

高山湧水から単離した微生物の増殖度と酸化還元電位の関係

呉工業高等専門学校 学生員 ○下田 直
呉工業高等専門学校 正会員 及川 栄作

1. はじめに

現在、日本の水道普及率は 97.5%を超えている。一方で安全でおいしい水や健康志向の高まりから、近年、水道水以外の健康飲料水が注目されてきている。健康飲料水の代表的なものとしては、還元水や水素水、天然湧水などがあり、それらは酸化還元電位が低いことや、溶存水素が検出されるなどの特徴を有している。健康飲料水の大半は自然界より精製されることから、これらの性質は地質環境や生息する微生物によってもたらされていることが推測される。そこで、本研究では天然湧水に生息する微生物の単離実験や培養液の酸化還元電位の低下変動の測定実験を行い、湧水の酸化還元電位の低さと微生物の関係を調査する研究を行った。

2. 実験方法

2.1 実験対象・使用菌株

地元の住民から、“長寿の水”などと呼ばれ、親しまれている山形県蔵王山中腹の湧水を実験試料とした。この湧水の周囲の水は、酸化還元電位(ORP)が -50mV と低く、溶存水素も検出されるという特徴を有していることから、微生物の作用がもたらされている可能性があると考え、実験に用いた。また、湧水から単離した *Mesorhizobium* sp. GN1 株に近種である根粒菌、*Mesorhizobium loti*(NBRC-14779)および *Bradyrhizobium japonicum*(NBRC-14792)も実験の比較対象として使用した。

2.2 実験方法

実験としては、微生物の単離実験と微生物培養液の測定実験の2つを行い、考察を行った。

2.2.1 微生物の単離実験

①湧水をオートクレーブ滅菌した寒天培地に滅菌していない湧水を塗抹して、2週間から1カ月程度、光照射下の 30°C で静置培養した。②出現したコロニーをさらに、従属栄養菌用のポリペプトンと硫酸アンモニウムを含む寒天培地(702培地)または藍藻類用のCT寒天培地に塗抹し、光照射下の 30°C で静置培養した。③単一のコロニーをそれぞれ、CT液体培地および702液体培地で培養し、この一部を -85°C でグリセロールストック凍結保存した。

2.2.2 微生物培養液の測定実験

① -85°C で保存した株を702寒天培地に植え、 30°C で2日～7日程度静置培養した。②単一のコロニーを20mL～100mLの702液体培地に植え、 30°C で2日～10日間振とう培養した(前培養)。③この1/100量を702液体培地200mL～1Lに植え継ぎ、 30°C で7日～10日間振とう培養した(本培養)。④本培養について、培養時間ごとに、培養液の増殖度・pH・DO(溶存酸素)・ORP(酸化還元電位)の測定を行った。

3. 実験結果および考察

3.1 微生物の単離実験

微生物の単離実験を行った結果、29株の微生物を単離し、グリセロールストック保存することに成功した。さらに、このうちの17株において16SrRNA遺伝子解析を行い、分類することに成功した。

3.2 微生物培養液の測定実験

分類した微生物 10 株において、微生物培養液の測定実験を行ったところ、根粒菌に近種である菌株数株において、培養液に対する酸化還元電位を低下させる作用 (ORP 約 200mV→約 100mV) を確認することが出来た。また、その中でも、*Mesorhizobium* sp. GN1 株において、特に強力な還元能力 (ORP 約 180mV→最高-140mV) を確認することが出来た (表 1、図 1)。これらの結果より、一般的な根粒菌に対しても還元能力があるのかを、同様の実験を行うことにより調査した。その結果、*Mesorhizobium loti* においてはある程度の還元能力 (ORP 約 180mV→最高-42mV) を、*Bradyrhizobium japonicum* においてはわずかな還元能力 (ORP 約 180mV→最高 106mV) を確認することが出来た (表 1、図 1)。

表 1 培養液の測定実験結果比較表

菌株	酸化還元電位 (ORP) の変化
<i>Mesorhizobium loti</i>	ORP を低下させることを確認。対数増殖期を超えたあたりで最低。 ORP の変化：180mV→-42mV→70mV
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	ORP をわずかに低下させることを確認。 ORP の変化：180mV→106mV→115mV
<i>Mesorhizobium</i> sp. GN1	ORP を低下させることを確認。対数増殖期を超えたあたりで最低。 ORP の変化：180mV→-140mV→58mV→再び低下？

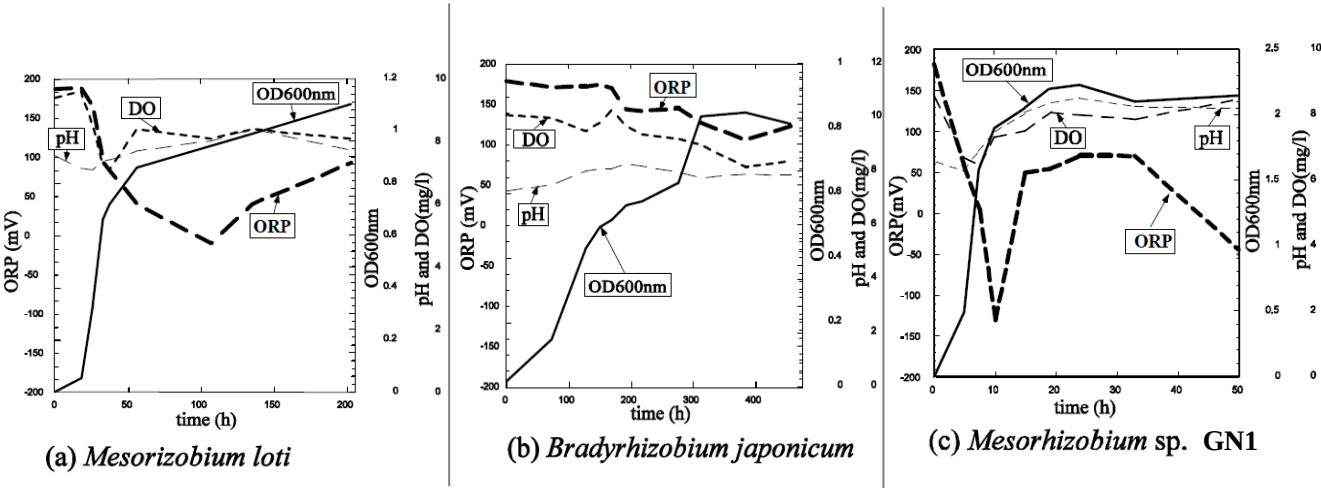


図 1 培養液の測定実験結果グラフ

4. まとめ

- 以上より、次のように研究成果をまとめる。
- ①山形県蔵王山中腹の湧水より、数株の酸化還元電位を低下させる微生物を単離することが出来た。
 - ②単離出来た微生物の中でも、*Mesorhizobium* sp. GN1 株が特に強力な還元能力を有し、この能力は近種株には見られない、GN1 株特有のものであることが分かった。
 - ③GN1 株のような強力な還元能力を有する微生物が、湧水の酸化還元電位の低下に関与していることが示唆された。

5. おわりに

今後は未分析の微生物においても培養液の測定実験を行い、還元能力の有無を研究する予定である。また、ORP を減少させる作用を持つ酵素の同定・解析に関する研究も行う予定である。また、溶存水素計を用いた培養液の測定実験を行い、溶存水素への関与の有無を調べる研究も行う予定である。