

図2 BrdU濃度の影響 (P17株)

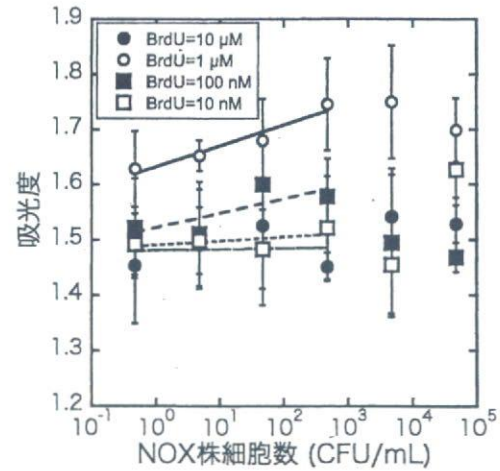


図3 BrdU濃度の影響 (NOX株)

義した。これらの図から、7時間培養後のBrdU標識DNA量は、R2A平板培地で計測したP17株およびNOX株の細胞数の対数値に比例して増加し、BrdU標識DNA量を測定することでR2A培地で検出可能な微生物濃度が算出できることがわかった。また、表1よりP17株では細胞数1 log当たりの吸光度変化量が0.04程度、NOX株では0.06程度と3回ともに比較的安定した値を示したため、本手法の再現性が示された。結果的にBrdUラベル化法を用いることによりR2A平板培地で検出可能な微生物数を2日間という短時間で測定可能となった。

しかしながら、バックグラウンド値がP17株では0.346-0.644、NOX株では0.352-0.596と大きく変化し、かつABTS試薬調製後経時的に増大する傾向がみられた。この原因の一つとして、保存中のABTSが徐々に酸化されている可能性がある。そのため、今後はバックグラウンド値を上昇させる要因を解明し、補正する手段を講じる必要がある。

さらに、図2および図3からほとんど場合微生物濃度が1000 CFU/mL以上の領域で吸光度が低下する傾向にあったことから、1000 CFU/mL付近が定量可能範囲の上限であると判断できる。また定量下限については0.5 CFU/mL付近となったことから、浄水中の従属栄養細菌数を測定するために十分な定量範囲が得られたと考えられる。

あくまでも本研究はモデル微生物を用いた検討であり、実際の水道水試料中に存在する微生物群とは

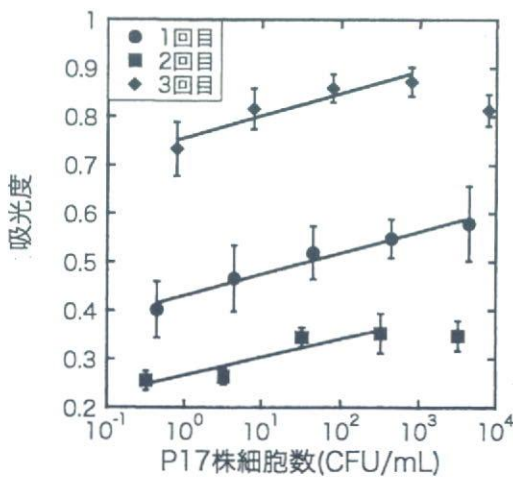


図4 P17株細胞数と吸光度の関係

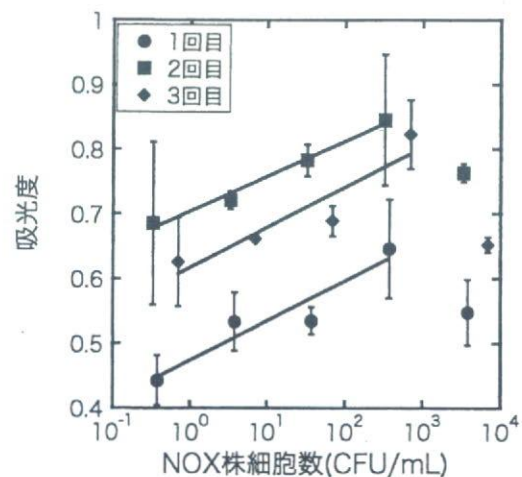


図5 NOX株細胞数と吸光度の関係

かなり異なる状況を対象としている。実試料では増殖速度の異なる微生物集団を対象とする必要があり、また消毒後の浄水では損傷微生物が多く存在するなどの特徴を有している。そのため、状態の異なる微生物群を対象として、できるだけ広範囲の微生物を測定可能な条件を選定する必要があるため、本研究で決定した条件を用いて浄水中の従属栄養細菌数の定量性を検討していくことが今後の課題となる。

表 1 同一測定条件における再現性の検討

菌株	測定回	細胞数1logあたりの吸光度変化量	バックグラウンド値
P17株	1回目	0.043	0.346
	2回目	0.038	0.405
	3回目	0.046	0.644
NOX株	1回目	0.061	0.352
	2回目	0.054	0.596
	3回目	0.062	0.493

#### 4. 本研究の結論

本研究では従属栄養細菌の迅速定量を目的として、*Pseudomonas fluorescens* P17 および *Aquaspirillum* sp. NOX を用いて、BrdU ラベル化法の適用可能性の検討を行った。その結果、得られた主要な知見を以下に示す。

- 1) BrdU ラベル化反応の反応条件、ならびに BrdU 標識 DNA の定量条件を決定した。
- 2) BrdU 標識 DNA 量は微生物の細胞数の対数値と比例関係にあり、再現性も確認された。
- 3) BrdU ラベル化法により R2A 平板培地を用いた培養結果を2日間程度で予測することが可能になった。
- 4) 測定回ごとのバックグラウンド値の変動が見られた。そして、この変動の要因を解明して測定値の補正を行う必要がある。
- 5) BrdU ラベル化法の微生物濃度定量範囲は検出下限が0.5 CFU/mL 付近、上限が1000 CFU/mL 付近となったことから、浄水中に存在する従属栄養細菌数を測定するために十分な測定範囲と判断された。

しかしながら、水道水試料は複数の微生物からなる集団を取り扱うため、決定した BrdU ラベル化法の測定条件をそのまま適用可能か否かは不明である。そこで決定した条件を用いた BrdU ラベル化法を水道水に対して適用し、その定量性を確認することが今後の課題となる。

#### 参考文献

- 1) 厚生科学審議会：水質基準の見直し等について（答申），2003
- 2) Hamasaki, K., Long, R. A. and Azam, F.: Individual cell growth rates of marine bacteria measured by bromodeoxyuridine incorporation, *Aquat. Microb. Ecol.*, Vol. 35, No. 3, pp. 217-227, 2004.
- 3) Nelson, C. E. and Carlson, C.A. : A nonradioactive assay of bacterial productivity optimized for oligotrophic pelagic environments, *Limnol. Oceanogr. Methods.*, Vol. 3, pp. 211-220, 2005.
- 4) Steward, G. F. and Azam, F.: Bromodeoxyuridine as an alternative to <sup>3</sup>H-thymidine for measuring bacterial productivity in aquatic samples., *Aquat. Microb. Ecol.*, Vol. 19, pp. 57-66, 1999.

キーワード：BrdU、従属栄養細菌、迅速定量、水道水、給配水システム

Key Words : BrdU, heterotrophic bacteria, rapid quantification, drinking water, distribution system



## CHARACTERIZATION OF ACTIVELY RESPIRING BACTERIAL COMMUNITY RESPONDING TO LABILE ORGANIC MATTER IN BIOLOGICAL DRINKING WATER TREATMENT

I. Kasuga<sup>1</sup>, H. Saito<sup>1</sup>, F. Kurisu<sup>2</sup>, H. Furumai<sup>2</sup>

<sup>1</sup>The University of Tokyo, Department of Urban Engineering, Bunkyo, Japan, <sup>2</sup>The University of Tokyo, Research Center for Water Environment Technology, Bunkyo, Japan

**Background and aims:** Biological activated carbon (BAC) filtration combined with ozonation has been used as an advanced drinking water treatment. Many studies have suggested that bacteria associated with BAC contribute to the removal of assimilable organic carbon (AOC) produced by ozonation. AOC including lower fatty acids promotes bacterial regrowth in distribution pipes. Thus, BAC filtration is effective to provide microbiologically-stable drinking water. However, little is known about bacteria responsible for AOC removal. This study aims to characterize bacterial community responding to labile lower fatty acids in BAC filtration.

**Methods:** Bacterial community associated with BAC was enriched with acetic acid, formic acid, and oxalic acid at equivalent concentrations, respectively. A control without addition of organic matter was prepared. Bacteria increasing respiratory activity during incubation were detected by 5-cyano-2,3-ditolyl tetrazolium chloride (CTC). They were fractionated and identified by using a flow cytometer followed by fluorescence in situ hybridization.

**Results:** The percentages of CTC-positive cells increased to 30-40% of total cell counts with the addition of three lower fatty acids, while it was approximately 15% in the control. The CTC-positive community was mainly dominated by *Betaproteobacteria* and *Planctomycetes*. The relative compositions were almost similar before and after incubation and among different enrichments. Our results indicate that no specialist was involved in the removal of specific lower fatty acids.

**Conclusions:** Bacteria associated with BAC increased their respiratory activity with the addition of lower fatty acids. The types of lower fatty acids have little impact on the compositions of the CTC-positive community.