2. (2) で述べた異なる3手法を用いて計数した各試料の微生物計数結果に基づいて、微生物数計数結果と総エンドトキシンの関係を図-4に示す。いずれの試料においても、標準平板培地 < R2A 平板培地 < DAPI 蛍光染色の順に微生物検出量が増大した。しかし、微生物検出数が増大するにつれて、総エンドトキシンも増大する傾向にあるものの、明確な相関は認められなかった。このように、エンドトキシンは VBNC 微生物も含めた"微生物汚染の可能性"を示す指標として有用である反面、水中微生物量の定量的指標として代用することは困難であると考えられる。その理由として、環境水中には VBNC 微生物を始めとした種々の微生物(LPS

構造を持たないグラム陽性細菌を含む)が共存しており、微生物種ごとにエンドトキシン活性を左右する Lipid A の組成が異なる¹³⁾点が挙げられる。

さらに、DAPI 蛍光染色による全菌数測定結果に基づいて、環境試料 (10⁶ cell/mL) 中の微生物一細胞当たりエンドトキシン量を試算すると、5.37 × 10⁻⁴ EU/cell となった。前項で検討を加えた *E. coli* NBRC 3301 の一細胞当たりエンドトキシン量は、10⁶ cell/mL の場合には 1.47 × 10³ EU/cell と算出されることから、環境水中の微生物群に起因する一細胞当たりのエンドトキシンは大腸菌の 37% 程度と比較的高い値を示すことが明らかとなった。この全菌数測定結果には、ピコ植物プランクトン等の小型シアノバクテリア (長径 3 μm 以下) も含まれているが、本調査は冬季に実施したため、ピコ植物プランクトン数は非常に低い値で推移しており、検出されたエンドトキシン活性はほぼグラム陰性細菌に由来すると考えられる。既存の調査研究結果からは HPC の明確な季節変動は確認できず¹⁰⁾、むしろ降雨などの気象条件や、前述した下水処理施設放流口の位置といった採水地点などの要因に大きく影響されるため、本研究ではグラム陰性細菌によるエンドトキシンの季節的な変動は考慮せず、高温期のピコ植物プランクトンの大量発生に由来するエンドトキシン量の増大について検討を加える。

今回の調査ではピコ植物プランクトンの実測を行っていないため、以下では報告されている瀬田川における測定値¹⁵⁾に基づいて試算を行う。本研究で採水を行った2月にはピコ植物プランクトンは平均 5.7 × 10³ cell/mL であったのに対して、8月には 4.9 × 10⁵ cell/mL とピークに達している。ここで、ピコ植物プランクトンが全て *Synechococcus* sp. であると仮定して、前節で算出した

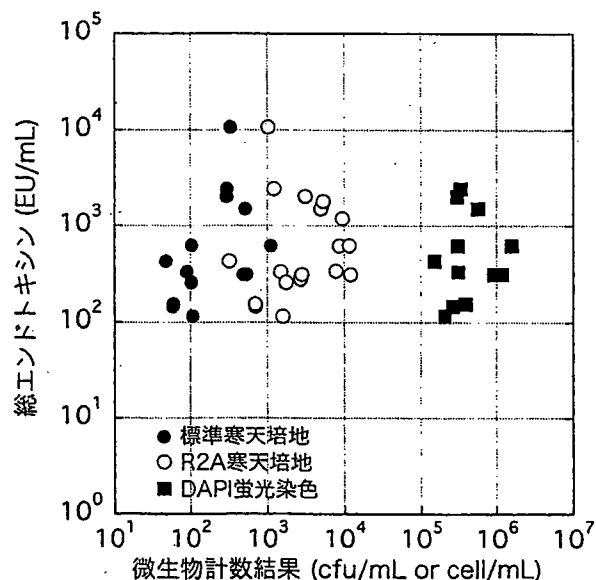


図-4 環境微生物数と総エンドトキシン量の関係

Synechococcus sp. NIES-946 の回帰式 (1c) を用いると、*Synechococcus* sp. に由来するエンドトキシン量は 0.430 EU/mL (2月), 50.5 EU/mL (8月) とそれぞれ試算された。なお、淀川中流域におけるピコ植物プランクトン実測値も、高温期には 10^5 cell/mL を超える濃度で検出されており¹⁶⁾、湖沼のみならず河川表流水を原水とする場合においても、ピコ植物プランクトンに由来する原水中エンドトキシンの増大が起こりうると判断される。

(3) 浄水処理過程におけるエンドトキシンの除去特性

浄水処理過程における微生物計数結果ならびにエンドトキシン活性の変化を表-2に示す。ここでは3回調査を行った結果の平均値を示している。また、着水井におけるこれらの値を基準として、単位処理プロセス毎の除去率を下記の式で算出した。

$$R_{p(i)} = \frac{C_{p(i-1)} - C_{p(i)}}{C_{p(i)}} \times 100 \quad (2)$$

ただし、 $R_{p(i)}$: プロセス i における除去率 (%), $C_{p(i)}$: i 番目のプロセスにおける濃度 ($i = 2 \sim 7$) である。

着水井における総エンドトキシンの平均値は 75.1 EU/mL、遊離エンドトキシンは 38.7 EU/mL であった。表-2の結果から、各手法で測定した微生物計数 (SPC・HPC・DAPI)、総エンドトキシン、遊離エンドトキシンともに凝集・沈殿処理により良好に除去されることがわかった。

急速ろ過プロセスまでの平均累積除去率は、総エンドトキシンで 86.2% (78.1~92.8%) であったのに対して、遊離エンドトキシンでは 79.5% (65.1~95.5%) となり、遊離エンドトキシンの方が大きな変動幅を示した。一方、微生物計数結果から算出される平均累積除去率は、SPC で 90.3%, HPC で 91.9%, 全菌数では 82.0% となった。

その後のオゾン処理により総エンドトキシンの累積除去率は 91.2% に達したものの、遊離エンドトキシンでは

80.5% とあまり変化が見られなかった。さらに、後段に設置された活性炭処理水では、総エンドトキシン、遊離エンドトキシンともに増大することが示された。この結果をオゾン-活性炭処理プロセスにおける有機物、特に同化性有機炭素 (AOC) の挙動¹⁷⁾ を踏まえて考えると、オゾン処理による有機物質変換により AOC が増大し、その後の活性炭処理過程で吸着除去された微生物が豊富な AOC を炭素源として再増殖した結果として、活性炭流出水中のエンドトキシンが増大したと考えられる。今回の結果は、Rapala らにより報告されている浄水処理過程における総エンドトキシンの挙動と同じ傾向を示している⁹⁾ が、この論文の中では再生直後の活性炭流出水ではエンドトキシン増大が見られなかったことが同時に指摘されている。以上を総合すると、エンドトキシンに代表される水道水中の微生物由来物質を低減するためには、有機物管理、特に AOC 管理による微生物再増殖の制御に加えて、活性炭の適正管理も必要不可欠と考えられる。

最後に、塩素混和では総エンドトキシンはほとんど低減されず、むしろ遊離エンドトキシンは増大する傾向が確認され、高度浄水処理後の水道水においても 10 EU/mL 程度の濃度で残存していた。オゾン処理および塩素消毒により増殖可能細菌が検出されなくなる状況においてもエンドトキシン活性は残存しており、不活化された微生物も含めた微生物管理の必要性が示唆された。

浄水中のエンドトキシン濃度は、1970年代から Sykora ら¹⁸⁾、Jorgensen ら¹⁹⁾ を始めとした多くの研究者により報告されている。これらの測定値の中には ng/mL 単位で表記されたものも多く、本研究の結果との単純な比較は困難である。前述の Rapala らは、複数の浄水処理施設を対象として総エンドトキシンの測定を行い、本研究の結果とほぼ同程度の 3~15 EU/mL の範囲に分布すると報告している⁹⁾。水中およびそのエアロゾル中に混入したエンドトキシンが主原因と疑われる健康被害報告は複数例あるが^{20), 21)}、このうち bath-water fever

表-2 浄水処理過程における微生物およびエンドトキシンの除去特性

採水地点	一般生菌数 (SPC)		従属栄養細菌数 (HPC)		全菌数 (DAPI) *		総エンドトキシン		遊離エンドトキシン	
	測定値 (cfu/mL)	除去率 (%)	測定値 (cfu/mL)	除去率 (%)	測定値 (cells/mL)	除去率 (%)	測定値 (EU/mL)	除去率 (%)	測定値 (EU/mL)	除去率 (%)
取水 (河川水)	1144		22572		8.96E+05		56.22		35.63	
着水井 (p_1)	1359	0.0	17534	0.0	8.45E+05	0.0	75.11	0.0	38.73	0.0
凝集剤添加前 (p_2)	1481	-9.0	22972	-31.0	9.91E+05	-17.3	78.16	-4.1	38.41	0.8
凝集沈殿後 (p_3)	255	90.2	1502	122.4	2.01E+05	93.5	11.63	88.6	5.67	84.5
急速ろ過後 (p_4)	63	14.1	590	5.2	1.35E+05	7.9	10.26	1.8	7.30	-4.2
オゾン処理後 (p_5)	0	4.7	0	3.4	1.05E+03	15.8	6.645	4.8	7.04	0.7
活性炭吸着後 (p_6)	5	-0.4	238	-1.4	2.28E+04	-2.6	10.98	-5.8	8.44	-3.6
塩素混和後 (p_7)	0	0.4	0	1.4	5.07E+03	2.1	9.66	1.8	11.82	-8.7

表中の各数値は、3回実施した調査測定結果の平均値で表した。

* 急速ろ過後試料までの全菌数については2回の調査結果の平均値、オゾン処理以降については1回の調査結果のみを表記

の集団発生事例(フィンランド)においてのみ、発生時の水中エンドトキシン濃度が測定され、発症患者宅の蛇口水エンドトキシン濃度が0.2~1.0 µg/mLの範囲にあったことが報告されている。単純な濃度比較は困難であるが、一般的に用いられている換算係数、1 ng = 5~10 EUを使用すると、この報告値は1000~10000 EU/mLに相当する。この値に比べれば本研究で得られた浄水中エンドトキシン濃度は極めて低く、安全濃度範囲にあると判断される。しかしながら、こうした重篤な健康被害以外にも、アレルギー反応への関与を示唆する結果も存在する²²⁾ものの、吸入以外の曝露形態による健康影響は調べられていないため、確実に安全と言えるエンドトキシンの濃度範囲は未知と言えよう。今後は、浄水中のエンドトキシン変動に影響を及ぼす因子、すなわち原水中の微生物や配水過程における変動などの情報蓄積を進めるとともに、水道水使用を想定した曝露量を把握することが必要と考えられる。

(4) エンドトキシンの存在形態の変化

浄水処理過程における遊離エンドトキシン比率(=遊離エンドトキシン/総エンドトキシン)と従属栄養細菌数(HPC)の変化を図-5に示す。急速ろ過プロセス以前の試料では、遊離エンドトキシン比率が0.36~0.96の範囲に分布した。これに対して、表-2に示したようにオゾン処理および塩素混和を行った全ての試料でHPCは0 cfu/mLとなり、その時の遊離エンドトキシン比率はオゾン処理後の試料で0.59~1.48、さらに塩素消毒後の試料では0.86~2.36と非常に高い値を示したことから、その大部分が遊離エンドトキシンとして水中に残存していることが示された。ここで、塩素消毒は細胞膜構

造にダメージを与えて細胞透過性を破壊するとともに、細胞内の核酸や酵素に作用して微生物を不活化すると考えられている¹⁾。また、オゾン処理についても消毒効果の残留性こそないものの微生物を不活化する強い酸化力を有することから、オゾン処理および塩素消毒により損傷を受けた細胞膜からLPS複合体が放出されることで、遊離エンドトキシンの増大を招いたと考えられる。このように、十分な微生物不活化効果が達成されている場合には遊離エンドトキシン比率が増大する反面、HPCが検出される試料、すなわち増殖可能な細菌が存在する試料では、微生物細胞膜を構成する結合エンドトキシンの割合が増加することにより、遊離エンドトキシン比率が相対的に低下したと考えられる。本研究で検討を行った試料は数が限られているものの、以上の結果から遊離エンドトキシン比率は微生物不活化効果を表す良い指標となりうることを示唆される。

なお、本研究では遊離エンドトキシン活性が総エンドトキシン活性を上回る現象が複数の試料で確認された。この逆転現象を説明する理由として、1) 残存する微生物細胞などの懸濁性物質によりLAL試薬とエンドトキシン活性部位が妨害されたことによる見かけの総エンドトキシン活性の低下に加えて、2) 塩素によるLPS複合体の遊離化・低分子化により、遊離エンドトキシンとLAL試薬との反応性が増大している可能性も挙げられる。以上の点から、存在形態の違いがエンドトキシンが示す生理活性に及ぼす影響も含めたさらなる検討が求められる。

4. 結論

本研究では、水道水源におけるエンドトキシン濃度の変動要因として微生物叢の変化に着目し、グラム陰性細菌およびシアノバクテリアに由来するエンドトキシンの定量を行った。その結果、*Synechococcus* sp.の季節変動に起因して、エンドトキシン量が増減することが示唆された。また、琵琶湖・淀川水系におけるエンドトキシン調査の結果から、下水処理施設からの放流水がエンドトキシン増大に影響を与えることを指摘した。環境微生物群に由来する一細胞当たりのエンドトキシンは、*E. coli*の場合の約37%であり、比較的高いことが明らかになった。さらに、浄水処理過程におけるエンドトキシンの除去特性を調べた結果、急速ろ過プロセスにより良好に除去されるものの、活性炭表面における微生物の増殖により活性炭処理後のエンドトキシンが増大すること、しかしながら浄水中エンドトキシン濃度は既往研究で報告されている健康被害発生時濃度と比較して、十分に低濃度であることが明らかになった。ま

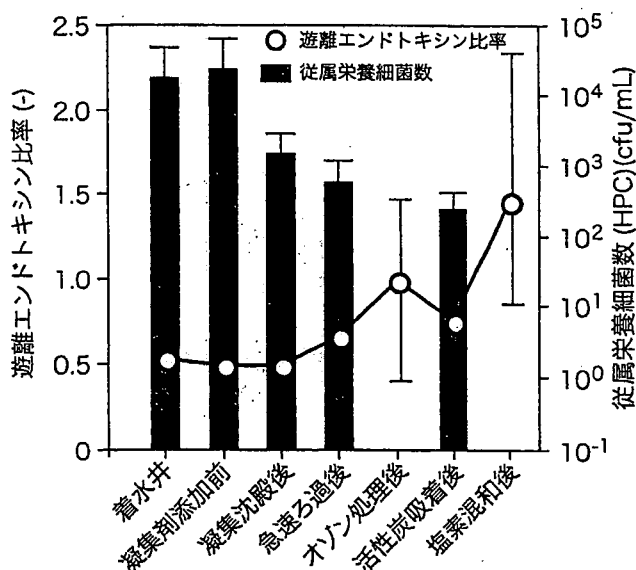


図-5 浄水処理過程における遊離エンドトキシン比率および従属栄養細菌数の変化
図では、3回の調査で得られた平均値と測定値の範囲を示している。

た、オゾン処理や塩素消毒といった微生物不活化操作により遊離エンドトキシンが増大したことから、遊離エンドトキシン比率は微生物不活化効果を表す指標となりうることを示唆された。

謝辞：本研究の成果の一部は、厚生労働科学研究費補助金（健康科学総合研究事業，H17-健康-一般-025，代表者 国包章一）および文部科学省科学研究費補助金（基盤（B），18310045，代表者 伊藤禎彦）によるものである。また、採水に当たり、ご尽力いただいた A 浄水場関係者各位に深謝いたします。

参考文献

- 1) Percival S.L., Walker J.T. and Hunter P.R.: Microbiological aspects of biofilms and drinking water, CRC Press, 2000.
- 2) LeChevallier M.W., Schulz W. and Lee R.G.: Bacterial nutrients in drinking water, Applied and Environmental Microbiology, 57, pp. 857-862, 1991.
- 3) Chorus I. and Bartram J.: Toxic cyanobacteria in water: A guide to their public health consequences, monitoring and management, World Health Organization, 1999.
- 4) Reed C.E. and Milton D.K.: Endotoxin-stimulated innate immunity: A contributing factor for asthma, Journal of Allergy and Clinical Immunology, 108, pp. 157-166, 2001.
- 5) Thorne P.S., Kulhankova K., Yin M., Cohn R., Arbes S.J., Jr. and Zeldin D.C.: Endotoxin exposure is a risk factor for asthma: the national survey of endotoxin in United States housing, American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, 172, pp. 1371-1377, 2005.
- 6) Petsch D. and Anspach F.B.: Endotoxin removal from protein solutions, Journal of Biotechnology, 76, pp. 97-119, 2000.
- 7) (社) 日本水道協会：上水試験方法 2001 年版，日本水道協会，2001.
- 8) 国立環境研究所微生物系統保存施設：培地リスト，http://www.nies.go.jp/biology/mcc/home_j.htm, 2006.11.15 accessed.
- 9) Rapala J., Lahti K., Rasanen L.A., Esala A.L., Niemela S.I. and Sivonen K.: Endotoxins associated with cyanobacteria and their removal during drinking water treatment, Water Research, 36, pp. 2627-2635, 2002.
- 10) 阪神水道企業団管理部水質試験所：調査試験年次報告（通第 53 号），2004.
- 11) Bernardova K., Babica P., Marsalek B. and Blaha L.: Isolation and endotoxin activities of lipopolysaccharides from cyanobacterial cultures and complex water blooms and comparison with the effects of heterotrophic bacteria and green alga, Journal of Applied Toxicology (in press), DOI: 10.1002/jat.1257.
- 12) Narita H., Isshiki I., Funamizu N., Takakuwa T., Nakagawa H. and Nishimura S.I.: Organic matter released from activated sludge bacteria cells during their decay process, Environmental Technology, 26, pp. 433-439, 2005.
- 13) Rietschel E.T., Kirikae T., Schade F.U., Mamat U., Schmidt G., Loppnow H., Ulmer A.J., Zahringer U., Seydel U., Di Padova F. and et al.: Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function, FASEB Journal, 8, pp. 217-225, 1994.
- 14) Narita H., Funamizu N., Takakuwa T. and Kunimoto M.: Role of hydrophilic organic matter on developing toxicity in decay process of activated sludge, Water Science and Technology, 52, pp. 63-70, 2005.
- 15) 滋賀県琵琶湖・環境科学研究センター：瀬田川プランクトン調査結果速報（第 1 報～第 39 報，2006 年），http://www.lberi.jp/root/jp/06db/bkjhplankton_setagawa.htm, 2007.1.10 accessed.
- 16) 大阪府水道部水質管理センター：水質試験成績並びに調査報告（第 42 集），pp. 448-451, 2003.
- 17) Polanska M., Huysman K. and van Keer C.: Investigation of assimilable organic carbon (AOC) in Flemish drinking water, Water Research, 39, pp. 2259-2266, 2005.
- 18) Sykora J.L., Keleti G., Roche R. and Volk D.R.: Endotoxins, algae and *limulus* amoebocyte lysate test in drinking water, Water Research, 14, pp. 829-839, 1980.
- 19) Jorgensen J.H., Lee J.C. and Pahren H.R.: Rapid detection of bacterial endotoxins in drinking water and renovated wastewater, Applied and Environmental Microbiology, 32, pp. 347-351, 1976.
- 20) Muittari A., Rylander R. and Salkinoja-Salonen M.: Endotoxin and bath-water fever, Lancet, 2, pp. 89, 1980.
- 21) Fields B.S., Haupt T., Davis J.P., Arduino M.J., Miller P.H. and Butler J.C.: Pontiac fever due to *Legionella micdadei* from a whirlpool spa: possible role of bacterial endotoxin, Journal of Infectious Diseases, 184, pp. 1289-1292, 2001.
- 22) Torokne A., Palovics A. and Bankine M.: Allergenic (sensitization, skin and eye irritation) effects of freshwater cyanobacteria-experimental evidence, Environmental Toxicology, 16, pp. 512-516, 2001.

(2007.5.25 受付)

Factors associated with endotoxin fluctuation in aquatic environment
and characterization of endotoxin removal in water treatment process

Yumiko OHKOUCHI¹, Suguru ISHIKAWA¹, Kyosuke TAKAHASHI²
and Sadahiko ITOH¹

¹Dept. of Urban Management, Graduate School of Engineering, Kyoto University
²Sumitomo Heavy Industries, Ltd.

Endotoxins are well known as bacterial agents to cause strong immunity reaction in human. In this study, several factors associated with increase of endotoxins in aquatic environment were examined. It was suggested that the fluctuation of endotoxic activities could be affected by cell numbers of *Synechococcus* sp. by comparison with endotoxic activities from different cyanobacterial strains. In Lake Biwa – Yodo River basin, the endotoxic activities ranged from 311 to 2,430 EU/mL, and the effluent from sewage treatment plant were considered to be a major source of endotoxin contamination. The endotoxic activity per an indigenous bacterial cell in aquatic environment was calculated as 5.37×10^{-4} EU/cell. The removal of endotoxins in water treatment process was also characterized. It was found that endotoxins were increased after activated carbon adsorption process with bacterial regrowth, and that free endotoxin were increased by chlorination. The ratios of free endotoxins to total endotoxins reflected the bacterial cell damages by chlorination or ozonation.

B-14 不活化した大腸菌の損傷に関する研究

お茶の水女子大学大学院人間文化研究科 ○窪華奈子・大瀧雅寛

1. はじめに

環境中には、悪条件や人工的な抗生物質にさらされることで損傷した細菌が存在する。これらの損傷した細菌は通常用いられる培地および培養条件では検出できない可能性があることが報告されている。さらに、自然系内の微生物には各々が環境中のストレスに応答するため、“無傷”、“様々な程度の損傷”、“不可逆的(回復可能性の無い)損傷”の3つの状態が存在すると指摘されている¹⁾。

現在、塩素消毒だけでなく様々な消毒方法が検討されている。もし、病原細菌に対する消毒による損傷が、回復しうるような可逆的な損傷であった場合、危険が残る可能性がある。また新たな消毒方法の導入あるいは既存の消毒方法を考える際に、それらの消毒方法の効果、原理、特徴の違いによって、細菌への損傷程度の測定法への反映のされ方も異なると考えられる。本研究では2種の消毒処理により不活化された大腸菌の損傷程度と測定方法毎による差異と調べることによって、損傷程度の特徴を捉えることを目的とした。

2. 実験方法

2.1 不活化処理

モデル微生物には *E. Coli* K 12(NBRC3301)を使用し、平面培地で37℃で24時間培養して形成された大腸菌コロニーを釣菌し、リン酸緩衝液に溶解させて使用した。

(1) 紫外線照射処理

初期条件は、大腸菌濃度が約 10^6 CFU/mlとした。濁質有り(落合水再生センターの一次処理水を使用)と無しの条件を設定した。濁質有りの場合は、濁度は約240 NTU~260 NTU、吸光度(波長254 nm) 1.5 cm^{-1} ~ 1.9 cm^{-1} であり、濁質無しでそれぞれ約1 NTU~3 NTU、 0.04 cm^{-1} ~ 0.2 cm^{-1} であった。

光源として低圧水銀ランプ(20W 東芝殺菌ランプ)を使用した。試料をシャーレ(直径5.7 cm)に入れて、スターラーで攪拌しながら紫外線を照射した。

試料の採取により液体体積が減少し、照射時の水深は1.03 cmから0.73 cmとなるが、平均値0.93 cmを平均線量率の計算に使用した。水面における紫外線線量率をヨウ酸カリウムとヨウ化カリウムを利用した化学線量計²⁾にて測定し、平均値 0.37 mJ/s/cm^2 を平均線量率の計算に使用した。

(2) 塩素処理

初期条件は大腸菌濃度が約 10^6 CFU/ml、濁度が1.0 NTU~1.3 NTUとした。

塩素剤として次亜塩素酸ナトリウム溶液(キシダ化学(株))を使用し、初期塩素濃度を0.07 mg/l~0.4 mg/lとなるように投入し、各々の濃度において投入の1分後に試料を採取した。試料10mlに対する脱塩素剤として、3%チオ硫酸ナトリウム(キシダ化学(株))を0.1 ml使用した。

2.2 大腸菌の測定方法

(1) コロニー形成法

細菌の増殖能力を測定するため、コロニー形成法を用いた。測定には、大腸菌群の選択培地であるデスコキシコーレイト寒天培地(栄研器材(株))と、非選択培地であるTryptic Soy Agar(Difco 和光(株))を使用し、共に重層寒天法により大腸菌濃度を測定した。

(2) ATP法

細菌の代謝活性を測定するために、ATP量を測定した。測定には、ATP発光キット(東洋ビーネット(株))、ATP抽出キット(東洋ビーネット(株))、Luminescence JNR-II AB2300(ATTO(株))にてATP量を求めた。

(3) 回復量測定法

細菌の損傷程度を測定するために不活化後の回復量を測定した。不活化後の試料を標準液体培地に投入し37°Cで培養し、回復させた。

3. 実験結果と考察

Fig.1~Fig.3に、紫外線処理および塩素処理後のコロニー形成法による濃度測定結果を示した。また Fig. 4~Fig. 6に、それぞれの場合における2つのコロニー形成法測定結果の相関を示した。

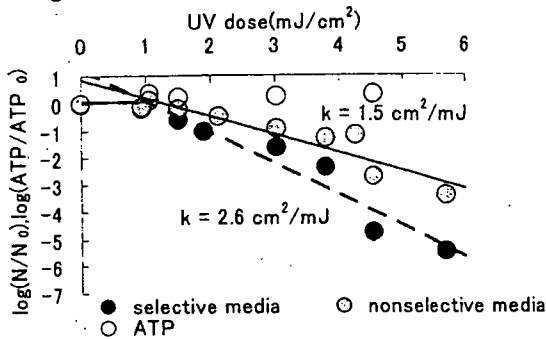


Fig. 1 inactivation by UV irradiation

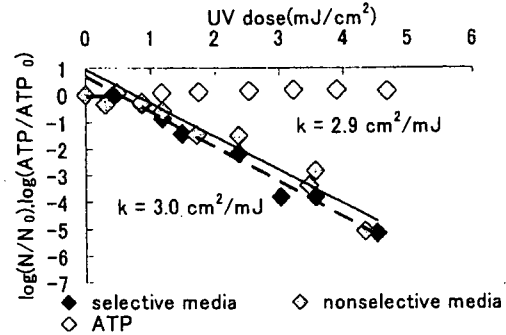


Fig. 2 inactivation by UV irradiation (with sludge)

紫外線による微生物数の減少は式(a)に従う。

$$\ln(N/N_0) = -kIt \quad (a)$$

N : 照射後微生物数, N_0 : 照射前微生物数

k : 不活化速度定数, I : 紫外線線量率, t : 照射時間

Fig. 1, Fig. 2より濁質有りの方が不活化速度定数が小さいことから、紫外線に対する感受性が大きいことがわかった。よって、濁質中には紫外線によるDNA損傷を補助する因子か、まったく別の損傷を与える因子が存在すると考えられる。選択培地と非選択培地によるコロニー形成能の差は濁質有りの方が小さかった。このことから、

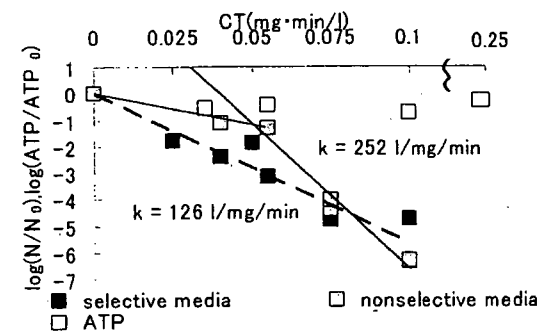


Fig. 3 inactivation by Chlorine treatment

濁質中での紫外線不活化では濁質無しの場合と比べて深い損傷を与えられている可能性がある。ATP量はほとんど変化せず、不活化後の大腸菌もATPを保持していると考えられる。

塩素処理による大腸菌の減少は式(b)に従う。

$$\ln(N/N_0) = -k[C \cdot t] \quad (b)$$

N : 塩素処理後微生物数, N_0 : 塩素処理前微生物数, k : 不活化速度定数, C : 塩素濃度, t : 塩素処理時間

Fig. 3より選択培地により培養できる大腸菌の減少は式(b)に従ったが、非選択培地においては不活化が遅れた。このことから塩素濃度の違いにより不活化過程が異なることが考えられる。ATP量の変化は小さく、紫外線処理と同様に、代謝機能の阻害は明確にはならなかった。

Fig. 4~Fig. 6において、選択培地で培養できる状態を“active condition”, 非選択培地で培養できて選択培地で培養できない状態を“slight damage”, 両培地で培養できない状態を“severe damage or dead”と定義した。

紫外線処理(濁質無)と塩素処理を比較すると、選択培地による生存率($\log(N/N_0)$)が0から約-3の範囲では同様の状態を示し、-3以下では塩素処理の方が深い損傷状態に移行する細菌数が多かった。このことから、ある程度以上の不活化量では、紫外線処理(濁質無)よりも、塩素処理のほうが確実に損傷させることができることがわかる。紫外線処理(濁質有)と塩素処理を比較すると、紫外線処理(濁質有)では不活化後の大腸菌のほとんどが深い損傷状態になっているため、紫外線処理(濁質有)のほうが確実に損傷させると考えられる。

Fig. 7~Fig. 8に回復後の結果を示す。回復時のATP生成量の増減より代謝機能の状態について考えた。選択培地により培養できる大腸菌の濃度が初期濃度に対して 10^2 , 10^4 , 10^6 となるように不活化し、各々を回

復させた。

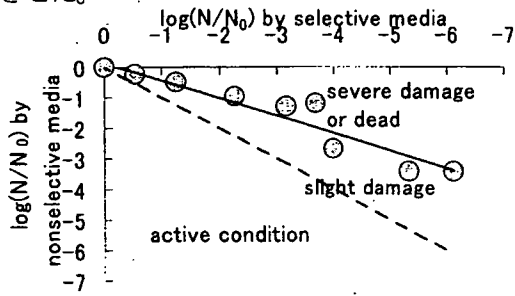


Fig. 4 damage of *E.Coli* K 12 after UV irradiation

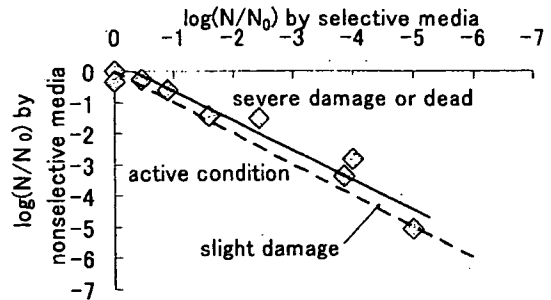


Fig.5 damage of *E.Coli* K 12 after UV irradiation(with sludge)

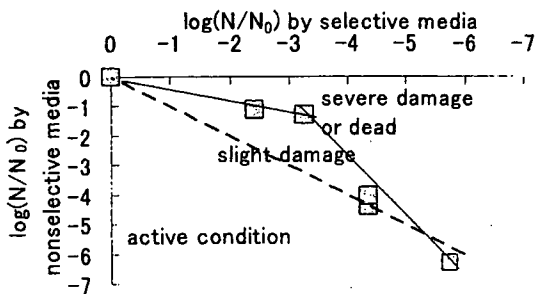


Fig. 6 damage of *E.Coli* K12 after Chlorine treatment

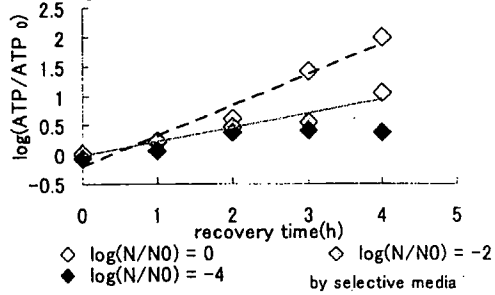


Fig. 8 recovery from UV damage (with sludge)

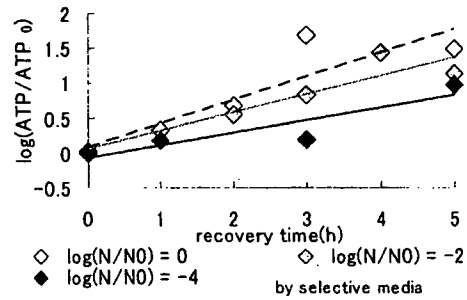


Fig. 7 recovery form UV damage

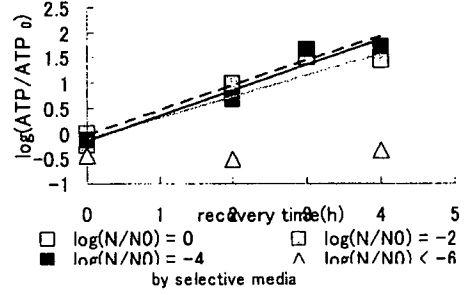


Fig. 9 recovery from Chlorine damage

Fig. 7, Fig. 8 より, 紫外線処理では不活化により ATP 回復量が減少した。濁質無しでは代謝が活性化しているが 濁質有りでは, 10^4 まで不活化した大腸菌の代謝活性化は停止した。よって紫外線処理の濁質共存下であれば DNA 損傷の他に, 代謝機能を阻害する因子が働くと考えられる。Fig. 9 より低濃度の塩素処理後の大腸菌は代謝が活発化した。低塩素濃度で処理した場合は可逆的な代謝阻害をし, 高塩素濃度で処理した場合は不可逆的な代謝阻害をしたと考えられる。

4. まとめ

紫外線処理における濁質の有無による違いについては, 濁質共存下のほうが不活化されやすく, 選択培地で測定した不活化量が同じでも, 深い損傷を与えている割合が多いことが示唆された。

塩素処理については, 塩素濃度によって不活化過程が異なるが, 紫外線処理とは異なる傾向を示すことがわかった。低塩素濃度では可逆的な代謝機能の阻害をするが, 高塩素濃度では不可逆的な代謝機能の阻害をすることが考えられた。

【参考文献】

- 1) Mossel, D.A. and P.van Netten. "Harmful effects of selective media on stressed microorganisms", nature and remedies, p.329-371. In M.H.E.Andrew and A.D.Russell(ed.), The Revival of injured microbes. Academic Press, London, United Kingdom. 1984
- 2) Rahn, R.O, Bolton, J.R. and Stetan, M.P. "The Iodide/Iodate Actinometer in UV disinfection" Proc. of AWWA water Quality Technology conference, 2000

環境水中のエンドトキシン存在形態に関する研究

京大院 (工) ○大河内由美子, 高橋恭介, 小寺恵介, 伊藤禎彦

Detection of Total- and Free-Endotoxin in Environmental Water, by Yumiko OHKOUCHI, Kyosuke TAKAHASHI, Keisuke KODERA, Sadahiko ITOH (Dept. of Urban Management, Kyoto Univ.)

1. はじめに

水環境中には多種多様な微生物が存在しており、凝集-沈殿-ろ過の一連の浄水処理を通してある程度除去されるものの、一部は不活化された状態で水道水中に残存している。本研究では、微生物(グラム陰性細菌・シアノバクテリア)の細胞外膜構成物質に起因する生物活性(エンドトキシン)に着目する。エンドトキシンはヒトの細胞においても Toll-like レセプターを介して強い免疫反応を惹起する化学物質として知られており¹⁾、その活性は由来する微生物の種や量・細胞膜の状態により変化する特性があることから、水温/水質の変動に連動して活性量が大きく変動する可能性もある。そこで、本研究では環境水ならびに水道水中のエンドトキシン活性とその存在状態ならびに微生物量を調べた。

2. 実験方法

琵琶湖・淀川水系から採取した水試料ならびに水道水を対象として、微生物量ならびに総エンドトキシン・遊離型エンドトキシンをそれぞれ測定した。微生物量は標準寒天培地および R2A 寒天培地を用いた平板培養法、ならびに DAPI 蛍光染色法により定量した。エンドトキシン活性は、カプトガニ血球抽出成分 LAL (エンドスペシー ES-50M, 生化学工業)を使用したエンドポイント比色法(トキシカラー DIA-MP, 生化学工業)により測定し、培養液を 14,000 (rpm)で 10 分間遠心分離した上清を遊離型エンドトキシン測定に供した。また、各試料とも TOC, E₂₆₀, 濁度(660nmにおける吸光度), pH, 懸濁物質の各項目について測定を行った。

3. 結果と考察

琵琶湖・淀川水系において採取した水試料(No.1, 4-13)ならびに水道水(No.14, 15)のエンドトキシン活性測定結果を表1に示す。河川水・湖沼水ともに 100~2500(EU/mL)の範囲にあった。本調査は冬季に実施したが、一部の採水地点については夏季調査も実施しているものの、エンドトキシン活性の季節変動は確認できなかった。なお、下水処理放流水は 1.08×10^4 (EU/mL)と自然水と比較して高い値を示した。総エンドトキシンに対する遊離型エンドトキシンの比率を表1に併せて示した。この比率は試料間で大きく異なり、水道水中では約 80%が遊離型で存在することがわかった。さらに、遊離型エンドトキシンが総エンドトキシンを上回る結果も複数得られており、無処理の環境水中に混入した懸濁物質または微生物細胞のミセル形成によりエンドトキシンの活性部位が阻害されている可能性も考えられる。

標準寒天または R2A 寒天培地を用いた平板培養による微生物量と総エンドトキシン量の関係を図1に示す。平板培養計数結果と総エンドトキシン活性の間には明確な相関は認められなかった。この理由として、1)環境水中には VBNC (Viable but

表1 環境水中のエンドトキシン活性とその形態

No.	河川/湖沼	採水地点	総Et (EU/mL)	遊離型Et (EU/mL)	比
1	桂川	下水処理場放流水	1.08×10^4	1.26×10^3	0.117
4	琵琶湖南湖	大津港	4.28×10^2	2.20×10^2	0.514
5	琵琶湖南湖	なぎさ公園	3.31×10^2	2.30×10^2	0.695
6	琵琶湖南湖	矢橋	2.43×10^3	3.30×10^2	0.136
7	木津川	三川合流地点	6.21×10^2	1.77×10^3	>1
8	宇治川	三川合流地点	2.03×10^3	8.26×10^2	0.407
9	淀川	枚方大橋	1.51×10^3	2.87×10^2	0.190
10	琵琶湖疏水	北大路通	1.16×10^2	2.95×10^2	>1
11	琵琶湖疏水	若王子橋	1.46×10^2	1.77×10^2	>1
12	琵琶湖疏水	蹴上	1.55×10^2	1.82×10^2	>1
13	琵琶湖疏水	冷泉橋	2.57×10^2	1.94×10^2	0.755
14	水道水	京都市	1.99×10^0	1.53×10^0	0.769
15	水道水	京大	1.12×10^1	9.70×10^0	0.866

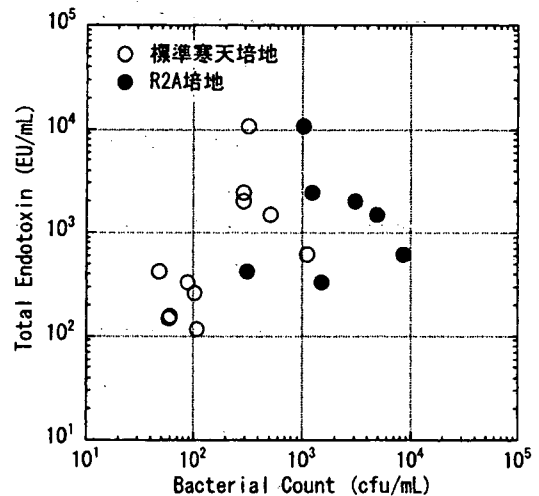


図1 微生物量とエンドトキシン活性の比較

nonculturable)微生物を始めとした種々の微生物が共存しており微生物種ごとにエンドトキシン活性を左右する Lipid A の組成が異なる²⁾こと、あるいは 2)微生物細胞外膜の状態は多様であり遊離型エンドトキシンの存在が大きく影響していることが挙げられる。

4. まとめ

本研究では、湖沼水・河川水・水道水中のエンドトキシン活性とその存在状態ならびに微生物量を調べた。その結果、遊離型エンドトキシンの比率は試料毎に大きく異なった。また、平板培養による微生物量はエンドトキシンの指標としては有効性が低いことから、エンドトキシンの代替指標探索が望まれる。

【参考文献】

- 1) Chou, J.C. *et al.*, J. Biol. Chem., 274(6), pp.10689-10692, 1999
- 2) Christian, A. and Ulrich, Z, Trends in glycoscience and glycotecnology, 14(76), pp.69-86, 2002

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

お茶の水女子大学大学院 人間文化研究科 ○廣戸裕子, 大瀧雅寛

Validity of the Standard Plate Count Bacteria as Biosimulator in Flow UV Reactor, by Yuko HIROTO, Masahiro OTAKI (Dept. of Human Environmental Science, Ochanomizu Univ.)

1. はじめに

運転中の紫外線装置において、消毒線量を実測する方法として原水中の一般細菌を生物線量計として利用する方法を試みた。既に生物線量計として用いられることの多い大腸菌ファージとの整合性を、流水式装置を用いて様々な条件下において検討した。

2. 実験方法

紫外線源には低圧水銀灯を用いた。流水式装置には、容積 450 ml の二重円筒管装置を用い、回分式には内径 5.5 cm のガラスシャーレを用いた。井戸水に、大腸菌ファージ Qβ を少量加え、よく攪拌したものを試料とした。

回分式不活化実験では、試料をビーカーに入れ、攪拌させながら紫外線を照射した。実験装置を Fig. 1 に示した。Qβ を生物線量計として用いて線量を測定した。なお、算定式は

$UV\ fluence = -5.9 \times \ln(S_{UV})\ mW \cdot s \cdot cm^{-2}$ を用いた¹⁾。

流水式不活化実験では、装置内を試料で満たし、定常流を仮定するため、紫外線を照射しながら試料を 1 L 程度流下させた後に試料を採取した。流水式の実験装置を Fig. 2 に示した。

紫外線装置通過前後の試料中の、Qβ と一般細菌を測定した。Qβ は重層寒天培地法を用い、37 °C で 24 時間程度培養した。一般細菌は直径 5 cm, 孔径 0.45 μm のメンブレンフィルターで試料を吸引し、普通寒天培地にのせ、37 °C で 24 時間程度培養し、コロニー数を計数した。

試料の 254 nm における吸光度はいずれの場合も約 0.03 cm⁻¹ であった。Qβ の初期濃度は 4.0 × 10⁷ PFU · ml⁻¹ であった。一般細菌の初期濃度は 3.8 CFU · ml⁻¹ であった。

3. 実験結果と考察

回分式による不活化実験の結果を Fig. 3 に示した。縦軸には生残率を対数で表し、Qβ によって算出した UV 量を横軸に表した。一般細菌の生残率は UV 量が 20 mW · s · cm⁻² 付近を境界として二段階の減少を見せた。これは、一般細菌中に UV 耐性の強い種がある割合で存在したためと考えられる。

Fig. 4 に流水式による Qβ, 一般細菌のそれぞれの不活化結果から算定した UV 量と、平均滞留時間の関係を示した。Qβ の場合は平均滞留時間が増すにつれ算定 UV 量も増加する結果となった。一般細菌は結果に大きくばらつきが見られるが、UV 量の算出結果が Qβ と一致する点も見られた。結果がばらつく原因として、一般細菌はろ紙上に捕集した細菌数に差が見られ、かつ個体数が少ないことが多かった。特に平均滞留時間が 4.4 min では個体数の少なさとばらつきが出ていたため、微生物測定法の信頼性が非常に低い。よって、滞留時間が大きく、不活化率が大きな条件では、その点を改善して再度実験を行う必要がある。

4. まとめ

一般細菌は、回分式実験により、不活化率から UV 量を算定する式を求めることが出来た。その再現性も十分にあると考えられた。流水式への適用においては、不活化率が大きい条件でデータの信頼性が低下するという課題が残るが、この点を改善することにより、一

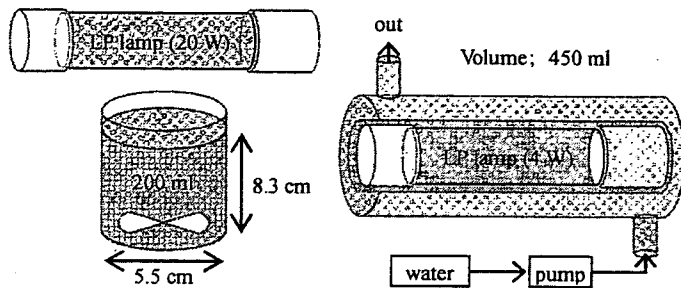


Fig. 1 Setup for Batch UV Irradiation

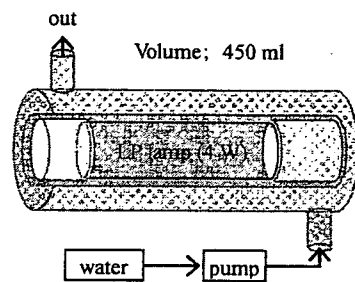


Fig. 2 Setup for Flow UV Irradiation

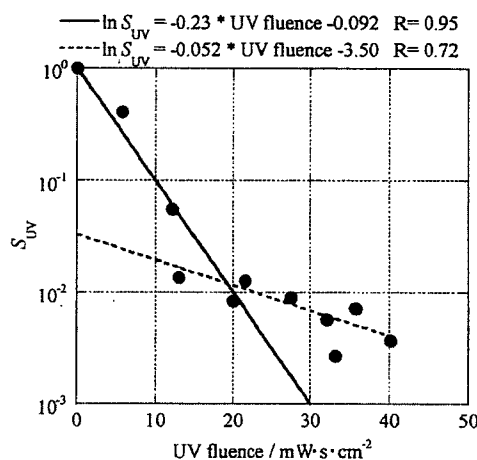


Fig. 3 Inactivation after UV irradiation by Batch

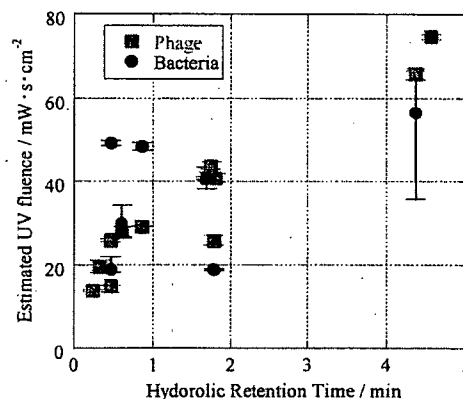


Fig. 4 Estimation of UV in Flow Reactor

般細菌が流水式においても生物線量計としても用いられる可能性が示された。

参考文献

- 1) KAMIKO N. OHGAKI S. RNA coliphage Qβ as a bioindicator of the ultraviolet disinfection efficiency. Wat. Sci. Tech., 21, (3) 227-231, 1989.
- 2) KAMIKO N. et al. Photoreactivation kinetics of the fecal indicator bacteria in the released effluent. Proceedings of 1st Asia International Conference of IUVA, Singapore, 2002.

謝辞

本研究は、平成 17 年度厚生労働科学研究費補助金「残留塩素に依存しない水道の水質管理手法に関する研究」により実施した。

(4-64) オゾン-活性炭処理における活性炭表面付着微生物郡集の分子生物学的手法による解析

○春日 郁朗(国立保健医療科学院) 島崎 大(国立保健医療科学院)
国包 章一(国立保健医療科学院)

1. 研究の背景と目的

高度浄水処理の 1 つであるオゾン-活性炭処理は、本来、オゾンによる酸化分解と活性炭による物理吸着を主眼とした処理である。しかし、実際には各種の微生物が活性炭表面に定着、繁殖し、溶存有機物の生分解、アンモニアの硝化、活性炭吸着能の維持などに関与していることが報告されている。このような生物学的処理能力を併せ持った活性炭は、通常の粒状活性炭処理と区別して“生物活性炭”と呼称されている。しかし、この生物活性炭の“生物”については、不明な点が多く、粒状活性炭と区別する定義も明瞭ではない。このため、生物学的作用を担う微生物群集に関する基礎的な情報の不足から、生物活性炭は依然として概念的な理解に留まっているのが現状である。

そこで本研究では、オゾン-活性炭処理工程において、どのような微生物群集構造が活性炭表面に構築されているのかを遺伝子レベルから明らかにし、各浄水場でどのような特徴があるのか、原水中の微生物群集構造とどのような差異があるのかを評価することを試みた。微生物群集構造の解析には、真正細菌の 16S ribosomal RNA 遺伝子 (16S rDNA)、および真核生物の 18S ribosomal RNA 遺伝子 (18S rDNA) を対象とした T-RFLP 法 (末端制限酵素断片長多型: Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism) を採用した。

2. 実験方法

オゾン-活性炭処理を導入している A~G の 7 箇所の浄水場を対象とし、原水、活性炭、水質データを提供していただいた。基本的に、活性炭試料は逆洗工程の直前に採取した。また、浄水場 A, B については逆洗前後の活性炭を、浄水場 A, G については使用期間の異なる活性炭を、浄水場 G からは生物接触酸化装置の付着生物膜試料をそれぞれ解析に加えた。試料の一覧を表 1 に示した。

活性炭に付着した細菌数 (全菌数) の測定は、活性炭を Milli-Q 水中で超音波処理し、上澄み中に剥離された細菌を DAPI 染色し、蛍光顕微鏡で計数した。

表 1 解析対象試料の一覧

浄水場	試料	略号	活性炭使用期間	逆洗頻度	備考
A	原水	A-W	-	-	河川水
	活性炭 逆洗前	A-AC-b	2年	4日	固定床下向流
	活性炭 逆洗後	A-AC-a	同上		
	活性炭 長期使用	A-AC-L	8年		
B	原水	B-W	-	-	河川水
	活性炭 逆洗前	B-AC-b	9ヶ月	4日	固定床下向流
	活性炭 逆洗後	B-AC-a	同上		
C	原水	C-W	-	-	湖水
	活性炭	C-AC	1ヶ月	-	流動床上向流
D	原水	D-W	-	-	ダム湖水
	活性炭	D-AC	3年	3日	固定床下向流
E	原水	E-W	-	-	河川水
	活性炭	E-AC	12年(年20%新炭補充)	1日	流動床上向流
F	原水	F-W	-	-	河川水
	活性炭	F-AC	12年(年20%新炭補充)	1日	流動床上向流
G	原水	G-W	-	-	ダム湖水・河川水・地下水
	活性炭	G-AC	5ヶ月	3日	固定床下向流
	活性炭 長期使用	G-AC-L	13年		
	生物接触酸化装置 (付着生物膜)	G-BO	-		

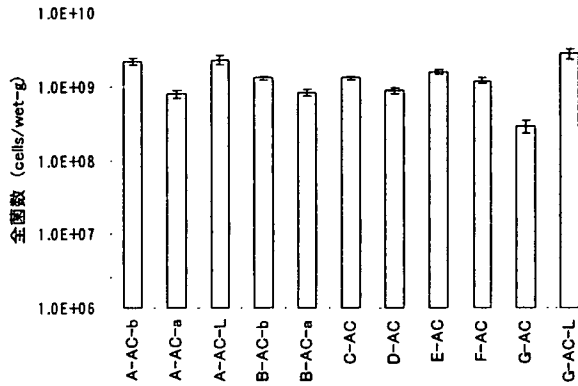


図1 活性炭付着細菌数（全菌数）

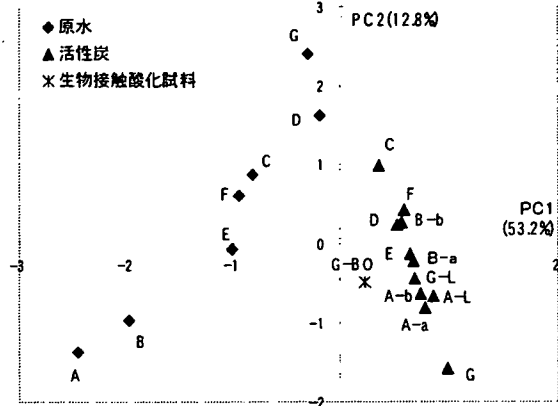


図2 主成分分析によるTRFLPパターン（16S rDNA 遺伝子）の比較

原水中の微生物、活性炭に付着している微生物から核酸を抽出し、5'末端を蛍光標識したフォワードプライマーと未標識のリバースプライマーを用いて、16S rDNA、18S rDNA をそれぞれPCRによって増幅した。増幅産物を制限酵素 *HhaI* によって消化し、5'末端断片をキャピラリーシークエンサーで分離・検出した。

3. 結果及び考察

活性炭試料の全菌数の計数を行ったところ、浄水場によらず、 10^8 - 10^9 cells/g（湿重量）の細菌が付着していることが明らかになった（図1）。浄水場 A, B については、同一の処理池について、逆洗前後の活性炭試料の全菌数を比較した。その結果、逆洗によって全菌数は浄水場 A では 36%、浄水場 B では 64% に減少した。逆洗工程は定期的に繰り返されていることを考えると、付着細菌数は逆洗サイクルに合わせて大きく変動していることが推察された。また、活性炭の使用期間による全菌数の差異を浄水場 A と G で比較した。浄水場 A では、2年間連続使用している活性炭と、8年間連続使用している活性炭との間に大差はなかったが、浄水場 G では、5ヶ月間使用した活性炭よりも、13年間使用した活性炭の方が、全菌数は約10倍多かった。

原水、活性炭、生物接触酸化試料の微生物群集構造をTRFLP法によって比較した。16S rDNA のTRFLPパターンを主成分分析によって解析した結果を図2に示す。原水試料と活性炭試料は、主に第一主成分によって分離された。原水試料のTRFLPパターンは地点間でのばらつきが大きかったのに対して、活性炭試料のTRFLPパターンについては、浄水場間の差異は原水ほど大きくはなく、比較的類似した真正細菌群集構造が構築されていることが推測された。付着細菌数に加えて、群集構造にも類似性があるということは興味深い知見である。浄水場 G の生物接触酸化試料のTRFLPパターンは、原水よりも活性炭試料のパターンに類似していた。浄水場 A と B の逆洗前後の活性炭試料のパターンには大きな変化は見られなかった。浄水場 A と G における使用期間の異なる活性炭試料については、浄水場 A では差異がほとんどなかったものの、浄水場 G では、5ヶ月間使用した活性炭と13年間使用した活性炭のTRFLPパターンには差異が認められた。

18S rDNA のTRFLPパターンについても、16S rDNA と同様に解析した結果、原水試料は地点間の差異が大きかったが、活性炭試料（逆洗前後、使用期間の差異を含む）については、浄水場 E の活性炭を除いて近接してプロットされ、相互に類似していることが示唆された。浄水場 G の生物接触酸化試料は、活性炭試料よりも浄水場 D の原水のパターンと類似していた。

4. 結論

- 1) オゾン-活性炭処理を導入している全国7箇所の浄水場の活性炭試料の付着細菌数を評価したところ、浄水場によらずほぼ 10^8 - 10^9 cells/g（湿重量）の細菌が付着していた。また、浄水場 A, B では、逆洗工程によって全菌数はそれぞれ 36%、64% に減少した。
- 2) 16S rDNA、18S rDNA を対象として、原水、活性炭、生物接触酸化担体の真正細菌群集、真核生物群集をTRFLP法によって解析した。その結果、16S rDNA、18S rDNA とともに、原水試料の微生物群集構造は地点間によるばらつきが大きいものの、活性炭試料では浄水場間の差異は比較的小さく、類似した微生物群集構造が構築されている傾向が示された。

今後は、微生物群集の構造特性に加え、機能特性などについても研究を進める予定である。

謝辞 試料の採取にご協力いただいた各水道事業者の方々に深謝いたします。

35

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 大河内由美子, 高橋恭介, 小寺恵介, 伊藤 禎彦

Detection of endotoxin in environmental water and evaluation of formation from bacterial cells by chlorination

Kyoto Univ. Yumiko OHKOUCHI, Kyosuke TAKAHASHI, Keisuke KODERA, Sadahiko ITOH

微生物に由来する免疫毒性物質としてエンドトキシンに着目し、大腸菌細胞からのエンドトキシン生成を定量的に調べた。また、琵琶湖・淀川水系におけるエンドトキシン濃度の分布状況と微生物量との関係を調べた結果、下水処理施設放流水の影響により環境水中濃度が上昇することを指摘し、また環境水中の微生物一細胞当たりのエンドトキシン活性は 1.13×10^{-3} (EU/cell) であることを示した。微生物さらに、塩素処理により微生物細胞が不活化された場合にも、エンドトキシン活性の増大が起こりうること、また遊離エンドトキシン化することで溶存態有機物画分へと移行することを示した。

キーワード：エンドトキシン, 塩素処理, 環境水, 大腸菌

Keywords : endotoxin, chlorination, environmental water, *Escherichia coli*

1. はじめに

現行の水質基準では、感染症リスク低減のための微生物指標として一般細菌 / 大腸菌数が設定されており、塩素剤を注入・残留させることで病原性細菌の増殖能を抑制、感染症リスクを低下させている。このように、塩素消毒は微生物の増殖能抑制に優れた効果を発揮する一方で、消毒過程において生成する副生成物による健康影響問題が指摘されてきた。しかしながら、原水中に混入する多種多様な微生物は、浄水処理操作によりある程度除去されるものの、一部は不活化された状態や増殖能が低下した状態 (Viable but nonculturable; VBNC 状態) で水道水中に残存しており、配水過程における再増殖やバイオフィーム形成などの問題が指摘されるとともに、より適切な微生物指標・有機物指標が求められている。

そこで本研究では、微生物が有する高分子化合物、特にグラム陰性細菌・シアノバクテリアの細胞外膜構成物質 (リポ多糖; LPS) に起因する生物活性 (エンドトキシン) に着目する。特に、モデル微生物からのエンドトキシン生成量を把握するとともに、環境水あるいは水道水中のエンドトキシン活性量および存在形態を明らかにする。さらに、塩素処理によるこれらの変化を詳細に調べることで、水道水質におけるエンドトキシン管理の必要性について考察する。エンドトキシンは強い免疫反応を惹起することが知られており、本来、生体は微量のエンドトキシン曝露により自然免疫を獲得すると考えられる。しかし、年々アレルギー疾患が増加している現代においては、攪乱された免疫システムが新たなアレルギー症状を誘発する危険をはらんでいるため、日常生活におけるエンドトキシン曝露とアレルギー反応との関連性¹⁾に強い関心が持たれている。

2. 実験方法

大腸菌細胞 (*E. coli* NBRC 3301) に由来するエンドトキシン

E. coli NBRC3301 を $36^{\circ}\text{C} \cdot 120(\text{rpm})$ で振盪培養し、対数増殖期における培養液中の総エンドトキシン・遊離エンドトキシン・微生物量の定量を行った。エンドトキシン活性は、カプトガニ血球抽出成分 LAL (エンドスピーシー ES-50M, 生化学工業) を使用したエンドポイント比色法 (トキシカラー DIA-MP, 生化学工業) により測定し、*E. coli* O113:H10 由来のエンドトキシン標準品を用いて検量線を作成した。培養液全面分を使用して総エンドトキシン活性を測定すると共に、培養液を $14,000(\text{rpm})$ で 10 分間遠心分離した上清画分を遊離エンドトキシン測定に供した。微生物量の定量は、標準寒天培地および R2A 寒天培地を用いた平板培養法、ならびに DAPI (4',6-diamino-2-phenylindole) 蛍光染色法により行った。

環境水・水道水中のエンドトキシン調査

図 1 に示す琵琶湖淀川水系 (琵琶湖疏水を含む) の各地点で採水を行い、試料中のエンドトキシン濃度と微生物量 (平板培養計数ならびに DAPI 計数) を測定した。採水は冬季 (2005 年 12 月 ~ 2006 年 2 月) に実施

した。採水瓶は予め 250°C, 2 時間の乾熱滅菌処理を行って使用し, 採水後の試料は低温で輸送後直ちに微生物量・TOC 測定に供した。

塩素処理によるエンドトキシン活性の変化

大腸菌懸濁液および宇治川河川水を塩素処理することにより, エンドトキシン活性の変化を調べた。まず, 対数増殖期にある *E. coli* NBRC3301 を遠心分離により集菌した後に, 67mM リン酸緩衝液 (pH7.0) を用いて洗菌, 同緩衝液に再懸濁した (1.57×10^6 (cfu/mL))。各バイアルに大腸菌懸濁液を分注し, 次亜塩素酸ナトリウム溶液を初期濃度が 0 ~ 10.0 (mgCl₂/L) となるよう添加し, 室温・暗所で塩素処理を行った。反応開始 0.5 および 24 時間後にサンプリングし, チオ硫酸ナトリウム添加により残留塩素を消去した後に, 従属栄養細菌数の計数, 残留塩素濃度の測定ならびに総エンドトキシン・遊離エンドトキシンの測定をそれぞれ行った。同様に, 宇治川試料水に次亜塩素酸ナトリウムを 0 ~ 5.0 (mg Cl₂/L) となるよう添加し, 24 時間の塩素処理を行い, 各エンドトキシン測定を行った。

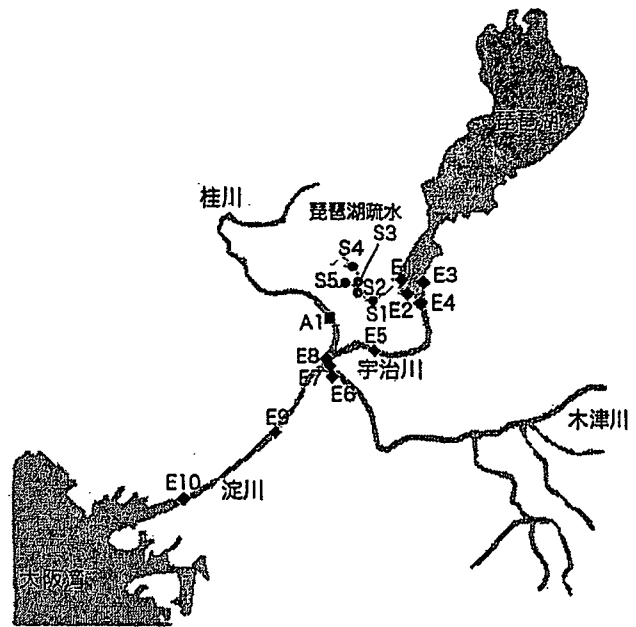


図1 琵琶湖・淀川水系における採水地点

3. 実験結果と考察

大腸菌細胞 (*E. coli* NBRC 3301) に由来するエンドトキシン

各手法で計数した微生物量と総エンドトキシン活性の相関を図2に示す。いずれの計数方法においても, 微生物量が増大するにつれてエンドトキシン活性も増大する傾向が確認できる。R2A 寒天培地あるいは DAPI 蛍光染色による微生物計数結果 (x) と総エンドトキシン (y) の間に, 比較的高い相関 (それぞれ R²=0.481, R²=0.631) が得られた。本実験では, 対数増殖期にある微生物細胞を使用しているため, 増殖可能菌数 = 全菌数と仮定して R2A 平板培地を用いた微生物量に基づいて大腸菌一細胞当たりのエンドトキシン活性を試算すると, 5.64×10^{-3} (EU/cell) (大腸菌 1.0×10^8 (cells/mL) のとき) となった。

環境水・水道水中のエンドトキシン調査

各試料のエンドトキシン測定結果を表1に示す。琵琶湖および河川水中のエンドトキシン濃度は $3.11 \times 10^2 \sim 2.43 \times 10^3$ (EU/mL) の範囲に分布した。一方, 下水処理場放流水のエンドトキシン濃度は 1.08×10^4 (EU/mL) と環境水と比べて高い値を示し, 自然水で 2000 EU/mL 前後の高い値を示した地点, E3, E7 および E8 はいずれも下水処理放流水の影響を強く受ける地点であった。この結果より, 取水口が下水処理放流水口近くに存在する場合には, 原水中のエンドトキシン濃度が 1 オーダー程度増大する可能性があることから, 水資源の循環利用を行っていくうえでは, 生菌数のみならずエンドトキシンなどの微生物由来化学物質にも着目することが望ましいと考えられる。

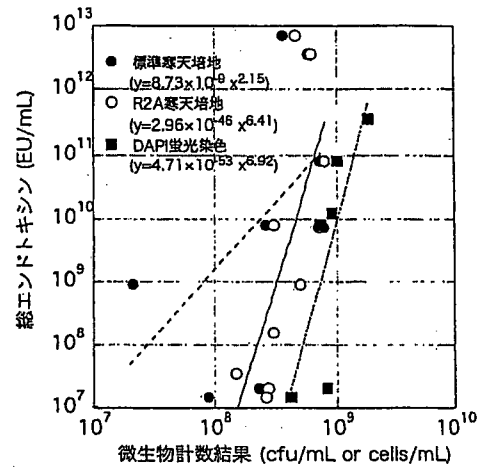


図2 各手法で計数した大腸菌数と総エンドトキシンの関係

表1 各採水地点におけるエンドトキシン濃度

	水系	採水地点	総Et (EU/mL)	遊離Et(EU/mL)	遊離Et/総Et比
E-1	琵琶湖南湖	大津港	4.28×10^2	2.20×10^2	0.514
E-2	琵琶湖南湖	なぎさ公園	3.31×10^2	2.30×10^2	0.695
E-3	琵琶湖南湖	矢橋	2.43×10^3	3.30×10^2	0.136
E-4	瀬田川	瀬田唐橋	3.11×10^2	2.25×10^2	0.723
E-5	宇治川	宇治橋	3.11×10^2	1.92×10^2	0.617
E-6	木津川	三川合流地点	6.21×10^2	1.77×10^3	>1
E-7	宇治川	三川合流地点	2.03×10^3	8.26×10^2	0.407
E-8	桂川	三川合流地点	1.80×10^3	4.80×10^2	0.267
E-9	淀川	枚方大橋	1.51×10^3	2.87×10^2	0.190
E-10	淀川	豊里大橋	3.40×10^2	2.50×10^2	0.735
S-1	琵琶湖第一疏水	洛東高校前	6.27×10^2	1.18×10^3	>1
S-2	琵琶湖疏水	蹴上	1.55×10^2	1.82×10^2	>1
S-3	疏水分線	若王子橋	1.46×10^2	1.77×10^2	>1
S-4	疏水分線	一乗寺西橋	1.16×10^2	2.95×10^2	>1
S-5	琵琶湖疏水	冷泉橋	2.57×10^2	1.94×10^2	0.755
A-1		下水処理場放流水	1.08×10^4	1.26×10^3	0.117

琵琶湖疏水のエンドトキシン濃度は $1.16 \times 10^2 \sim 6.13 \times 10^2$ (EU/mL) と比較的低い値を示した。総エンドトキシンに対する遊離エンドトキシンの比率は試料間で大きく異なるが、特に水深の浅い琵琶湖疏水では遊離エンドトキシンが総エンドトキシンを上回るケースが多かったことから、紫外線による微生物細胞膜の損傷によりエンドトキシンの遊離化が進んだと考えられる。また、京都市内の水道水中のエンドトキシン濃度は 1.41 ~ 21.9 EU/mL の範囲にあり、浄水処理により琵琶湖疏水濃度の 1/10 程度に低下していたが、遊離エンドトキシンが総エンドトキシンに占める割合は 0.7 以上と高い値を示した。

続いて、異なる 3 手法による微生物計数結果と総エンドトキシンの関係を図 3 に示す。いずれの試料においても、標準平板培地 < R2A 平板培地 < DAPI 蛍光染色の順に微生物検出量が増大し、特に水道水試料中の DAPI 蛍光染色法による全菌数は約 1×10^5 (cells/mL) と計数された。しかし、各手法による微生物検出数が増大するにつれて、総エンドトキシンも増大する傾向にあるものの明確な相関は認められなかった。このように、エンドトキシンは VBNC 微生物も含めた "微生物汚染の可能性" を示す指標として有用である反面、水中微生物量の指標として代用することは困難である。その理由として、1) 環境水中には VBNC 微生物を始めとした種々の微生物 (LPS 構造を持たないグラム陽性細菌を含む) が共存しており、微生物種ごとにエンドトキシン活性を左右する Lipid A の組成が異なる点²⁾ とともに、2) 環境微生物群の細胞外膜の状態は多様であり遊離エンドトキシンの存在が大きく影響している点が挙げられる。

さらに、DAPI 蛍光染色による微生物計数結果に基づいて環境試料 (10^6 cells/mL) 中の微生物一細胞当たりのエンドトキシン活性を試算すると、 1.13×10^{-3} (EU/cell) となった。前述の大腸菌一細胞当たりのエンドトキシン量と比較すると、環境水中の微生物群に起因する一細胞当たりのエンドトキシンは大腸菌の 1/5 程度の値を示すことが明らかとなった。

塩素処理によるエンドトキシン活性の変化

大腸菌懸濁液 (実験開始時の総エンドトキシン: 2.92×10^4 (EU/mL), 遊離エンドトキシン: 30.1 (EU/mL)) を塩素処理した場合の各エンドトキシン活性の変化を図 4 に示す。集菌・洗菌過程で培養液を除去しているため、塩素処理開始時には遊離エンドトキシンがほとんど存在しない状況である。塩素処理試料の大腸菌不活化を R2A 寒天培地を用いて調べたところ、0.5 時間後には塩素注入濃度 1.0 (mg Cl₂/L) 以上で、24 時間後には 0.5 (mg Cl₂/L) 以上で完全に不活化されていた。総エンドトキシン活性は塩素処理開始 0.5 時間後には塩素注入濃度 7.5 (mg Cl₂/L) までの範囲において塩素濃度に依存して増大し、最大 4.22×10^5 (EU/mL) と 14.5 倍の値を示した。一方、遊離エンドトキシンの顕著な増減は見られなかった。塩素処理開始 24 時間後には、総エン

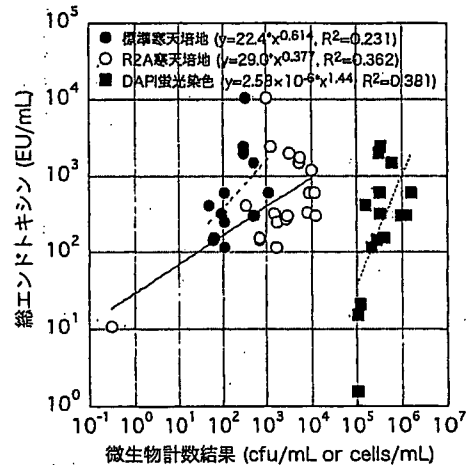


図 3 各手法で計数した環境微生物数と総エンドトキシンの関係

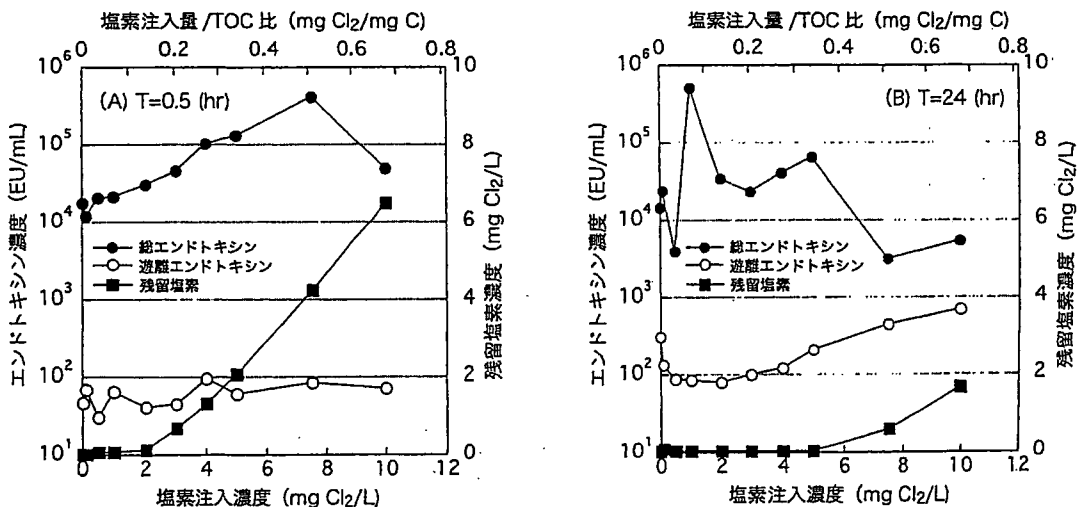


図 4 *E. coli* NBRC3301 懸濁液を塩素処理した場合のエンドトキシン活性の変化 (A) 塩素処理開始 0.5 時間後, (B) 24 時間後

ドトキシン活性が塩素注入濃度 1.0mg Cl₂/L) において 5.14×10^5 (EU/mL) に達したものの、残留塩素が検出される濃度範囲では活性低下が見られた。その反面、遊離エンドトキシン活性は塩素注入濃度に伴い増大し、699 (EU/mL) まで増大した。

これらの結果を総合すると、塩素処理により細胞膜が損傷を受けて不活化されるのに対して、LPS が微生物細胞膜に結合した状態のまま高いエンドトキシン活性を示すように変化することになる。この生物活性の増強は、エンドトキシンの活性部位とされる Lipid A の露出量増加または LPS の低分子化などにより起こると考えられる。塩素処理をさらに継続すると、結合エンドトキシンの一部が水中に放出されて遊離エンドトキシン化する一方で、一部の結合エンドトキシンが不活性化される。残留塩素が検出される条件下では総エンドトキシン活性が低下する反面、遊離エンドトキシン活性は顕著に増加する点が特徴的であり、遊離エンドトキシンが塩素による不活性化を受けにくい可能性も指摘できる。

また、宇治川から採取した河川水 (実験開始時の総エンドトキシン: 538 (EU/mL), 遊離エンドトキシン 147 (EU/mL)) を同様に塩素処理した場合の 24 時間後の各エンドトキシン活性を図 5 に示す。前述の対数増殖期の大腸菌懸濁液と比較して、環境微生物群は種々のストレスにより細胞膜に損傷を受けるため、表 1 に示したように遊離エンドトキシンの割合が元来高くなっている。しかしながら、塩素処理により総エンドトキシン活性は全ての試料において低下したのに対して、遊離エンドトキシン活性は全ての試料で増加し、塩素注入濃度 1.5 (mg Cl₂/L) 以上の範囲では総エンドトキシン活性を上回る値が得られた。これらの結果は、塩素処理により細胞膜に結合した状態のエンドトキシンが遊離エンドトキシン化すること、すなわち浄水処理プロセスならびに給配水過程においては溶存態有機物画分に活性の多くが存在することを示しており、実際の水道水からのエンドトキシン検出結果とも一致する。また、本実験の結果より、塩素注入量を適正化することで各形態毎のエンドトキシン活性増大を制御可能であることが示唆されるが、浄水処理プロセスにおける遊離エンドトキシンの挙動は明らかにされておらず、今後は除去特性も考慮したうえで微生物由来の有機物制御を行う必要がある。

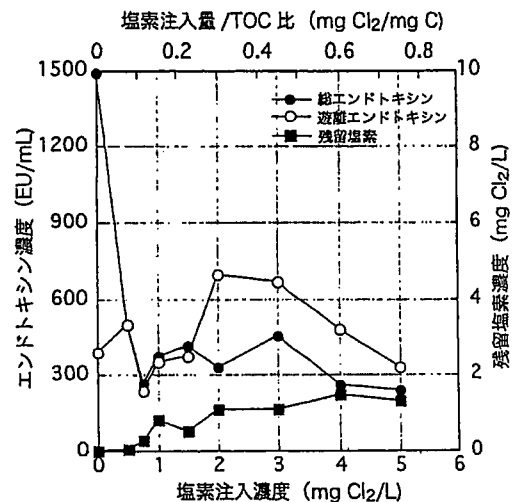


図 5 河川水を塩素処理した場合のエンドトキシン活性の変化

4. 本研究の結論

本研究では、モデル微生物として大腸菌細胞に由来するエンドトキシン活性を定量的に調べるとともに、琵琶湖・淀川水系における各地点の環境水、ならびに水道水中のエンドトキシン活性を調べた。その結果、下水処理放流水は 10000 (EU/mL) を超える高いエンドトキシン活性を示すこと、処理水放流口付近では環境水中の濃度も 10 倍程度増大することがわかった。また、環境水中の微生物一細胞当たりのエンドトキシン活性は、 1.13×10^{-3} (EU/cell) と計算された。さらに、大腸菌または環境水試料を塩素処理した場合のエンドトキシン活性の変化を調べたところ、塩素により細胞膜が損傷を受けて微生物が不活化されるのに対して、エンドトキシン活性は逆に増強されうること、塩素処理によりエンドトキシンの遊離化が促進されることを示した。なお、本調査は冬季に実施したものであるが、琵琶湖では春～夏季にかけて藍藻類やピコプランクトンが繁殖することが知られており、これらの微生物細胞に由来するエンドトキシン活性も報告されていることから³⁾、原水中・水道水中のエンドトキシン活性の季節変動の把握が今後の課題として挙げられる。

参考文献

- 1) Reed, C. E., Milton, D. K.: Endotoxin-stimulated innate immunity: A contributing factor for asthma. *J Allergy Clin Immunol*, 108(2), p.157-66, 2001
- 2) Rietschel, E. T. *et al.*: Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. *FASEB J*, 8(2), p.217-25, 1994.
- 3) Rapala, J. *et al.*: Endotoxins associated with cyanobacteria and their removal during drinking water treatment.

Influence of Backwashing on the Microbial Community in a Biofilm Developed on Biological Activated Carbon Used in a Drinking Water Treatment Plant

I. Kasuga^{*,**}, D. Shimazaki^{*} and S. Kunikane^{*}

^{*} Department of Water Supply Engineering, National Institute of Public Health, 2-3-6 Minami, Wako City, Saitama 351-0197, Japan. Tel: +81 48 458 6276. Fax: +81 48 458 6275.

^{**} Corresponding author. Current Address: Department of Urban Engineering, The University of Tokyo, 7-3-1, Hongo, Bunkyo, Tokyo 113-8656, Japan. Tel: +81 3 5841 6263. Fax: +81 3 5841 8529. E-mail: kasuga@env.t.u-tokyo.ac.jp

ABSTRACT

The influence of backwashing on the biofilm community developed on biological activated carbon (BAC) used in a drinking water treatment plant was investigated by means of bacterial cell enumeration and terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) fingerprinting analysis of bacterial and eukaryotic ribosomal RNA genes (rDNA). After backwashing, the attached bacterial abundance in the top layer of the BAC bed decreased to 64% of that before backwashing. The community level changes caused by backwashing were examined through the T-RFLP profiles. In the bacterial 16S rDNA analysis, the relative abundances of some terminal-restriction fragments (T-RFs) including the *Planctomycetes*-derived fragment increased; however, the relative abundances of some T-RFs including the beta-*Proteobacteria*-derived fragments decreased. In the eukaryotic 18S rDNA analysis, the relative abundances of some T-RFs including the protozoan *Cercozoa*-derived fragments increased; however, the relative abundances of some T-RFs including the metazoan *Chaetonotus*- and *Paratripyla*-derived fragments decreased. The T-RFLP analysis suggests that backwashing can cause changes in the relative compositions of microorganisms in a BAC biofilm in the top layer of the bed.

KEYWORDS

Backwashing; biological activated carbon; microbial community; ribosomal RNA gene; terminal-restriction fragment length polymorphism

INTRODUCTION

Ozonation followed by granular activated carbon (GAC) adsorption has been widely used as one of the promising advanced drinking water treatments. This hybrid method is originally based on chemical oxidation and physical adsorption. However, it has been found that various microorganisms form biofilms on the surface of GAC and contribute to the treatment by biological oxidation of organic pollutants and ammonia (LeChevallier *et al.*, 1992; Kim *et al.*, 1997; Takeuchi *et al.*, 1997; Lehtola *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2002; Volk and LeChevallier, 2002). Such a biologically enhanced GAC system is known as "biological activated carbon" (BAC) (Wilcox *et al.*, 1983; Suzuki, 1997).

Usually, backwashing is periodically carried out during BAC treatment by blows of water and air to remove accumulated pollutants and to control biofilm abundance. If the biofilm abundance exceeds an optimal level, there is a concern that some amount of microorganisms in the biofilm may be stripped off from BAC into the following distribution systems (Morin and Camper, 1997). On the other hand, an extensive loss of the biofilm would lead to deterioration in the performance of the biological treatment. Recently, a simulation model was developed for drinking water biofilters that remove biodegradable

organic matter by taking the periodic backwashing frequency into account (Hozalski and Bouwer, 2001). In the conventional operation of drinking water treatment plants, however, the frequency of backwashing has been most often determined empirically without sufficient knowledge of the biofilm associated with BAC. In order to fully understand the effect of backwashing on BAC treatment, it is necessary to investigate the manner in which the microbial community in a BAC biofilm is influenced by backwashing. It is possible that the community structure consisting of bacteria and eukaryotes would be different before and after backwashing. Some microorganisms that reside in the inner layer of the biofilm or have a high affinity of attachment to GAC are likely to remain after backwashing.

In this study, we applied terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis to evaluate the effects of backwashing on biofilm community of BAC samples in a drinking water treatment plant in Japan. The T-RFLP analysis of ribosomal RNA genes (rDNA) is one of the effective fingerprinting tools for investigating microbial community structures (Liu *et al.*, 1997). Here, we compared the bacterial and eukaryotic T-RFLP profiles obtained from the BAC samples before and after backwashing by targeting 16S rDNA for the bacterial community and 18S rDNA for the eukaryotic community.

METHODS

Drinking water treatment plant

A drinking water treatment plant in Japan was investigated in this study. Approximately one million m³ day⁻¹ of purified water is produced from river surface water in this plant. The plant employs an advanced treatment process of coagulation, followed by sedimentation, rapid sand filtration, ozonation, BAC treatment, chlorination, and secondary rapid sand filtration. Additional chlorination is conducted before coagulation (pre-chlorination) or after the secondary sand filtration (post-chlorination) depending on various situations. In most cases in Japan, an ozonation-BAC system is installed before or after a rapid sand filtration. However, the ozonation-BAC unit of this plant is installed between two rapid sand filtration steps to decrease inflowing pollutant loads and to remove activated carbon particles released from the BAC bed. The activated carbon used in the plant is made of coal with an average diameter of 0.7 mm. Water is introduced downwards into the fixed BAC bed of 2.5-m depth. The contact time is approximately 15 min. The BAC bed is backwashed with air for 5 min followed by drinking water produced for 17 min every four days. The bed expansion during the backwashing is kept at 30%.

Sampling

In August 2005, BAC samples were collected from the top layer of BAC bed that had been consecutively used for nine months. Residual free chlorine was not detected in the influent water of the ozonation-BAC system. At the time of sampling, four days had passed since the last backwashing (i.e., immediately before the next backwashing). First, the "BAC sample before backwashing" was collected. After the backwashing operation, the "BAC sample after backwashing" was collected from the same top layer of the BAC bed. These samples were kept in sterilized plastic tubes containing the on-site water. They were kept in a cold box, transported to the laboratory within 1 h, and treated immediately.

Enumeration of total bacterial cells

The wet BAC samples (4.0 g) were placed in sterilized plastic tubes containing 40 ml of Milli-Q water (Millipore, Billerica, MA). After vortex treatment for 1 min, sonication was carried out for 2 min twice to detach and disperse bacterial cells. After allowing them to settle for 10 min, an appropriate portion of the suspended bacterial cells in the supernatant was stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI), and the cells were enumerated by using a BX60 epifluorescence microscope

(Olympus, Tokyo, Japan).

DNA extraction from BAC samples

DNA was separately extracted from three 0.5-g portions of the BAC sample by using an UltraClean™ Soil DNA Kit (Mo Bio Laboratories, Inc., Carlsbad, CA). All three DNA extracts were combined to obtain a composite DNA extract.

PCR amplification of 16S and 18S rDNA fragments

For 16S rDNA amplification, the universal bacterial primer set with 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') and 1492R (5'-GGTACCTTGTACGACTT-3') primers was used (Lane, 1991). For 18S rDNA amplification, the universal eukaryotic primer set with 26F (5'-CTGGTTGATYCTGCCAGT-3') and 1514R (5'-GATCCTTCCGCAGGTTACC-3') primers was used (Winnepeninckx *et al.*, 1995; Strumberg *et al.*, 2000). The 5' ends of the forward primers (27F and 26F) were labeled with a 6-carboxyfluorescein-derived phosphoramidite fluorochrome (6-FAM). PCR amplification was conducted in triplicate by using an AmpliTaq Gold DNA Polymerase kit (Applied Biosystems, Foster City, CA). The thermal cycling conditions for both amplifications consisted of initial heat denaturation at 95°C for 10 min, followed by 30 cycles of denaturation at 94°C for 30 s, annealing at 55°C for 30 s, and extension at 72°C for 2 min. A final extension was then performed at 72°C for 10 min.

T-RFLP analysis

The triplicate PCR products were mixed and purified using a MinElute PCR Purification Kit (QIAGEN, Hilden, Germany). The DNA concentration was quantified using a NanoDrop® ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE). Restriction enzyme digestion was conducted in triplicate. The PCR product (100 ng) was digested with 10 U of *HhaI* (TaKaRa BIO Inc., Otsu, Japan) in a 20- μ l volume according to the manufacturer's instructions. The triplicate digested products were purified using a QIAquick Nucleotide Removal Kit (QIAGEN) and combined into a single tube. The 6-FAM-labeled fragments were analyzed with an ABI Prism® 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Fragment analysis was carried out by using GeneMapper™ v3.0 software (Applied Biosystems). The detection threshold for terminal-restriction fragments (T-RFs) was set to 100 relative fluorescent units (RFU) for the software. Relative abundances of T-RF peaks were calculated based on their peak areas.

Cloning and sequencing

The 16S rDNA and 18S rDNA fragments were amplified from the BAC sample before backwashing under the same thermal cycling conditions except that the forward primers were unlabeled. The PCR products were cloned using a QIAGEN PCR Cloning^{plus} Kit (QIAGEN). The sequences of positive clones of 16S rDNA and 18S rDNA were determined using a BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit ver 3.1 (Applied Biosystems) with an ABI 3100 Avant sequencer (Applied Biosystems). Clones with different sequences were reamplified with the labeled primer sets and analyzed by T-RFLP using the same procedure as the one described above to confirm their T-RFs. Sequence homology searches were performed at DNA Data Bank of Japan (DDBJ) using the BLAST network service. Suspected chimeric sequences were screened by using the “Bellerophon” online analysis (Huber *et al.*, 2004).

Nucleotide sequence accession numbers

The 16S and 18S rDNA sequences determined in this study have been submitted to the DDBJ/EMBL/GenBank databases under accession numbers AB237962–AB238010 and AB238109–AB238159, respectively.

RESULTS AND DISCUSSION

Attached bacterial abundance in BAC biofilms before and after backwashing

The average of the total bacterial cells attached to the BAC before backwashing was estimated as 1.3×10^9 cells g^{-1} (wet weight) (S.D. = 8.1×10^7 cells g^{-1}), while 8.3×10^8 cells g^{-1} (wet weight) (S.D. = 8.4×10^7 cells g^{-1}) remained after backwashing. The total bacterial cell count decreased to 64% by the backwashing treatment. This result shows that backwashing causes a considerable reduction in the bacterial abundance in the top layer of the BAC bed. Hozalski and Bouwer reported that 20–40% of the attached bacteria were removed from a laboratory-scale biofiltration apparatus, where sand and glass beads were used as filter media, by a 10-min backwashing with bed expansions ranging from 15–50% (Hozalski and Bouwer, 1998). Taking the periodic backwashing operation of the plant (every four days) into consideration, it is possible that the decreased BAC biofilm would return to its previous level by the time the next operation is performed.

Interpretation of T-RFLP profiles

The T-RFs in T-RFLP profiles reflect the compositional fingerprints of the bacterial or eukaryotic community in the top layer of the BAC bed. In this study, DNA extraction, PCR amplification, and restriction enzyme digestion were conducted in triplicate for each BAC sample to obtain representative and reproducible results. In addition, the amount of the PCR products that were digested was set to 100 ng, and the equal amounts of the digested products were loaded to electrophoresis for T-RFLP analysis. Thus, the T-RFLP profiles before and after backwashing were obtained under the same conditions. It is also reasonable to assume that biases inherent in the experimental procedures affect the results to the same degree. Therefore, a change found in the relative abundance of a specific T-RF peak before and after backwashing indicates that backwashing influences the relative dominances of the microorganisms corresponding to the T-RF.

T-RFLP analysis of 16S rDNA fragments

Figure 1 shows the electropherograms of the bacterial 16S rDNA T-RFLP profiles before and after backwashing. Both of the profiles mainly consisted of the identical T-RFs; however, some of the T-RFs had different peak areas between the two profiles. According to the clone analysis, T-RF4, T-RF11, and T-RF12 were derived from some *Burkholderiales*-related bacteria in the beta-*Proteobacteria* subclass. These T-RFs were dominant in the T-RFLP profile before backwashing. The *Burkholderiales*-related group has been reported to survive a conventional water treatment process (Hoefel *et al.*, 2005). The *Planctomycetes*-related clone corresponded to T-RF17. Although the *Planctomycetes* group is distributed in many habitats including biofilms in rivers, its ecological function is not well understood (Brunner *et al.*, 2004).

Figure 2 shows the differences in the relative abundances of the major 16S rDNA T-RFs before and after backwashing. After backwashing, the relative abundances of T-RF9 (unidentified) and T-RF17 (the *Planctomycetes*-derived fragment) increased by nearly twice; this implied that the relative dominance of the bacteria corresponding to these T-RFs increased in the community after backwashing.

Complementary to this, the relative abundances of the other major T-RFs decreased after backwashing, suggesting that the relative dominances of the bacteria corresponding to these T-RFs decreased due to backwashing. Particularly, the relative abundances of the beta-*Proteobacteria*-derived T-RFs decreased substantially from 15.1% to 11.0% for T-RF4, from 8.2% to 3.3% for T-RF11, and from 14.7% to 4.0% for T-RF12. It is evident from the enumeration of total bacterial cells and the T-RFLP profiles before and after backwashing that the abundance and relative composition of bacterial community in the top layer of BAC bed changed after backwashing. We can infer that direct exposure of the BAC in the top layer to