

9. 製塩工業および塩蔵食品における好塩菌の生態調査 (No.8909)

大西 博(鹿児島大学)

輸入天日塩と製塩工場の各工程のサンプルと塩、赤穂市立海洋科学館の塩田試料および市販の塩を供試して広範に好塩菌の生態調査を行い、含まれる好塩菌を出きだけ全部の種類を逃がさず分離することを試みた。次いで分離菌の特性の1つとして生育に対する Na^+ と K^+ の要求パターンを観察し、各試料におけるそれらの分布を明らかにした。さらに好塩菌を含む輸入天日塩と含まない市販家庭用塩を用いて生鮭の塩蔵試験を行い、好塩菌の汚染の実態を調べた。供試試料は0～4 M NaCl Nutrient broth (NB) および1～4 M Sehgal and Gibbonsの複合培地(SGC)を用いて30℃に15～25日間振盪して集積培養を行い、3～5日おきに数回繰り返して寒天平板培地上に画線して分離を行い、1119株を得、試料、集積培養用培地、斜面培養の肉眼的観察のいずれかの点で異なる株305株を選択して代表株となし以下の実験に供した。輸入天日塩は1～4MのNBでもSGCでも菌の繁殖が見られSGC培養は赤色を呈し赤色高度好塩菌が得られたが、NB培養では赤色菌はなく中度好塩菌や耐塩菌であった。製塩工場と赤穂観光塩田の試料ではNBに生育する耐塩菌や中度好塩菌が含まれていたが、SGCに生育した菌の中に赤色高度好塩菌はなく、この点において輸入天日塩と著しい相違がみられた。市販塩は粗塩と漬塩以外は菌の生育がなく微生物的に清潔であった。輸入天日塩と市販家庭用塩を用いて鮭の塩蔵試験を行い、用いた塩の清潔度が塩蔵中の汚染度によく反映することを実証した。次に分離菌の生育に対する Na^+ と K^+ の要求性を観察した。NB培地で分離した菌は耐塩菌と中度好塩菌を含み後者にはNaClを特異的に要求するものとKClで代用できるものとがあつた。この中には1～4Mの広い塩濃度範囲にわたって速やかに生育する興味あるタイプのものも含まれていた。SGC培地で分離した輸入天日塩の赤色菌は特異的にNaClを要求し高度好塩性で生育に必要とする最低のNaCl濃度が2M, 3M, 4Mのものに分類された。非赤色性株はNaClを特異的に要求するものとKCl培地にも生育するものとがあつた。輸入天日塩と本邦の塩田や製塩工場試料のマイクロフローラは明らかに異なっていた。

8. 製塩工業および塩蔵食品における好塩菌の生態調査 (No.8909)

大西 博(鹿児島大学)

〔研究目的〕

海水から生産される天日塩およびこれを用いた塩蔵品に多数の好塩菌が含まれていることはよく知られている。^{1, 2)} そのうちHalobacteriaceae科の赤色高度好塩菌は第3の生物界に属する古細菌としてユニークな特性が注目されている。天日塩に含まれる細菌の調査は国の内外で行われており、^{1, 2, 3, 4)}天日塩1g中 $10^3 \sim 10^5$ の好塩菌が含まれ、多くは赤色高度好塩菌 Halobacterium であることが示されている。最近塩濃度が段階的に異なる地中海の天日塩田に棲む細菌の集団について調査が行われ、25%以下の全塩濃度(17% NaCl)では中度好塩菌が優勢で、32%以上の全塩濃度(22% NaCl)では高度好塩菌が優勢であり、この中間の濃度では両タイプの好塩菌が重複することが報告された。⁵⁾大西ら⁶⁾は塩蔵魚、塩田試料、醤油醸造用塩や醤油もろみ、海砂、海草や海岸採集物など塩濃度の異なる種々の試料から高度好塩菌用培地の4M NaCl複合培地⁷⁾を用いて集積培養を行い、好塩菌を分離し、その中には赤色高度好塩菌の他に塩要求パターンの異なる種々の中度好塩菌が含まれていることを示した。

今回輸入天日塩と製塩工場の各工程の試料と製品の塩、赤穂市立海洋科学館の塩田試料および市販の塩を供試して、広範に好塩菌の生態調査を行い、含まれる好塩菌の全種類を出来るだけ分離することを試みた。次いで分離菌の特性の1つとして生育に対する Na^+ と K^+ の要求パターンを観察し、各試料におけるそれらの菌の分布を明らかにした。なお分離菌株中低温性菌や高温性菌および絶対嫌気性菌が含まれているかどうか試験し、かつ好塩菌を含む輸入天日塩と含まない市販家庭用塩を用いて生鮭の塩蔵試験を行い、好塩菌の汚染の実態を調べた。

〔研究方法〕

1. 供試試料。

好塩菌の分離に用いた試料は次のとおりである。オーストラリア産天日塩10種、メキシコ産天日塩10種、タイ産天日塩1種、新日本化学工業(株)分与の輸入天日塩、原海水、沔過海水、かん水、並塩、赤穂海水(株)分与の原海水、かん水、2次沔過海水および特例塩1号、食塩、並塩、中粒塩4号塩、赤穂市立海洋科学館の塩田の塩濃度の異なる試料(塩濃度1%以下、1.5%、9%、18%、21% および平釜塩)および市販の家庭塩、食塩、ほんじお、天塩、粗塩、やき塩、漬塩である。

2. 集積培養と好塩菌の分離

2. 1. 供試培地

2. 1. 1. Nutrient broth (NB): Beef extract (Difco) 1.0%, Polypeptone (大五栄養) 1.0%, NaCl 0, 1, 2, 3, 4 M とする。pH 7.0.

2. 1. 2. Sehgal and Gibbons 複合培地 (SGC)⁷⁾: Vitamin-free Casamino acids (Difco) 0.75%, Yeast extract (Difco) 1.0%, KCl 0.2%, Sodium citrate 0.3%, MgSO₄·7H₂O 2.0%, FeCl₂·nH₂O 2.3 mg%, NaCl 3, 4 M とする。pH 6.6.

2. 2. 集積培養と分離

各々の上記液体培地 5mlを試験管にとり、固体試料は粉碎し約 0.3 g 宛培地に加え、液体試料は 2 ml 宛加えて 30°C に振盪培養し、1 部は 37°C で培養した。この集積培養により生育を認めた培養より NB 培養は 2 M NaCl NB 寒天平板培地に、SGC 培養は 4 M NaCl SGC 寒天平板培地に画線し、単一のコロニーから釣菌し純粋培養した。集積培養集団中には生育速度の異なる好塩菌が含まれることや培養中に起こるマイクロフローラの遷移について考慮し、15 ~ 25 日間の培養中同じ培養から 3 ~ 5 日おきに数回寒天平板培地に画線を試み、集団に含まれる好塩菌をなるべく逃がすことなく捕捉分離することにつとめた。寒天平板培養は乾燥を防ぐためにビニールの袋中に密閉しておこなった。

2. 3. 代表菌株の選択

2 M NaCl NB 寒天斜面培養または 3 M と 4 M NaCl SGC 寒天斜面培養として純粋分離された好塩菌の総数は 1119株に達し、そのうちから試料の種類、集積培養用培地の種類、斜面培養の肉眼的観察の所見のいずれかの異なるもの 305 株を選択して代表株となし以下の実験に供した。

2. 4. 好塩菌の生菌数測定

2 M NaCl NB 寒天平板および 4 M NaCl SGC 寒天平板培地に試料の塩溶液を適宜添加しスプレッターで均一に拡げてシールしたプラスチックの袋に入れて 37°C に 4 週間培養した。また希釈法による測定も行い逐次 4 M NaCl 溶液で希釈した試料をそれぞれ 5 本の 4 M NaCl SGC 培地に添加して 37°C に振盪培養して 14 日後の生育の有無を調べた。

2. 5. 生蛙の塩蔵試験

多数の好塩菌を含む輸入天日塩と含まない市販家庭用塩を用いて、ぶつ切りにした魚体に塩をくまなくまぶして蓋付き容器に入れ室温と 37°C にて塩蔵試験を行なった。1 週間放置後容器内に魚肉エキスの飽和塩水がたまってくるので、この塩水をフラスコに取りだし、室温と 37°C に放置し、4 M NaCl SGC 寒天平板培養により 7, 15, 30, 60 日後の生菌数を測定した。また塩蔵魚の肉眼的および官能的变化も観察した。

2. 6. 低温性, 高温性および嫌気性好塩菌の検索

分離菌の代表株中 146 株を供試して 1 M と 3 M NaCl NB 培地と 3 M NaCl SGC 培地を用いて、10℃ と 50℃ に静置培養し、また Gas Pack 嫌気培養法を用いて 30℃ に培養し、14 日後の生育を観察した。

2. 7. 分離菌の生育の塩要求性

分離菌の代表株中 161 株について生育のための Na⁺ と K⁺ の要求性を試験した。NB 培地で分離した菌については 0, 1, 2, 3, 4 M NaCl NB 培地および 1, 2, 3, 4 M KCl NB 培地を用いて 30℃ に振盪培養し、SGC 培地で分離した菌については 1, 2, 3, 4, 5 M NaCl SGC 培地および 4 M KCl SGC 培地を用いて 37℃ にて振盪培養し、経時的に Klett-Summerson 比色計を用いて濁度を測定して生育曲線を求めた。

[研究結果]

1. 集積培養による好塩菌の調査と分離

1. 1. 輸入天日塩の好塩菌の調査

オーストラリア産天日塩と新日本化学工業(株)分与の輸入天日塩は 1 M NaCl NB 培地では 2 ~ 5 日, 2 M NaCl NB では 3 ~ 10 日後, 3 M NaCl NB では 6 ~ 15 日後に培養が混濁し菌の生育がみられた。4 M NaCl NB 培地では 15 日後僅かに濁つたものもあつたが生育微弱であつた。NB 培養には赤色菌は全く存在しなかつた。3 M NaCl SGC 培地では 7 ~ 11 日後にかなり混濁し、4 M NaCl SGC 培地では 12 ~ 17 日後にかなりの生育をみとめ、SGC 培養はピンクまたは赤色を呈した。SGC 培養で生育したものは赤色高度好塩菌と思われるが、NB 培養で生育したものは赤色菌がなく、中度好塩菌や耐塩菌と思われた。タイ産天日塩は 3 M NaCl SGC で 6 日後、4 M NaCl SGC 培養で 11 日後に赤色の混濁を生じ、高度好塩菌が多数含まれると考えられた。メキシコ産天日塩は 1 M NaCl NB 培養は 3 ~ 18 日後(多くは 10 日後)、3 M NaCl SGC 培養は 9 ~ 20 日後に生育が起こり、オーストラリア産とタイ産のものに比べて生育が遅れ、中度および高度好塩菌の両者とも少ないと思われた。

1. 2. 製塩工場試料と赤穂海洋科学館塩田試料の好塩菌の調査

新日本化学工業(株)小名浜工場の原海水、浜過海水、かん水はいづれも 0 M NaCl NB 培養で 2 日後に菌の生育が起こり、耐塩菌も存在するが、1 ~ 4 M NaCl NB 培地に生育する好塩菌も含まれていた。3 M と 4 M NaCl SGC 培養でも 4 ~ 9 日後に生育が見られたが、赤色を呈することはなく赤色高度好塩菌は存在しないと考える。同工場の並塩では 3 ~ 4 M NaCl SGC 培養で菌の生育が極めて弱く赤色高度好塩菌を含まず、0 ~ 2 M NaCl NB 培養で生育がみられたが常在する菌とは考えにくい。赤穂海水(株)の原海水、かん

水、2次滷過水は1～3 M NaCl NB 培養で早い生育が見られ、3 M NaCl SGC 培養でも生育したが、赤色菌ではなかつた。なお同工場の赤穂塩特例塩1号、食塩、並塩、中粒塩4号塩について1～4 M NaCl NB 培地と3～4 M NaCl SGC 培地を用いて30°C、15日間振盪培養したが全く菌の生育がみられなかつた。赤穂市立海洋科学館の観光塩田試料は平釜塩も含めて1～3 M NaCl NB 培地と3 M NaCl SGC 培地で速やかな生育を認めたが赤色菌は全く認められなかつた。供試した全ての輸入天日塩中に赤色高度好塩菌と思われる菌の存在を認めたが、2社の製塩工場の製品の各種塩と赤穂平釜塩中には赤色高度好塩菌が認められなかつたことが注目された。

1. 3. 市販家庭用塩の調査

市販の塩9種類を供試して1, 2, 3, 4 M NaCl NB 培地および3～4 M NaCl SGC 培地を用いて30°C、15日間振盪集積培養して全く菌の生育を認めない試料は次の6種であつた：赤穂の天塩、家庭塩、食塩、瀬戸のほんじお、伯方の塩(やきしお)、海の華(やきしお)。2種の市販塩青い海と伯方の塩(粗塩)からは3～4 M NaCl SGC に生育がみられたが赤色菌は含まれていない。椎茸、昆布、とうがらしなどの添加物入りの漬塩に見られる菌は3 M 以上の濃度の NaCl 培地に生育しないので雑菌であらう。

1. 4. 好塩菌の純粋分離

生育を認めた集積培養から1119株の好塩菌を純粋分離し、そのうち305株の代表株を選択した。Table 1 に分離試料と培地と分離した菌数と赤色菌数を示す。

2. 天日塩中の好塩菌の生菌数

市販の家庭用塩とオーストラリヤ産天日塩(A),(B)について1 M と2 M NaCl NB 寒天平板培養と4 M NaCl SGC 培地を用いた希釈法による好塩菌の生菌数測定を行つた結果、いずれの測定法でも市販家庭用塩中には生菌がみられず、天日塩(A)では1 M と2 M NaCl NB 培地で $10^3/g$ の生菌数が得られ天日塩(B)では少なく25～50/gであつた。4 M NaCl SGC 培養により高度好塩菌を主とする生菌数を調べると天日塩(A)では $10^3/g$ 、天日塩(B)では $5 \times 10^4 \sim 10^5/g$ であつた。

3. 鮭の塩蔵試験

前項に示した好塩菌を含まない家庭用塩と生菌数の最も多い天日塩(B)とを用いて研究方法の項に記したように鮭の塩蔵試験を行つた。塩蔵中浸出する魚肉エキス塩溶液中の好塩菌の生菌数を4 M NaCl SGC 寒天平板法により測定した。天日塩を用いた場合37°Cに放置すると15日後に $10^6/ml$ の生菌数にまで増殖し30日後には $3 \times 10^7/ml$ に達する。室温に放置した場合も30日後 $6 \times 10^4/ml$ 、60日後には $1.5 \times 10^7/ml$ になり汚染の激しいことがわかつた。この場合4 M NaCl SGC 寒天平板上に生育したコロニーは赤色高

度好塩菌であった。これに対し好塩菌を含まない家庭用塩を用いた場合は室温でも 37℃でも 60 日後も全く汚染がなかった。食品の塩蔵における好塩菌の汚染には使用した塩の微生物学的清潔度が著しく関係することが示された。初め生臭かつた魚肉も 7 日後には全て塩蛙独特の臭に変わり、天日塩を用いて 37℃ に保存のものは 15 日後にはアミンやアンモニア臭とは異なるが誇張するとくさやの干物に似た異臭を生じた。

4. 低温性, 高温性, 嫌気性好塩菌の検索

NB 培地で集積培養して分離した 60 株と SGC 培地で同様に分離した 86 株について、10℃ と 50℃ で生育試験を行いそれぞれ低温性および高温性菌を検索し、また 30℃ における Gas Pack 嫌気培養を行った。NB 培養で分離した菌は低温性のものが 34 株と比較的多く、SGC 培養で分離した菌は逆に高温性のものが 27 株と多かつた。本実験では装置の都合上静置培養を行ったので生育度は一般に低かつたが、赤色高度好塩菌中 50℃ の高温に生育するものが知られておりこの実験に一致する。嫌気性好塩菌は全く見いだされなかつた。

5. 分離菌の生育に対する Na⁺ と K⁺ の要求性

5. 1. NB 集積培養により分離した菌の生育の塩要求パターン

0 ~ 4 M NaCl NB と 1 ~ 4 M KCl NB を用いて 30℃ に振盪培養し生育曲線を観察した。供試菌は 52 株でその中 NaCl 無添加の培地にも生育しうる耐塩菌が 20 株で、残りの 32 株は NaCl または KCl を添加しなければ生育できない好塩菌であり、その中には生育のために NaCl を特異的に要求し KCl で代用できないもの 17 株と NaCl の代わりに KCl を添加した培地にも生育可能なもの 15 株が含まれた。しかし KCl を特異的に要求する菌は無い。生育に必要な塩濃度範囲と生育の最適塩濃度は菌株により 1 ~ 4 M 濃度でまちまちであるが、Fig. 1 に分離試料と菌株番号とともにその塩要求パターンの 1 例を示す。このグループの大多数は非着色性中度好塩菌であるが、この中で興味ある塩要求パターンを示す No. 9 株と No. 129 株の生育曲線をそれぞれ Fig. 2 と Fig. 3 に示した。No. 9 株は 1 ~ 4 M NaCl と 1 ~ 4 M KCl の広い塩濃度範囲にわたって塩濃度にあまり関係なく速やかに旺盛な生育を示すことが注目される。No. 129 株は 2 M 濃度以上の NaCl 添加培地でのみ生育し KCl 添加培地には生育せず、Na⁺ を特異的に要求する菌である。この菌の生育は Mg²⁺ の添加により高まるかも知れない。

5. 2. SGC 集積培養により分離した菌の生育の塩要求パターン

1 ~ 5 M NaCl SGC と 4 M KCl SGC 培地を用いて 37℃ に振盪培養し生育曲線を観察した。供試菌株は赤色株 78 株と非着色性株 31 株であり、赤色株はすべてオーストラリア、メキシコ、タイ産の天日塩から分離した菌であり、非着色性株は赤穂海水(株)の試料

と赤穂海洋科学館の塩田試料から分離した菌である。Fig. 4 に供試した赤色菌の分離試料と菌株番号とその塩要求パターンを示す。全て特異的に NaCl を要求し KCl が代用にならず赤色高度好塩菌に属する。生育のために必要とする最低の NaCl 濃度によつて分類すると、要求する塩濃度がやや低く 2 M 以上で生育する菌 13 株、3 M 以上でのみ生育する菌 60 株、4 M 以上の NaCl 濃度を要求する好塩性の強い菌 5 株であつた。また非着色性の供試菌の番号と分離試料と塩要求パターンを Fig. 5 に示す。多くの菌株が 1~5 M NaCl SGC 培地に生育し、その中特異的に NaCl を要求するものが 23 株で KCl 培地にも生育する菌が 8 株であつた。SGC 培地を用いて同様に分離した菌であつても輸入天日塩のマイクロフローラと本邦の製塩工場の試料や塩田試料のそれは全く異なつていた。なお比較のために指宿海岸と開間海岸付近で採集した海砂、海水、海草などから 4 M NaCl 培地で集積培養して菌の分離を行つたが、これにも赤色高度好塩菌は含まれていなかった。赤色高度好塩菌の生育曲線の実例を Fig. 6 と Fig. 7 に示す。No. 50 は 3~5 M NaCl SGC でほぼ一様に生育し、No. 21 は 4~5 M NaCl で生育がよく、3 M NaCl では生育が遅れるタイプであり、両株とも 1~2 M NaCl 濃度では生育しない。これに対して No. 95 は 1 M NaCl では生育しないが 2 M NaCl で充分生育し、2~5 M NaCl に生育ができ、しかも生育が早い特徴がある。

[考察]

塩田や天日塩など好塩菌の棲息する環境は通常の生物の生育する環境条件から遥かに離れた異常な極端環境であり、このような環境では見いだされる生物の種類が少ないとともに、そこに棲む生物の全部のグループを見逃し易く捉え難いことが指摘されている。今回供試した種々の塩試料からそこに生存する好塩菌を出来るだけ残らず全部分離することを目的として種々の塩濃度の NB 培地と SGC 培地を用いて集積培養し、培養期間の経過とともに微生物のフローラの遷移の起こることを考慮して 15~25 日の長期間にわたつて培養を行い、3~5 日おきに寒天平板上に画線し分離をするなど注意を払つた。

このようにして 1119 株の多数の好塩菌を分離し、試料、集積培地、斜面培養の肉眼的観察のいずれかの点でことなるもの 305 株を選んで代表株とした。これらの菌の生育に対する Na⁺ と K⁺ の要求パターンを観察した結果、耐塩菌、中度好塩菌、高度好塩菌に大別されたが、天日塩から SGC 培地の集積培養により赤色高度好塩菌が分離され、高度好塩菌の生育できない NB 培地の集積培養では耐塩菌と中度好塩菌が分離されたので、天日塩にはほとんど例外なしに赤色高度好塩菌とともに非赤色性の種々の耐塩菌や中度好塩菌が存在した。本邦の製塩工場の試料と赤穂海洋科学館の塩田試料から SGC 培地の集積培養により分離した好塩菌は非赤色性の中度好塩菌であり、赤色高度好塩菌が全く分離さ

されなかつたことは輸入天日塩と著しく異なる事実であつた。

製塩工場製の特例塩1号、食塩、並塩、中粒塩4号塩や市販の家庭用塩、食塩などはいづれの集積培養によつても菌の生育がなく、微生物学的に高い清潔度を示した。さらに使用した塩のこの清潔度が食品の塩蔵中の汚染度によく反映する事実を鮭の塩蔵試験により実証した。

高濃度塩環境に棲むユニークな古細菌 Halobacteriaceae 科の赤色高度好塩菌は今まで比較的均一のグループと考えられ、桿菌たる Halobacterium と球菌たる Halococcus の2属が記載されていたが、1989年のBergey's Manual Vol. 3⁹⁾にはさらに Haloarcula, Haloferax, Natronobacterium の3新属が加えられた。我々の分離した赤色高度好塩菌中には2Mの比較的低い塩濃度に生育できるものや多形態性を示すものも見い出されており、新しい分類方式に基づいてさらに研究を進めたい。

好塩菌およびその酵素や生産物の利用面の開発はまだあまり行われていない。我々は先に中度好塩菌の生産する好塩性の新規の酵素として amylase,^{9, 10)} protease,¹¹⁾ nuclease^{12 ~ 14)}, 5'-nucleotidase,¹⁵⁾ を発見し、好塩性 nuclease を吸着した好塩菌の凝集細胞のカラムを作り、これをバイオリアクターとする呈味性 5'-ヌクレオチドの生産を試みた。^{16, 17)} 今後応用微生物の立場から好塩菌の利用面の開発が進展すると考えられ、その立場からはなるべく多種多様の好塩菌を広く集めることが重要な方針となる。この点において本研究により分離された好塩菌株が役立つことを願うものである。

[今後の課題]

本年度の研究において分離し試験した赤色高度好塩菌について人工合成培地を用いてアミノ酸要求性を観察し、生育できる pH 範囲や Mg^{2+} 要求性と NaBr 耐性を調べて、Halobacterium, Halococcus, Haloarcula, Haloferax, Natronobacterium の各属を区別して、それらの各試料中における分布や生態を一層明らかにする必要がある。またシリカゲルクロマトグラフにより赤色高度好塩菌に含まれる極性脂質の種類を調べ、かつ $C_{20}:C_{20}$ ジエーテル成分の他に $C_{20}:C_{25}$ ジエーテル成分が存在するかどうかを明らかにしたい。

中度好塩菌で広い塩濃度範囲にわたって速やかな旺盛な生育をする No. 9 株は今まで知られないタイプの好塩パターンを示すので、その分類学も興味ある今後の課題である。

好塩特性の異なる耐塩菌、中度好塩菌、高度好塩菌を各々単独に菌数を変えて無菌の塩に添加して生魚の塩蔵試験を行い、汚染の進行状態や変敗を比較観察することも汚染防止の基礎データとして重要であると考えられる。

[引用文献]

1. 大西 博, "好塩微生物" (増井, 大西, 畝本編) 医歯薬出版(株) p. 32 ~ 55 (1979)
2. H.Larsen, in "The Bacteria" Vol.4, p.297 (Ed. by I.C.Gunsalus and R.Y.Stanier) Academic Press (1962)
3. Y.Ishida and T.Fujii, Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish. 36, 391 ~ 396 (1970)
4. S.Horie and K.Hinago, Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish. 40, 1059 ~ 1062 (1974)
5. F.Rodriguez-Valera, F.Ruiz-Berraquero and A.Ramos-Cormenzana, Microb. Ecol. 7, 235 ~ 243 (1981)
6. H.Onishi, H.Fuchi, K.Konomi, O.Hidaka and M.Kamekura, Agric. Biol. Chem. 44, 1253 ~ 1258 (1980)
7. S.N.Sehgal and N.E.Gibbons, Can. J. Microbiol. 6, 165 ~ 169 (1960)
8. W.D.Grant and H.Larsen, in Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Ed.by J.T.Staley, M.P.Bryant, N.Pfennig and J.G.Holt) Vol.3, p.2216 ~ 2233 (1989)
9. H.Onishi and O.Hidaka, Can. J. Microbiol. 24, 1017-1023 (1978)
10. H.Onishi and K.Sonoda, Appl. Environ. Microbiol. 38, 616 ~ 620 (1979)
11. M.Kamekura and H.Onishi, Appl. Microbiol. 27, 809 ~ 810 (1974)
12. M.Kamekura and H.Onishi, J. Bacteriol. 119, 339 ~ 344 (1974)
13. M.Kamekura and H.Onishi, J. Bacteriol. 133, 59 ~ 65 (1978)
14. H.Onishi, T.Mori, S.Takeuchi, K.Tani, T.Kobayashi and M.Kamekura, Appl. Environ. Microbiol. 45, 24 ~ 30 (1983)
15. H.Onishi, T.Kobayashi and M.Kamekura, FEMS Microbiol. Lett. 24, 303 ~ 306 (1984)
16. H.Onishi, M.Kamekura, H.Yokoi and T.Kobayashi, Appl. Environ. Microbiol. 54, 2632 ~ 2635 (1988)
17. H.Yokoi and H.Onishi, Agric. Biol. Chem. 53, 1817 ~ 1822 (1989)

Table. 1. Isolation of halophilic bacteria from various samples by enrichment culture using media of different NaCl concentrations.

Samples	Numbers of the isolates						Total	
	Media used for enrichment culture							
	NaCl concentration of NB			NaCl conc. of SGC				
0M	1M	2M	3M	4M	3M	4M		
Australian		17(0)*	15(0)	6(0)	2(0)	27(20)	22(15)	89(35)
solar salt	-	75(0)	60(0)	38(0)	30(0)	110(92)	94(76)	407(168)
Mexican		6(0)	9(0)	6(0)	8(0)	14(11)	26(26)	69(37)
solar salt	-	40(0)	45(0)	26(0)	25(0)	53(47)	60(60)	249(107)
Thai solar		5(0)	4(0)	1(0)	3(0)	2(1)	6(5)	21(6)
salt	-	23(0)	23(0)	12(0)	7(0)	10(3)	22(19)	97(22)
Imported		4(0)	3(0)	5(0)	2(0)	6(4)	2(2)	22(6)
solar salt	-	23(0)	19(0)	18(0)	4(0)	18(14)	12(11)	94(25)
Samples of Iwaki	9(0)	1(0)	4(0)	4(0)	1(0)	2(0)	2(0)	23(0)
salt factory	24(0)	6(0)	13(0)	14(0)	9(0)	3(0)	2(0)	71(0)
Samples of Ako		2(0)	-	7(0)	-	6(0)	-	15(0)
salt factory	-	14(0)	-	18(0)	-	9(0)	-	41(0)
Samples of		18(0)	-	20(0)	-	26(0)	-	64(0)
Ako saltern	-	50(0)	-	49(0)	-	36(0)	-	135(0)
Marketed crude		0	2(0)	0(0)	0(0)	0	0	2(0)
salt	-	0	7(0)	2(0)	1(0)	0	0	10(0)
Marketed salt		0(0)	0(0)	0	0	0	0	0(0)
for pickle	-	9(0)	6(0)	0	0	0	0	15(0)
Total of	9(0)	53(0)	37(0)	49(0)	16(0)	83(36)	58(48)	305(84)
the isolates	24(0)	240(0)	173(0)	177(0)	76(0)	239(156)	190(166)	1119(322)

*Numbers of the representative strains

Numbers of the total isolated strains

() indicates the number of red halophilic bacteria.

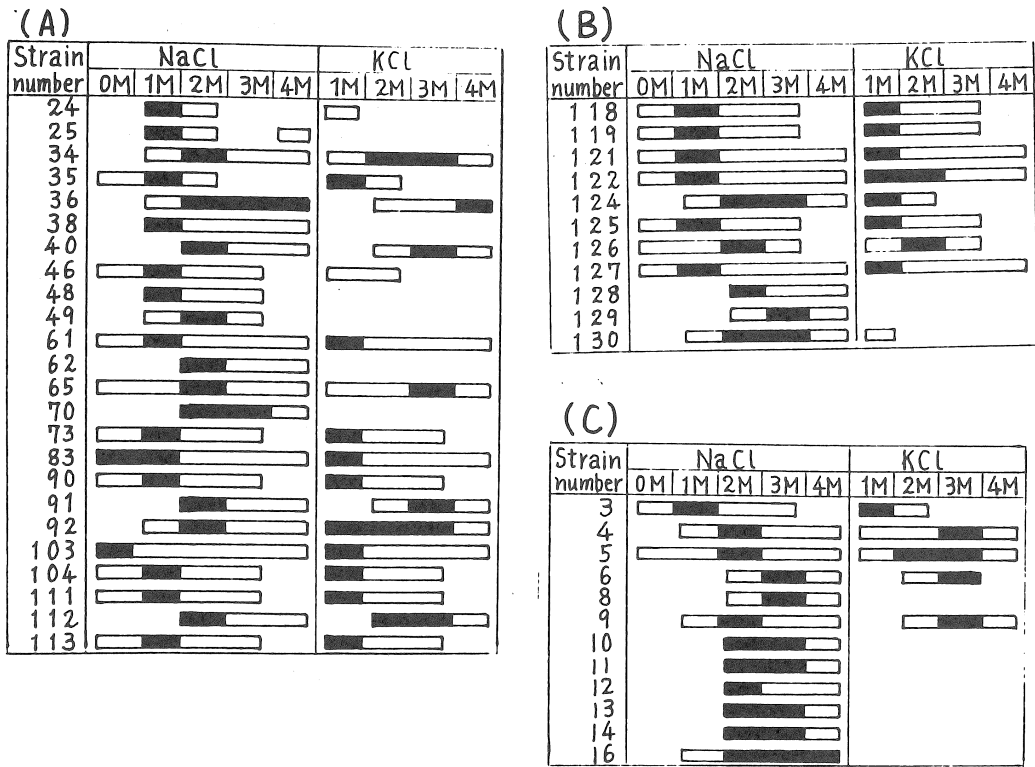


Fig. 1. Salt-response patterns of the growth of the isolates obtained from the NB enrichment culture.

The bacteria were cultivated in NB of 0 to 4 M NaCl or 1 to 4 M KCl.

▭ indicates the range of salt concentration capable of growth, and

▬ indicates the range of salt concentration of the best growth.

(A). Australian solar salt, (B). Thai solar salt, (C). Imported solar salt (Shin Nihon Kagaku Kogyo Co.)

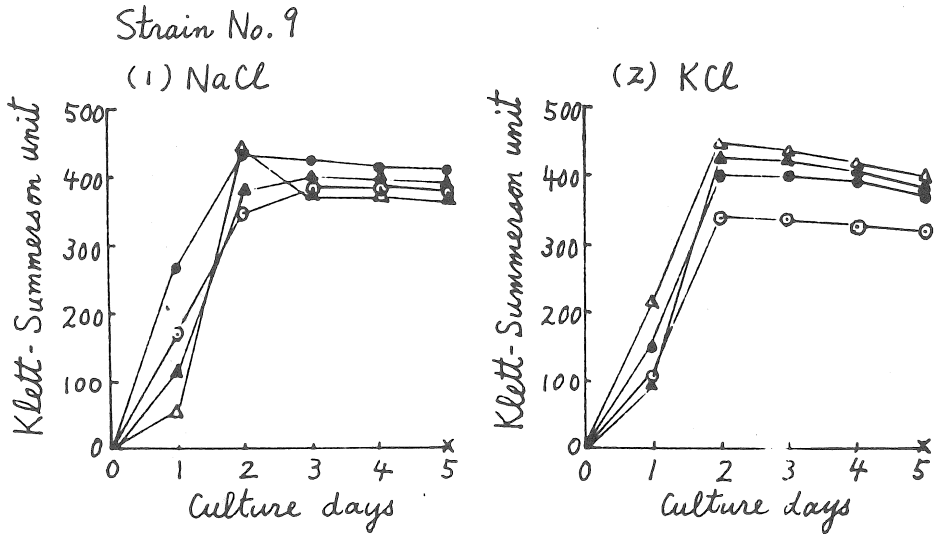


Fig. 2. The growth curve of strain No. 9 in NB of different NaCl or KCl concentrations.

x, 0 M; ○, 1 M; ●, 2 M; △, 3 M; ▲, 4 M

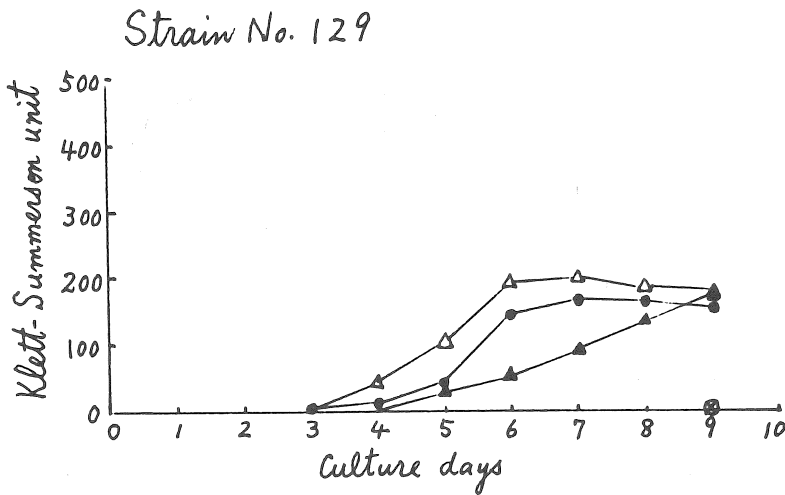


Fig. 3. The growth curve of strain No. 129 in NB of different NaCl concentrations. The symbols are the same as in Fig. 2.

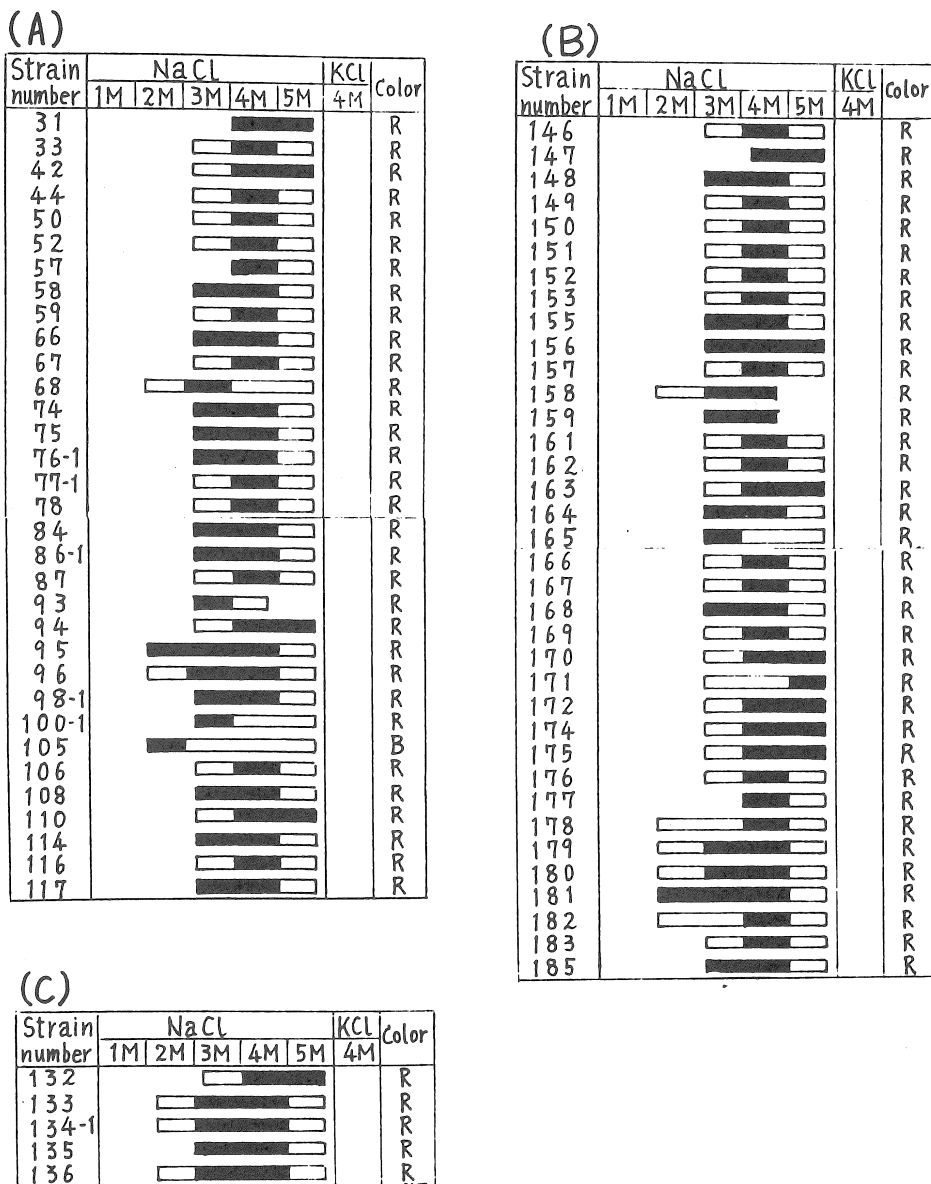


Fig. 4. Salt-response patterns of the growth of the red halophiles obtained from the SGC enrichment culture.

The bacteria were cultivated in SGC of 1 to 5 M NaCl or 4 M KCl.

□ indicates the range of salt concentration capable of growth, and

■ indicates the range of salt concentration of the best growth.

Color: R, red; B, Brown

(A). Australian solar salt, (B). Mexican solar salt, (C). Thai solar salt.

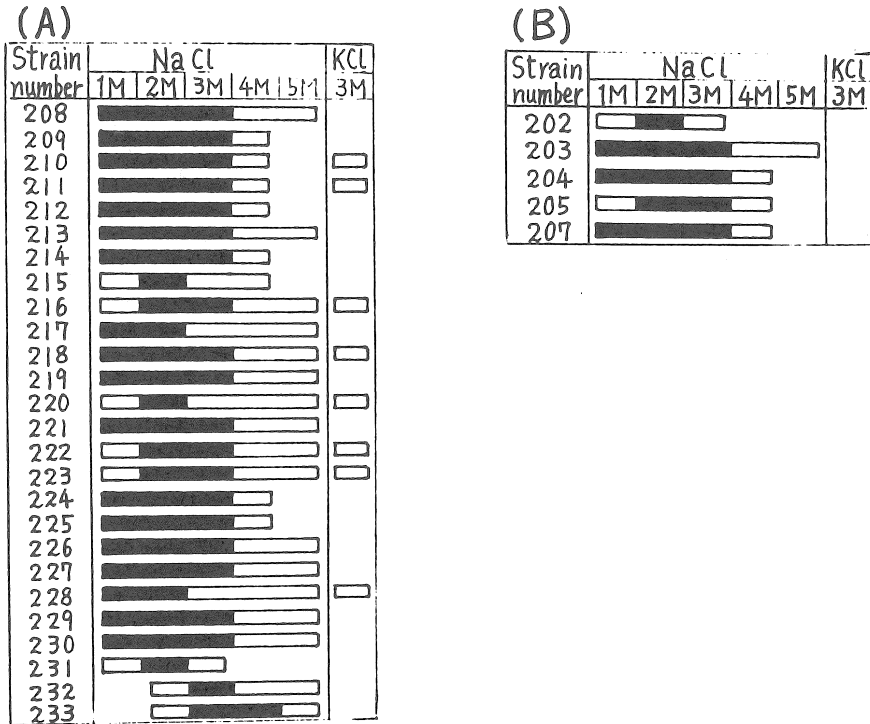


Fig. 5. Salt-response patterns of the growth of the non-pigmented halophiles obtained from the SGC enrichment culture.

The bacteria were cultivated in SGC of 1 to 5 M NaCl or 3 M KCl.

▬ indicates the range of salt concentration capable of growth, and

█ indicates the range of salt concentration of the best growth.

(A). Samples of the Ako saltern, (B). Samples of the Ako salt factory.

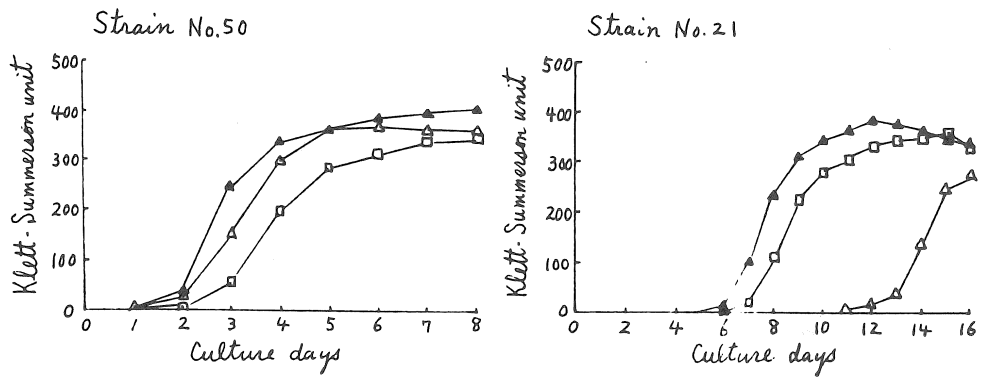


Fig. 6. The growth curves of the red halophiles, strains No. 50 and No. 21 in SGC of different NaCl concentrations.

The symbols are the same as in Fig. 2 and □, 5 M.

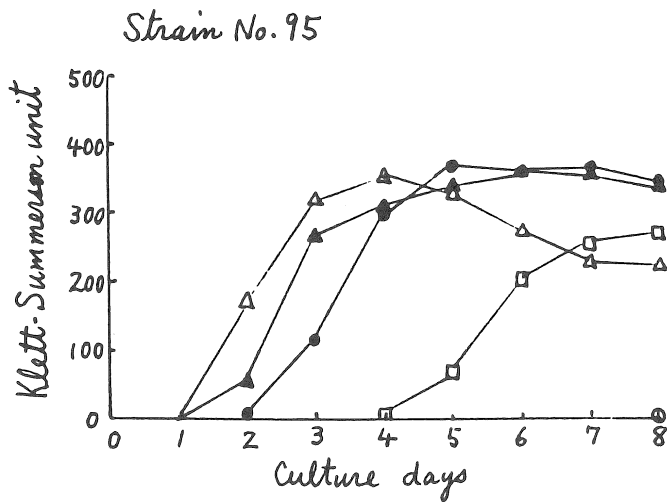


Fig. 7. The growth curve of the red halophile, strain No. 95, in SGC of different NaCl concentrations. The symbols are the same as in Fig. 6.

Ecological Survey of Halophilic Bacteria of Saltworks and Salted Foods

Hiroshi Onishi and Takekazu Kobayashi

Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture, Kagoshima University

Summary

Extensive ecological survey of halophilic bacteria were carried out with the following samples: imported solar salts, saline water and salts of salt manufacturing factories, the saltern of Ako Marine Science Museum and marketed salts. In this case, much attention was paid so that most of the varieties of halophilic bacteria contained in the samples, could be isolated. Enrichment cultures were done using 0 to 4 M NaCl nutrient broth (NB) and 3 to 4 M NaCl Sehgal and Gibbons complex medium (SGC) by shaking at 30°C for 15 to 25 days. During the enrichment culture, the isolation was tried several times every 3 to 5 days by streaking on the agar plate medium from the cultures. The total 1119 strains were isolated from the samples, and for further examinations, the 305 representative strains were selected based on the differences in the samples, the media for isolation and the appearance of the slant cultures. The all solar salt samples gave good growth in either NB or SGC of 1 to 4 M NaCl. Red extreme halophiles were isolated from the SGC culture while non-pigmented salt-tolerant and moderately halophilic bacteria were from the NB culture. On the other hand, the samples of the salt factories and the Ako saltern contained moderate halophiles but not red extreme halophiles. The marketed salts were free from the bacteria except crude salt. This characteristic difference of distribution of the halophilic bacteria between the imported solar salts and the salt factories or the Ako saltern was also confirmed by the observation of their Na⁺ and K⁺ requirement for the growth. The storage examination of the salted salmon using two kinds of salts, the imported solar salt contaminated with red halophiles and the marketed salt free from the bacteria, demonstrated that the extent of bacterial contamination of salts used, reflected bacterial spoil of the salted food.