

Figure 1 Changes in AOC concentration along the treatment process in a) plant A, b) plant B and c) plant C

observed after ozonation in all plants. This is because partial degradation of organic matter in raw water to more biodegradable forms [6]. AOC-NOX fraction was increased mostly in plant A and plant B. This observation is consistent with the other studies [7-10]. On the other hand, AOC-P17 fraction was increased after ozonation in plant C. Plant A and plant B receive raw water from the same river while plant C receives raw water from a different river. Thus, dissolved organic matter in raw water of plant C might have different composition, resulting in the different production pattern of AOC by ozonation. Reduction of AOC concentration by BAC filtration was observed in all plants. Although both of AOC-P17 and AOC-NOX fractions were highly removed, removal performances were different among plants. AOC reductions by BAC filtration followed the order of 155 µg acetate-C/l (73% reduction) in plant A, 111 µg acetate-C/l (53% reduction) in plant C and 58 µg acetate-C/l (53% reduction) in plant B. The largest AOC reduction in plant A could be due to longer retention time of BAC filtration in plant A (15 min) compared with plant B and plant C (12 min). However, AOC reduction in plant C was two times larger than that in plant B despite the same retention time. Thus, differences in retention time of BAC filtration are not directly associated with AOC removal efficiency.

3.2 Relationship between total microbial abundances of BAC and AOC removal

Total microbial cells on BAC-A, -B and -C were 4.4×10^8 , 9.0×10^8 and 5.1×10^8 cells/g-wet,

respectively. No large differences were observed among the BAC samples. Considering AOC removal rates of BAC filtration calculated by AOC concentration data in **Figure 1** and total microbial cells in the entire BAC bed, cell-specific activity of AOC removal can be estimated. The estimation demonstrated that cell-specific activities of AOC removal for BAC-A, -B and -C were 1.18, 0.27, and 0.91 fgC/cell/hr, respectively. Thus BAC-A offered the highest performance for AOC removal followed by BAC-C and BAC-B. However, total abundances include dead cells as well as live ones. Thus, we need to evaluate only viable or active microorganisms rather than total abundances to estimate more accurate activity.

3.3 Bacterial community structures in raw water and on BAC

Bacterial communities in raw water and on BAC were investigated by DGGE analysis (**Figure 2**). The DGGE result indicated that bacterial communities in raw water were similar among all plants. However, they were significantly different from communities on BAC, suggesting that communities on BAC were composed of bacteria which were not dominant in raw water. Some bands such as band 1 were common in all BAC samples while some bands were observed in only one BAC sample (e.g. band 2 in BAC-A, band 4 in BAC-B, band 5 in BAC-C). In addition, there were some common bands found in two samples (e.g. band 3 observed in both BAC-B and BAC-C).

In addition to DGGE analysis, T-RFLP analysis was applied to evaluate bacterial community structures of raw water and BAC samples. **Figure 3** shows T-RFLP profiles of raw water and BAC samples obtained by *HhaI* digestion. The T-RFLP profiles of raw water samples

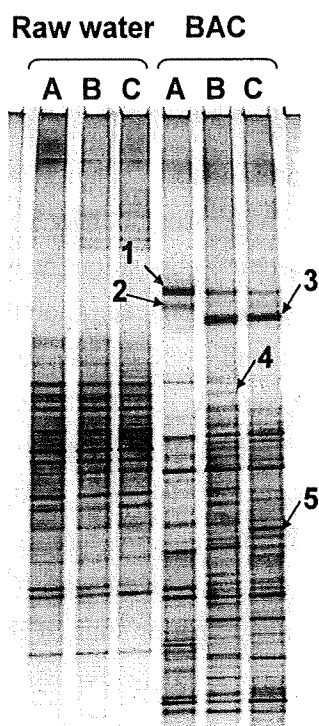


Figure 2 DGGE profiles of bacterial communities in raw water and on BAC

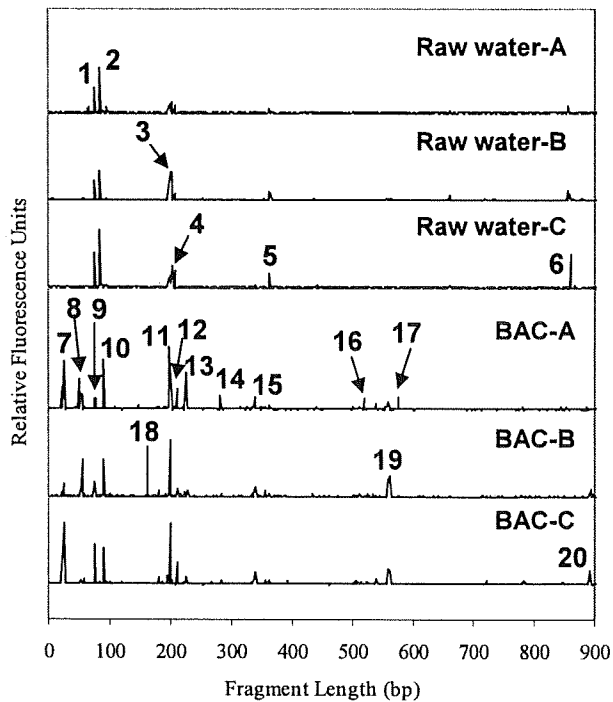


Figure 3 T-RFLP profiles obtained by *HhaI* digestion

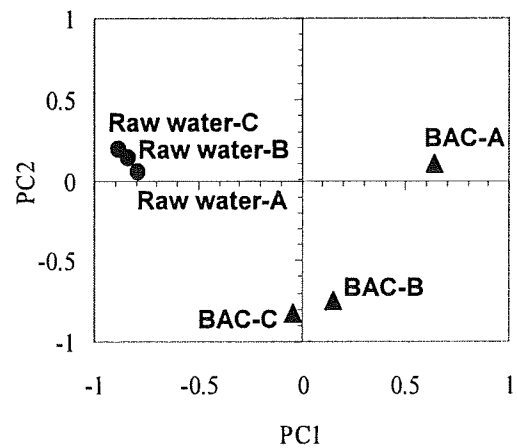


Figure 4 PCA analysis of T-RFLP profiles obtained by *HhaI* digestion

were similar among three plants. Major T-RFs detected are shown in **Figure 3** and **Table 1**. T-RF 1 to 4 were common fragments detected in all raw water samples. However, some fragments (T-RF 5 and 6) observed in raw water of plant C were not observed in plant A and B. This is probably because plant A and B receive raw water from the same river but plant C receives raw water from another river. On the other hand, the T-RFLP profiles of BAC samples were significantly different from those of raw water samples. It was in accordance with the DGGE results. Some T-RFs including T-RF 7, 9, 10, 11 and 15 were common in all BAC samples. However, some T-RFs only observed in each BAC sample were also found such as T-RF 13, 14, 16 and 17 in BAC-A, T-RF 18 in BAC-B and T-RF 20 in BAC-C. Principal component analysis (PCA) of the T-RFLP profiles obtained by *HhaI* digestion was applied to evaluate similarity of the profiles. The result of PCA is shown in **Figure 4**. Principal component 1 (PC1) separated the profiles of raw water samples from those of BAC samples. All raw water samples were grouped together. On the other hand, principal component 2 (PC2) separated BAC-A from BAC-B and BAC-C, indicating that community structure of BAC-A was different from those of BAC-B and BAC-C. The difference in service time of BAC (BAC-A: 4 years, BAC-B and BAC-C: 1 year) or retention time of BAC filtration (BAC-A: 15 min, BAC-B and BAC-C: 12 min) might have some influence on bacterial community structures.

The bacterial candidates corresponding to the major T-RFs were predicted by PAT software. In this analysis, three profiles obtained by *HhaI*, *MspI* and *RsaI* digestion were compared with the database of T-RFs of bacterial strains and clones generated by using the Microbial Community Analysis software (MiCA) (<http://mica.ibest.uidaho.edu/pat.php/>) [11]. We need to understand the limitation of this indirect estimation because closely related or phylogenetically different bacteria

Table 1 Bacterial candidates of major T-RFs in raw water and BAC predicted by PAT analysis

T-RF	Species match (Bacterial phylum information)	Raw water			BAC		
		A	B	C	A	B	C
1	Unidentified	✓	✓	✓	-	-	-
2	Unidentified	✓	✓	✓	-	-	-
3	chloroplast of <i>Palmaria palmata</i>	✓	✓	✓	-	-	-
4	<i>Polaromonas naphthalenivorans</i> CJ2 (<i>Chlorobi</i>)	✓	✓	✓	-	-	-
5	Unidentified	-	-	✓	-	-	-
6	Unidentified	-	-	✓	-	-	-
7	Unidentified	-	-	-	✓	✓	✓
8	Unidentified	-	-	-	✓	✓	-
9	<i>Clostridium piliforme</i> pRJ (<i>Firmicutes</i>)	-	-	-	✓	✓	✓
10	<i>Chlorobaculum tepidum</i> (T) (<i>Firmicutes</i>)	-	-	-	✓	✓	✓
11	<i>Pseudomonas</i> sp. BBCT8 (<i>Gammaproteobacteria</i>)	-	-	-	✓	✓	✓
12	<i>Catenibacterium mitsuokai</i> JCM 10611 (<i>Firmicutes</i>)	-	-	-	✓	-	✓
13	<i>Paenibacillus ourofinensis</i> AC13MSD (<i>Firmicutes</i>)	-	-	-	✓	-	-
14	Unidentified	-	-	-	✓	-	-
15	<i>Roseivivax halotolerans</i> (T) OCh 210T (<i>Alphaproteobacteria</i>)	-	-	-	✓	✓	✓
16	<i>Acidiphilium cryptum</i> JF-5 (<i>Alphaproteobacteria</i>)	-	-	-	✓	-	-
	<i>Microcystis holsatica</i> NIES-43 (<i>Cyanobacteria</i>)	-	-	-	✓	-	-
17	Unidentified	-	-	-	✓	-	-
18	Unidentified	-	-	-	-	✓	-
19	<i>Spiroplasma chrysopicola</i> (T) ATCC 43209 DF-1 (<i>Tenerecutes</i>)	-	-	-	-	✓	✓
20	<i>Leptotrichia amnionii</i> (<i>Fusobacteria</i>)	-	-	-	-	-	✓

could share fragments of the same length. The matching result is summarized in **Table 1**. T-RF 3 and 4 found in all raw water samples were probably derived from chloroplast of *Palmaria palmata* (eukaryotic algae) and *Polaromonas naphthalenivorans*, respectively. On the other hand, candidates for T-RFs (T-RF 9, 10, 11 and 15) observed in all BAC samples included bacteria in phylum *Firmicutes*, *Gammaproteobacteria* and *Alphaproteobacteria*. Moreover, T-RF 13 and 16 detected in only BAC-A were matched with *Firmicutes* and *Alphaproteobacteria* or *Cyanobacteria*, respectively. These bacterial candidates might be associated with higher AOC removal performance of BAC-A. However, relationship between community structures and AOC removal performances is still not clear because BAC-C could remove more AOC than BAC-B despite their community structures were similar as shown in **Figure 4**. Further study is required to identify community members on BAC and their activities and functions in terms of AOC removal.

4. CONCLUSION

This study compared the removal efficiency of AOC by BAC filtration in three advanced drinking water treatment plants in Japan. The influence of total microbial abundances and bacterial community structures of BAC on AOC removal efficiency was investigated. The AOC concentrations were increased after ozonation treatment and highly reduced after BAC filtration.

The highest AOC reduction was observed in plant A followed by plant C and plant B. This order was in accordance with the cell-specific activities of AOC removal estimated for the BAC samples. The community structures of BAC samples were significantly different from those of raw water samples. The community structure of BAC-A was different from those of BAC-B and BAC-C. The difference in service time or retention time of BAC filtration might have some influence on bacterial community structures. Identification of community members and elucidation of their activities and functions in terms of AOC removal are required to further understand the mechanism of AOC removal by BAC filtration.

REFERENCES

- [1] Rittmann B.E. and Snoeyink V.L. (1984). Achieving Biologically Stable Drinking Water. *Journal of American Water Works Association* **76**(10): 106-114.
- [2] Hu J.Y., Wang Z.S., NG W.J., and Ong S.L. (1999). The effect of water treatment processes on the biological stability of portable water. *Water Research* **33**(11): 2587-2592.
- [3] Zhang W. and DiGiano F.A. (2002). Comparison of bacterial regrowth in distribution systems using free chlorine and chloramine: a statistical study of causative factors. *Water Research* **36**: 1469-1482.
- [4] Van der Kooij D. and Veenendal H.R. (1995). *Determination of the concentration of easily assimilable organic carbon (AOC) in drinking water with growth measurements using pure bacterial cultures*, The AOC manual SWE 95.002, KIWA, Nieuwegein, Netherlands.
- [5] LeChevallier M.W., Babcock T.M. and Lee R.G. (1987). Examination and Characterization of Distribution System Biofilms. *Applied and Environmental Microbiology* **52** (12): 2714-2724.
- [6] Hammes F., Salhi E., Köster O., Kaiser H.P., Egli T., and Gunten U.V. (2006). Mechanistic and kinetic evaluation of organic disinfection by-product and assimilable organic carbon (AOC) formation during the ozonation of drinking water. *Water Research* **40**: 2275-2286.
- [7] Liu W., Wu H., Wang Z., Ong S.L., Hu J.Y., and Ng W.J. (2002). Investigation of assimilable organic carbon (AOC) and bacterial regrowth in drinking water distribution system. *Water Research* **36**: 891-898.
- [8] Polanska M., Huysman K., and Keer C.V. (2005). Investigation of assimilable organic carbon (AOC) in Flemish drinking water. *Water Research* **39**: 2259-2266.
- [9] Chien C.C., Kao C.M., Dong C.D., Chen T.Y., and Chen J.Y. (2007). Effectiveness of AOC removal by advanced water treatment system: a case study. *Desalination* **202**: 318-325.
- [10] Chien C.C., Kao C.M., Chen C.W., Dong C.D., and Wu C.Y. (2008). Application of biofiltration system on AOC removal: Column and field studies. *Chemosphere* **71**: 1786-1793.
- [11] Kent A.D., Smith D.J., Benson B.J., and Triplett E.W. (2003). Web-Based Phylogenetic Assignment Tool for Analysis of Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism Profiles of Microbial Communities. *Applied and Environmental Microbiology* **69** (11): 6768-6776.

(4-32) 生物活性炭立ち上げ時の微生物定着に及ぼす前塩素処理の影響

○春日 郁朗(東京大学) 中垣 宏隆(東京大学)
 栗栖 太(東京大学) 古米 弘明(東京大学)
 関 哲雄(千葉県水道局)

1. 研究の背景と目的

現在、高度浄水処理としてオゾン-生物活性炭 (BAC : Biological Activated Carbon) 処理の導入が各地で進められている。BAC 処理では、有機物の物理吸着に加えて、活性炭表面に定着した微生物による有機物の分解やアンモニア性窒素の酸化 (硝化) などの生物学的作用による処理が期待されている¹⁾。一方、活性炭に微生物が定着することなく、物理化学的な吸着除去が支配的な処理は、粒状活性炭処理 (GAC : Granular Activated Carbon) と称して区別されている。水道施設設計指針等では、BAC と GAC を区別する条件として、前段における塩素処理の有無を挙げている。しかし、この定義は概念的な部分が多く、BAC における微生物定着過程に及ぼす塩素処理の影響についてはほとんど明らかにされていない。

千葉県水道局では、「おいしい水づくり計画」の主要施策の一つとして、オゾン-生物活性炭処理を導入した「ちば野菊の里浄水場」の運用を 2007 年より開始した。本浄水場では、当初、着水井における前塩素処理を行っていたが、運転開始 9 ヶ月後より前塩素処理を停止している。本研究では、ちば野菊の里浄水場の BAC に着目し、活性炭への全細菌、全古細菌、硝化微生物の定着過程を運用開始時から継続的にモニタリングした。その結果を踏まえて、前塩素処理の有無が、これらの微生物の定着にどのような影響を与えたのかを考察した。

2. 実験方法

ちば野菊の里浄水場 (給水能力 : 6 万 m³/日) は、江戸川を取水源とした高度浄水処理施設で、2007 年 10 月から運用を開始した。本浄水場では、「着水井→凝集沈澱→オゾン酸化→BAC→急速砂ろ過→配水池」という工程で処理が進められ、BAC 後に中塩素処理、急速砂ろ過後に後塩素処理による消毒が行われている。また、運転開始時より 2008 年 7 月 22 日までは、主に凝集効果の向上を目的として、前塩素処理が恒常的に行われていたが、同年 7 月 23 日からは前塩素処理を停止している。

本研究では、2007 年 10 月から 2008 年 11 月までおよそ一ヶ月間隔で、原水および逆洗直後の BAC (表層) を採取した。原水に含まれる微生物、BAC に付着する微生物の核酸をそれぞれ抽出した後、全細菌 (Bacteria)、全古細菌 (Archaea) の 16S rDNA のコピー数をリアルタイム PCR によって定量した。また、BAC の主要な機能である硝化能に着目し、従来、硝化を担う微生物として認識されてきたアンモニア酸化細菌 (AOB : Ammonia Oxidizing Bacteria) 及び、近年、新規に発見された硝化微生物であるアンモニア酸化古細菌 (Ammonia Oxidizing Archaea) のアンモニア酸化酵素をコードする *amoA* 遺伝子 (それぞれ、AOB-*amoA* 遺伝子、AOA-*amoA* 遺伝子) のコピー数も定量した。

3. 結果及び考察

図 1 に、2007 年 10 月から 2008 年 11 月にかけてのアンモニア性窒素濃度 (原水、凝集沈澱処理水、BAC 処理水) と着水井における前塩素注入率の推移を示す。原水中のアンモニア性窒素は、0.10mgN/L 以下であることが多かったが、特に 2008 年 1 月から 2 月にかけて 0.10mgN/L を超え、最大で約 0.30mgN/L にまで達した。前塩素処理を行っている間は、凝集沈澱処理水の段階でアンモニア性窒素が除去されていることが確認され

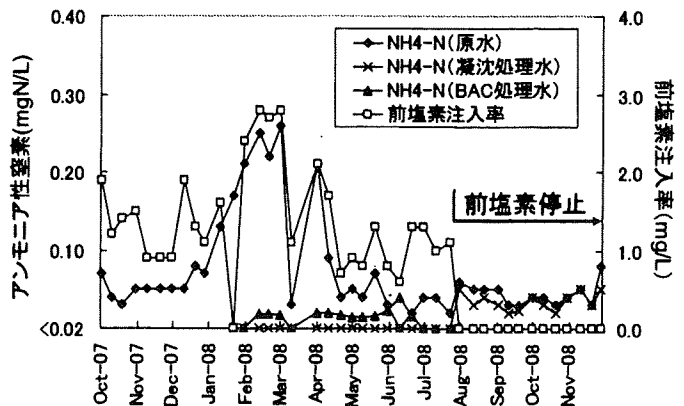


図 1 アンモニア性窒素濃度と前塩素注入率の推移

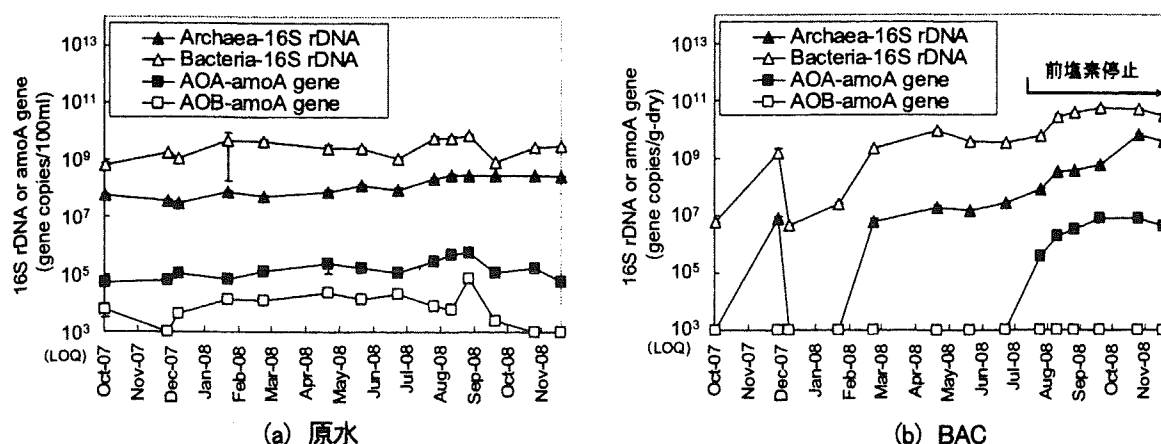


図2 原水(a)、BAC(b)における16S rDNA(全細菌、全古細菌)、amoA遺伝子(AOB、AOA)コピー数の推移

た。しかし、BAC 処理水については、原因は明らかではないが、定量下限付近の低濃度のアンモニア性窒素が検出されるという現象が2008年6月あたりまで見られた。2008年7月23日より前塩素処理を停止したところ、凝集沈澱処理水からアンモニア性窒素が検出されるようになったが、BAC 処理水からはアンモニア性窒素は検出されず、硝化反応が十分に進行していることが明らかにされた。

図2に、原水及びBACを対象とした16S rDNA(全細菌、全古細菌)、amoA遺伝子(AOA、AOB)の定量結果を示す。原水における16S rDNAのコピー数は、全細菌で約 10^9 gene copies/100mL、全古細菌で約 10^8 gene copies/100mLのオーダーで推移し、季節的な変動は見られなかった。AOA-、AOB-amoA遺伝子のコピー数については、通年でAOA-amoA遺伝子の方がAOB-amoA遺伝子よりも多く存在していた。

一方、BACについては、全細菌の16S rDNAが、運転開始直後から 10^6 gene copies/g-dry オーダーで検出された後、2008年11月には 10^{10} gene copies/g-dry オーダーまで増加した。全古細菌の16S rDNAについては、2008年2月までは定量下限以下になることがあるなど不安定であったが、それ以降は漸増し、2008年11月には 10^9 gene copies/g-dry オーダーに達した。全細菌、全古細菌ともに前塩素処理の停止の前後でコピー数が大きく変動するというのではなく、前塩素処理による定着阻害は見られなかった。ただし、今回の検出対象はDNAであり、微生物の活性の議論とは直接関連しないことにも注意する必要がある。一方、硝化微生物については、従来、BACにおける硝化を担っていると考えられてきたAOBのamoA遺伝子は通年で検出されなかった。AOAのamoA遺伝子についても、前塩素処理を行っている期間は検出されなかったが、前塩素処理を停止するとその直後から 10^5 gene copies/g-dry オーダーで検出され、2008年9月以降は 10^6 gene copies/g-dry オーダーにまで達して安定した。前塩素処理を停止してもBACでアンモニア性窒素が除去されていたことから、BACにおける硝化能の発現とAOAの動態は関連していることが推察される。また、硝化活性のあるBACにおいて、AOBよりもAOAが優占するという結果は、各地のBACを対象とした我々の既報とも一致した²⁾。今回の結果より、前塩素処理によって、BACで優占する硝化微生物であるAOAの定着は阻害されていたが、前塩素処理を停止すると速やかにその定着が促進されたことが明らかになった。

4. 結論

BACにおける微生物の定着過程に及ぼす前塩素処理の影響を評価したところ、全細菌、全古細菌レベルではその影響は見られなかった。一方、優占的な硝化微生物であるAOAはその影響を顕著に受けることが示された。特にBACの立ち上げ時には、前塩素処理の運用に注意を払うことが重要であると考えられる。

参考文献

- 1) 春日(2008)分子生物学的手法を用いた生物活性炭の微生物群集構造解析, 水, Vol.50-2, No.712, pp.17-23.
- 2) 中垣ら(2008)生物活性炭上のアンモニア酸化細菌・古細菌の多様性解析, 第42回水環境学会年会講演集, p.54.

(8-34) 培養法と分子生物学的手法を用いた給水末端における細菌群の多様性評価

○前田 裕太(東京大学大学院) 春日 郁朗(東京大学大学院)
栗栖 太(東京大学大学院) 古米 弘明(東京大学大学院)

1. 研究の背景と目的

2008年4月に、水質管理目標設定項目に従属栄養細菌(暫定目標値2000CFU/ml)が導入された。従属栄養細菌試験では、標準寒天培地よりも栄養濃度の低いR2A培地を用い、20±1℃、7日間という条件で培養することで、一般細菌試験よりも多くのコロニーが形成される。このため、消毒を含む浄水処理工程や配水系における微生物学的水質変化を評価する上で、従属栄養細菌は一般細菌よりも適しているとされている。しかし、現行の試験では、コロニー数のみを評価しており、その多様性については考慮していない。従属栄養細菌として検出される細菌の同定を行い、どのような水質条件下でそれらが検出されるのかを評価することで、従属栄養細菌指標の解釈をより明確にすることができると考えられる。本研究では、従属栄養細菌の種類や挙動といった基礎的なデータを得ることを目的とし、給水末端における従属栄養細菌の多様性を調査した。更に、分子生物学的手法も活用することで、培養法では検出されない細菌群についても評価を行った。

2. 実験手法

2007年12月~2008年1月に、同一の配水区にある3箇所の給水末端の蛇口(A:屋内一直結給水、B:屋内一貯水槽有り、C:屋外一直結給水)から試料を採水した。給水末端Aからは、放水開始直後、5L、10L、25L、50L放水後の水道水を個別に採水した。引き続き、同じ蛇口の使用を1週間停止した後、同様のサンプリングを行った。給水末端B、Cでは、放水直後と25L放水後の水道水を採水した。採取した水道水については、残留塩素濃度を測定すると共に、一般細菌数及び従属栄養細菌数を混釈法で計数した。また、メンブレン培養法によって同じ試料から従属栄養細菌を培養し、色、大きさの異なるコロニーを単離した。単離した株については、16S rDNA配列を決定して相同性検索を行った。一方、採水した試料を孔径0.2µmのポリカーボネートフィルターでろ過し、試料中の細菌群から核酸抽出を行った。抽出した核酸を鋳型として、真正細菌の16S rDNAを増幅し、Terminal-Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP:末端制限酵素断片長多型)によって、細菌群集の多様性を解析した。

3. 結果及び考察

図1に、給水末端Aにおける一般細菌数、従属栄養細菌数、遊離塩素濃度の変化を示す。実験開始時は、遊離塩素濃度0.04mg/L、一般細菌数10CFU/mL、従属栄養細菌数37CFU/mLであったが、5L放水すると遊離塩素濃度は0.29mg/Lに上昇し、一般細菌数と従属栄養細菌数は、それぞれ0CFU/mL、2CFU/mLに減少した。以降、放水を50L行ってもこれらの値に大きな変化は見られなかった。同一の給水末端を1週間使用停止すると、遊離塩素濃度は0.04mg/Lに低下したのに対して、従属栄養細菌数は318CFU/mLに増加していた。しかし、一般細菌数は0CFU/mLのままであった。5L放水すると、遊離塩素濃度は0.22mg/Lに回復した一方で、従属栄養細菌数は0CFU/mLに減少した。放水を25L行くと遊離塩素濃度は0.38mg/Lまで上昇した。この結果より、残留塩素濃度が低下した給水末端の水道水では、従属栄養細菌が増殖することが明らかになった。

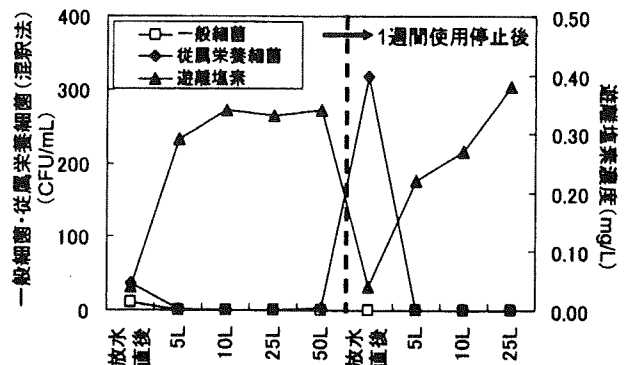


図1 放水に伴う一般細菌・従属栄養細菌数と遊離塩素濃度の変化(給水末端A)

表1 放水の経過に伴う従属栄養細菌の多様性の変化(給水末端A)

最近縁配列を有する細菌	給水末端A			
	実験開始時		1週間使用停止後	
	放水直後	25L放水後	放水直後	25L放水後
α -Proteobacteria	<i>Blastomonas</i> sp.	+		
	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	+		
	<i>Novosphingobium</i> sp.	+		
	<i>Sphingomonas</i> sp.	+		
	<i>Methylobacterium</i> sp.		+	+
	<i>Porphyrobacter</i> sp.		+	+
β -Proteobacteria	<i>Burkholderia</i> sp.	+		+
γ -Proteobacteria	<i>Luteibacter</i> sp.			+
Actinobacteria	<i>Mycobacterium</i> sp.		+	
	<i>Leifsonia</i> sp.			+
Sphingobacteria	<i>Sphingoterrabacterium</i> sp.			+
Bacilli	<i>Paenibacillus</i> sp.			+

+ : 単離された株

表1に、給水末端Aからメンブレン培養法によって単離した従属栄養細菌の多様性を示す。実験開始時の放水直後の試料からは、主に α -Proteobacteriaに属する細菌群が単離された。25L放水後の試料から単離された細菌群も主に α -Proteobacteriaであったが、それらは*Methylobacterium* sp.や*Porphyrobacter* sp.など、放水直後に得られた細菌群とは異なる属の細菌群であった。1週間停止後の放水直後の試料から検出された従属栄養細菌の細菌種は、実験開始時の細菌種とは大きく異なっていた。しかし、その後25L放水した後の試料からは、再び*Methylobacterium* sp.や*Porphyrobacter* sp.が検出された。この結果より、残留塩素が低減した給水末端で増殖する従属栄養細菌は、残留塩素が維持された水道水中に生残する従属栄養細菌とは異なることが示唆された。

図2に、給水末端A~Cにおける真正細菌群集構造をT-RFLPによって解析した結果を示す。給水末端Aにおいて見られるT-RFのうち、a~cは放水直後、50L放水後、放水直後(1週間後)のすべての試料から検出されたのに対して、放水直後の試料から検出されたdは、50L放水後、放水直後(1週間後)の試料からは検出されなかった。異なる細菌群から同一のT-RFが生成される可能性に注意する必要があるが、同種の細菌が試験期間を通じて優占して存在していた可能性が高い。このことは、従属栄養細菌の培養において、放水直後、25L放水後、1週間後でそれぞれ異なる細菌種が分離されたという結果とは異なるものである。a及びcは、給水末端B、Cの放水直後の試料からも検出されたが、これらは25L放水することでピーク強度が減少する傾向が見られ、給水末端付近でのみ増殖する細菌群に由来していることが示唆された。また、給水末端B、Cについては、400-550bp付近のT-RF群(e)に類似性が認められた。

4. 結論

3つの給水末端を対象として、細菌群の多様性を培養法と分子生物学的手法によって評価した。その結果、給水末端付近に滞留する水道水中では、残留塩素が維持された水道水中とは異なる細菌群が増殖するというを確認することができた。

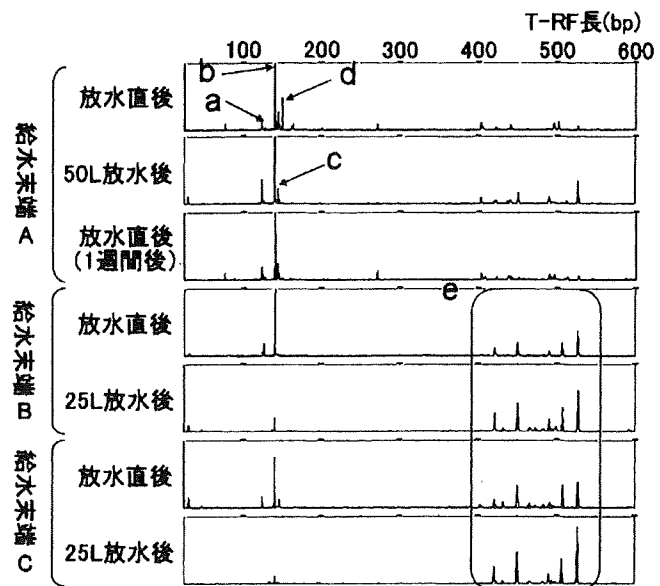


図2 放水経過に伴う細菌群集構造の変化(給水末端A~C)

Application of Stable Isotope Probing to Evaluate AOC Assimilating Bacteria Attached on BAC in Drinking Water Treatment Plant

Suwat SOONGLERDSONGPHA, Ikuro KASUGA Futoshi KURISU, Hiroyuki KATAYAMA, Hiroaki FURUMAI (Dept. Urb. Eng., the Univ. of Tokyo)

1. Introduction

Assimilable organic carbon (AOC) has been concerned as one of the factors causing bacterial regrowth in drinking water distribution system. It has been reported that biological activated carbon (BAC) filter can efficiently reduce AOC through biological oxidation. However, bacterial community associated with BAC involved in the AOC removal has not been understood well. This study aimed to evaluate AOC assimilating bacteria attached on BAC by DNA-based stable isotope probing (SIP) using ^{13}C -labeled acetate as a model substance of AOC.

2. Methods

2.1 Incubation of BAC with ^{13}C - and ^{12}C -acetate

BAC sample was collected from an advanced drinking water treatment plant which has been operated for two years. The BAC sample was incubated with 10 mgC/l of $^{13}\text{C}_2$ -acetate (99atom%; Cambridge Isotope Lab.) or ^{12}C -acetate in mineral medium at 20°C. Different incubation time conditions (24 hours and 48 hours) were compared.

2.2 Isopycnic centrifugation and fractionation

Density gradient centrifugation was performed in 4.9 ml polyallomer centrifuge tubes with an NVT65.2 Beckman rotor (Beckman, USA) spun at 45,000 rpm (178,000×g) for 68 hr at 20°C. Centrifugation medium was prepared by mixing 4.75 ml of 1.720 g/cm³ CsCl stock solution in gradient buffer (GB; 0.1 M Tris-HCl, pH8.0; 0.1 M KCl; 1 mM EDTA)¹⁾ with 0.15 ml of DNA extract. Centrifuged gradients were fractionated into 20 fractions (~250 μl) by paraffin liquid displacement. The buoyant density of each fraction was determined with an AR200 digital refractometer (Reichert, Japan). DNA was precipitated from CsCl solution with polyethylene glycol and resuspended in a 30-μl elution buffer. DNA concentration was measured with a Nanodrop spectrophotometer (Scrum, Japan).

2.3 Bacterial community analysis

Bacterial community structure in each gradient fraction was characterized by terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis. Bacterial 16S rRNA genes were amplified with a primer set of 27f labelled with 6-carboxyfluorescein and 907r. The purified product was digested with *HhaI* at 37°C for 6 hr. Separation of fluorescently labelled fragments was conducted with an ABI 3100 Prism Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA).

3. Results and discussion

3.1 DNA distribution in CsCl gradient fractions

Fig. 1 shows the distribution of ^{12}C - and ^{13}C -DNA in the CsCl gradient fractions prepared from the samples incubated for 48 hours. Although ^{12}C - and ^{13}C -DNA were not clearly separated in case of 24 hours of incubation, separation of ^{13}C -DNA from ^{12}C -DNA was improved by extending incubation time to 48 hours as shown in Fig. 1. This result suggests that 24 hours of incubation was not enough for bacteria associated with BAC to assimilate acetate well.

3.2 Comparison of T-RFLP profiles

Fig. 2 shows T-RFLP profiles in the different CsCl gradient fractions of ^{13}C - and ^{12}C -DNA (incubation time: 48 hours). T-RFLP profiles of ^{13}C - and ^{12}C -DNA were similar below 1.703 g/cm³ fractions. In contrast, T-RFLP profiles were obtained from only ^{13}C -DNA in 1.717-1.722 g/cm³ fractions, while PCR products were not amplified from the corresponding fractions of ^{12}C -DNA. In particular, terminal-restriction fragments (T-RFs) of 200, 332, and

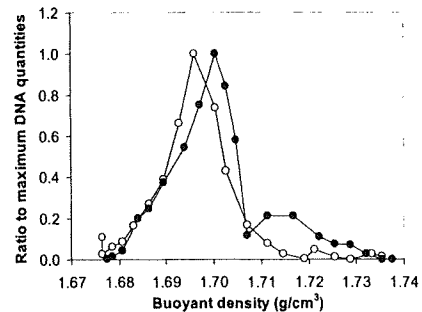


Fig.1 DNA distribution in CsCl gradient fractions of ^{13}C -acetate treatment (●) and ^{12}C -acetate treatment (○) (incubation time: 48 hours).

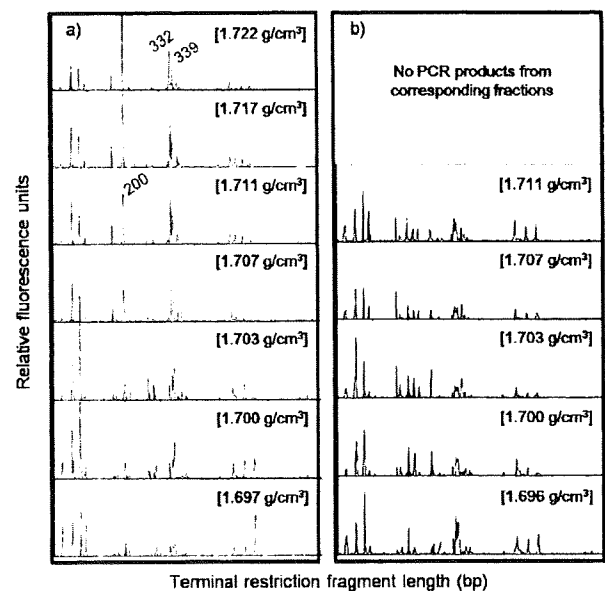


Fig.2 T-RFLP profiles in CsCl gradient fractions after incubation with a) ^{13}C -acetate and b) ^{12}C -acetate for 48 hr.

339 bp were more abundant in ^{13}C -DNA than those in ^{12}C -DNA over 1.707 g/cm³ fractions. Though effects of cross-feeding of ^{13}C -acetate during longer incubation should be assessed, this result suggests that some bacteria corresponding to those T-RFs are probably involved in the removal of acetate. It is possible that the abundances or activity of these bacteria associated with BAC could be related to performance of acetate removal in BAC treatment. However, actual concentration of acetate or AOC is much lower than 10 mgC/l. Thus, further trial is necessary to modify SIP experimental condition under lower substrate condition.

4. Conclusions

SIP analysis was applied to evaluate acetate assimilating bacteria associated with BAC. The separation of ^{13}C -DNA from ^{12}C -DNA was achieved after 48 hours of incubation. It was revealed that bacteria corresponding to some specific T-RFs could probably take part in acetate removal in BAC filter.

Reference

- 1) Lueders T. *et al.* (2004) Environmental Microbiology, 6(1), 73-78.

