

9009 製塩工業及び塩蔵食品における好塩菌の生態調査

大西 博(鹿児島大学)

昨年度輸入天日塩と製塩工場の試料や市販塩を供試して広範に好塩菌の生態調査を行い、多数の好塩菌を分離して生育の好塩パターンを明らかにした。本年度はその中の高度好塩性古細菌を取り上げ、好塩パターンと斜面培養の状貌により選択した23株について最新の分類基準と試験法に従ってその特性を観察した。即ち形態学的諸性質、生育のために必要なNaClとMg²⁺の最低濃度、生育できるpH範囲、人工合成培地を用いたアミノ酸の要求性、NaBr耐性及び蒸留水中の溶菌特性を調べた。また脂質については薄層クロマトグラフ法により古細菌タイプのジエーテル結合脂質を確認し、C₂₀:C₂₀の他にC₂₀:C₂₅ジエーテル結合脂質成分の有無を調べ、極性脂質パターンを既知赤色高度好塩菌のそれと比較した。

その結果 Halococcus, Natronobacterium, Natronococcus の3属に属するものはなかったが、従来の Halobacterium 属の他に生育に必要なNaCl濃度が1.5Mと低いものやアミノ酸要求のないものやNaBr耐性の強いものなど Haloferax や Haloarcula 属に類似の菌が多数含まれていた。供試菌はすべて古細菌タイプのジエーテル結合脂質を有し、No.133菌のみはC₂₀:C₂₅ジエーテル結合脂質成分を有することが見出され、この成分はこれ迄 Natronobacterium と Natronococcus の好アルカリ性好塩菌と Halococcus に知られるのみであるので、この点で本菌のユニークな特性が注目された。またNo.105菌は形態学的に Halobacterium に類似するが非着色性の好塩性古細菌であり、生育の最低のNaCl濃度は1.5Mと低く、0.1~0.005MのMg²⁺濃度の培地で一様によい生育を示し、NaBr耐性が高く、興味ある菌であった。Halobacterium, Haloarcula, Haloferax の各属の分類には脂質成分が重視されているが、No.105とNo.133の両菌の極性脂質の薄層クロマトパターンは既知の Halobacterium, Halococcus, Haloarcula, Haloferax の代表株のものとは異なり、未知の高度高塩菌の可能性が示唆された。

室温に1年間放置したオーストラリア、メキシコ、タイ国産の天日塩について好塩菌の生態調査を行った。耐塩菌や中度好塩菌は1年後に殆ど死滅していたが、赤色高度好塩菌は10³/gの生菌数が見られた。特にタイ国産のものは多様のfloraを示した。

10~30%の天日塩と市販家庭用塩を添加していかの塩辛仕込試験を行った結果、10%塩区では細菌の増殖がみられ、これはいかに付着する球菌が主であったが、20%以上の塩濃度区では生菌数が徐々に減少した。いか肉単独仕込ではいづれの濃度の塩区でも細菌の増殖がみられたが、肝臓単独仕込では10%塩区でも静菌効果がみられ、塩濃度の増加とあいまって抗菌力が強まった。いかの塩辛仕込では使用した塩の微生物学的清潔度が塩蔵食品の汚染度に反映するという結果は得られなかった。

9009 製塩工業及び塩蔵食品における好塩菌の生態調査

大西 博 (鹿児島大学)

〔研究目的〕

昨年度は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及び市販の塩を供試して、広範に好塩菌の生態調査を行った¹⁾。即ち各々の試料に含まれる好塩菌の全種類をできるだけ残さず分離することを試み、1119株の多数の好塩菌を分離し、試料と集積培養に用いた培地と分離株の斜面培養の肉眼的観察のいずれかの点で異なるもの305株を選んで代表株とした。次いで分離菌の特性の1つとして生育に対するNa⁺とK⁺とMg²⁺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、輸入天日塩からは例外なしに赤色高度好塩菌が分離されるが、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は非赤色性の中度好塩菌が分離されるなど各試料における好塩菌の分布の実体を明らかにした。

これまで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.3²⁾ にはさらに Haloarcula, Haloferax, Natronobacterium, Natronococcus の4新属が加えられた。

そこで本年度は昨年度分離した高度好塩菌中23株を選び、上記の新しい分類基準と最新の試験方法に従ってその特性を観察した。即ち生育のために必要なNaClとMg²⁺の最低濃度、生育できるpH範囲、人工合成培地を用いたアミノ酸要求性、NaBr耐性及び低塩溶液中での溶菌などの特性を調べた。

次いで供試菌株の脂質特性を明らかにするために、シリカゲル薄層クロマトグラフにより供試菌に含まれる極性脂質の種類を調べ、かつC₂₀:C₂₀ ジエーテル成分の他にC₂₀:C₂₅ ジエーテル成分を含むものが存在するかどうかを検索した。

また昨年度好塩菌の分離に用いた後1年間室温に放置した輸入天日塩の好塩菌の生態調査を試みた。

尚昨年度は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た生鮭の塩蔵試験を行い、好塩菌の汚染の実態を調べ、塩蔵食品における好塩菌の汚染には用い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。本年度は種々の濃度の天日塩と市販家庭用塩を用いて、いかに塩辛仕込試験を行い、熟成過程における生菌数の変化などの生態調査を行った。

〔研究方法〕

1. 供試高度好塩菌

昨年度輸入天日塩から分離し選択した23株の高度好塩菌(菌株番号はTable 1に示す)と比較のため4種の標準菌株 *Halobacterium cutirubrum*, *Halococcus morrhuae*, *Haloarcula vallismortis* ATCC 29715, *Haloferax volcanii* NCMB 2012 を供試した。後者の2株は野田産業科学研究所亀倉正博博士より分与されたものである。

2. 高度好塩菌の生理学的特性の観察

2. 1. 供試培地

2. 1. 1. Sehgal and Gibbons 複合培地 (SGC)³⁾: Vitamin-free casamino acid (Difco) 0.75% (%はすべて w/v%), Yeast extract (Difco) 1.0%, KCl 0.2%, Sodium citrate 0.3%, MgSO₄·7H₂O 2.0%, FeCl₂·nH₂O 2.3 mg%, NaCl 1 ~ 4 M, pH 7.0. Mg²⁺濃度は 0.005 M, 0.02 M, 0.1 M に、pH は 5.0, 6.0, 7.0 といろいろ変えて用いた。

2. 1. 2. 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. 耐塩菌や中度好塩菌の培養やいかの塩辛仕込試験における生菌数の測定に用いた。

2. 2. アミノ酸要求試験⁴⁾

2. 2. 1. Kauri, Wallace and Kushner の合成培地 (KWK)⁴⁾: NaCl 23.4% (4 M), MgCl₂·6H₂O 5.0%, K₂SO₄ 0.5%, CaCl₂ 20mg%, 1 M NH₄Cl 0.5 ml/dl, 10% glycerol 0.5 ml/dl, 10% Na-succinate 4.5 ml/dl, 0.5 M K₂HPO₄ 0.2 ml/dl, Trace elements (MnCl₂ 30 mg%, ZnSO₄ 44mg%, FeSO₄ 230 mg%, CuSO₄ 5mg% の混液) 0.1 ml/dl, Thiamin·HCl 80 μg/dl, Biotin 10 μg/dl, pH 7.0 ~ 7.2.

2. 2. 2. Onishi, McCance and Gibbons の合成培地 (OMG)⁵⁾: NH₄Cl 0.5%, glycerol 0.1%, adenylic acid 10 mg%, uridylic acid 10 mg%, NaCl 25%, MgSO₄·7H₂O 2%, KNO₃ 10 mg%, K₂HPO₄ 5 mg%, KH₂PO₄ 5 mg%, Sodium citrate 50mg%, MnSO₄·H₂O 0.03 mg%, CaCl₂·7H₂O 0.7 mg%, ZnSO₄·7H₂O 0.044 mg%, FeCl₂ 0.23 mg%, CuSO₄·5H₂O 5 μg%, Biotin 0.1 μg%, Thiamin·HCl 80 μg%, Folic acid 10 μg%, Vitamin B₁₂ 0.02 μg%. pH を KOH にて 6.2 に調節す。

2. 2. 3. アミノ酸要求試験法^{4, 5)}. 上記の KWK 培地 5 ml 宛 Klett 用試験管に取り、4 M NaCl SGC 寒天斜面培養より培地に触れないように釣菌して接種し、37℃ にて斜めにして振盪培養して生育度を経時的に比濁測定した。尚 37℃ にて 4 M NaCl KWK 寒天斜面培養を繰り返し、継代することにより生育が悪くなるアミノ酸要求株とつねに同様のよい生育を示すアミノ酸非要求株とを区別することも試みた。またこのアミノ酸要求性は 4 M NaCl OMG 培地を用いてさらに確認した。

2. 3. Br 耐性試験⁶⁾

2. 3. 1. Oren and Bekhor 培地 (OB)⁶⁾: (1). 2.8 M NaCl + 1.2 M NaBr SGC 培地 (pH 7.0) [Br]/[Cl]+[Br]= 0.3, (2). 2.0 M NaCl + 2.0 M NaBr SGC 培地 (pH 7.0) [Br]/[Cl]+[Br]= 0.5, (3). 1.2 M NaCl + 2.8 M NaBr SGC 培地 (pH 7.0) [Br]/[Cl]+

[Br] = 0.7

2. 3. 2. Br 耐性試験法⁶⁾. 4 M NaCl SGC 培地新鮮培養の 0.1 ml 宛上記の (1) ~ (3) の OB 培地 5 ml を Klett 用試験管にとったものに接種し、37°C に振盪培養して経時的に生育度を比濁測定した。

2. 4. 低塩溶液中での溶菌試験⁷⁾.

4 M NaCl SGC 培地に 37°C に振盪培養し、定常期に達した培養の生育度を比濁測定後、直ちに遠心分離して上澄を除去し、前と同量の懸濁液となるように蒸留水を加えて激しく攪拌し、比濁測定して前後の値から溶菌%を求めた。

3. 高度好塩菌の脂質特性

3. 1. エーテル結合脂質の検出^{8, 9)}

供試好塩菌を 4 M NaCl SGC 培地で 37°C にて定常期に達するまで振盪培養し、遠心分離して菌体を集め、4 M NaCl 溶液で 2 回洗浄した菌体を凍結乾燥した。乾燥菌体約 100 mg にメタノール 3 ml, トルエン 3 ml, 濃硫酸 0.1 ml を加えて混合し、50°C にて 18 時間加熱分解する。放冷後ヘキサン 1.5 ml を加えてグリセロールジエーテル部分 (diether core lipids, Fig. 1 の四角の囲みの内側) を抽出する。ヘキサン層について薄層クロマトグラフ法を行った。即ち Merck silica gel 60F₂₅₄ aluminium backed thin-layer plate (10 cm × 10 cm) を展開プレートとし、石油エーテル : エチルエーテル (85 : 15 v/v) の溶媒を用いて展開し、10 % dodecamolybdo phosphoric acid の純アルコール溶液をスプレーした後風乾し、150°C, 15 分間加熱して検出した。黄色の背景に青色のスポットが現れる。

3. 2. C₂₀ : C₂₅ diether core lipids の検出^{8~10)}

3.1. におけると同様の試料と展開プレートを用い、初め石油エーテル : アセトン (95 : 5 v/v) の溶媒を用いて展開し、風乾後同じ方向にトルエン : アセトン (97 : 3 v/v) の溶媒を用いて二重展開を行い、前と同様に検出した。

3. 3. 極性脂質の検出^{9, 11~13)}

乾燥菌体約 100 mg に 4 M NaCl 2 ml を加え、この懸濁液にメタノール 5 ml とクロロホルム 2.5 ml をこの順に加え、室温で十分振盪した後 1 夜放置し沈殿物を除き上澄をとる。この上澄にクロロホルムと蒸留水を各々 2.5 ml 加えて振盪しクロロホルム層をとり、同量のベンゼンを加えて 35°C にてロータリーエバポレーターで乾固する。この乾固物を 2.5 ml のクロロホルムに溶解し、薄層クロマトによる分析に供した。

シリカゲル薄層プレート (Machery Nagel Art.No.818033; 10 cm × 20 cm) を展開プレートとし、(a) クロロホルム:メタノール:酢酸:水 (85:22.5:10:4 v/v)¹²⁾ または (b) クロロホルム:メタノール:90 % 酢酸 (65:4:35 v/v)¹³⁾ を溶媒として展開し、風乾後 30% 硫酸 5% エタノール溶液をスプレーし、125°C, 30 分加熱してスポットを検出した。

4. 輸入天日塩中の好塩菌の生態調査

オーストラリア、メキシコ、タイ国産の輸入天日塩に含まれる好塩菌の生態を次の7種類の培地を用いて希釈法と平板法により生菌数測定を行って調べた。用いた培地は (1) 1 M NaCl NB 培地 (pH 7.0), (2) 4 M NaCl NB 培地 (pH 7.0), (3) 4 M NaCl SGC 培地 (pH 7.0), (4) 4 M NaCl SGC 培地 (pH 5.5), (5) 4 M NaCl SGC 培地 (pH 7.0) ((3)の Mg^{2+} 濃度は 0.08 M であるが、(5)は 0.005 M と低くした) (6) 2 M NaCl+2 M NaBr SGC 培地 (pH 7.0), (7) 1.2 M NaCl+2.8 M NaBr SGC 培地である。

5. いかの塩辛仕込試験と細菌の生態調査

新鮮なすめいかの肝臓と墨を破れないように取りだし、腕とひれを除く。いかの身の細切り (約 0.5 × 3 cm) を 100 g 宛 300 ml 容フタ付きプラスチックカップに入れ、肝臓 10 g 宛加える。食塩はオーストラリア産天日塩と市販家庭用塩を用いて塩濃度が 10, 20, 30% となるように加えてよく攪拌し 20°C と 37°C に放置した。尚この他にいか身と肝臓と墨の単独の塩蔵試験を行い 37°C に放置した。各区分とも毎日2回攪拌し、1 M NaCl NB 寒天培地を用いて生菌数の測定を行うとともに菌の分離を行った。

[研究結果]

1. 輸入天日塩より分離した高度好塩菌の諸性質

古細菌に属する赤色高度好塩菌 Halobacteriaceae科の中で Halococcus は球菌であり Natronobacterium と Natronococcus は好アルカリ性で pH 9.0 ~ 10.5 に生育するので容易に区別されるが、他の3属の分類上の主要な形態学的及び培養上の性質は次のとおりである¹¹⁾

	<u>Halobacterium</u>	<u>Haloarcula</u>	<u>Haloferax</u>
細胞の形態	長桿	短桿, 多形態	短桿, 多形態
アミノ酸要求	+	-	-
生育のための Mg^{2+} 要求 (M)	0.005	0.005	0.01 ~ 0.04
生育に必要な最低 NaCl 濃度 (%)	20	15	10

Haloferax は生育できる塩濃度は低いが Mg 要求は高く、pH 4.5 ~ 8.0 の広い pH 範囲に生育し、Haloarcula は Halobacterium に類似の NaCl と Mg 要求をするが、生育する pH 範囲は狭く pH 6 以下には生育しない。また Halobacterium は生育のためにアミノ酸要求を示すが、他の2属はアミノ酸要求のない点で異なる。

1. 1. 形態学的性質

4 M NaCl SGC 培地に 37°C に 4 日培養後に観察した細胞の形態は Table 1 のとおりである。供試菌 23 株中 No.105 は非着色性の高度好塩菌であるが、他はすべて赤色高度好塩菌である。No.105 1 株のみは Halobacterium 様の桿菌であったが、他の 22 株は球形、卵形、三角形、短桿、矩形、不規則形ディスク状などを含む多形態であった。Halococcus 様の球菌は全くなかった。

1. 2. 生育特性

1. 2. 1. 生育のために要求する最低 NaCl 濃度. 昨年度は 1 ~ 5 M NaCl SGC 培地における各菌株の生育曲線を観察し、これらはいずれも 1 M NaCl 培地に生育せず、2 M 以上の高濃度の NaCl を要求することを示し、かつ生育の最適 NaCl 濃度を明らかにした¹⁾。今年度はさらにそれらの生育のために必要とする最低 NaCl 濃度を決定するために、1.5 M, 2 M, 2.5 M NaCl 培地における生育を観察した。その結果 Table 1 に示すように No. 95, 105, 133, 134-1, 136, 178 の 6 株は Haloferax volcanii と同様に 1.5 M の低濃度の NaCl 培地に生育できた。また Haloarcula vallismortis と同じく生育の最低塩濃度が 2.5 M である菌株は No. 50, 76-1, 93, 116, 117, 135 の 6 株で、他の 11 株は生育のためにいずれも 3 M 濃度以上の NaCl を要求した。

1. 2. 2. 低濃度 Mg²⁺培地における生育. Haloferax は生育のために必要とする NaCl 濃度は低いが、比較的高濃度の Mg²⁺ を要求し 0.005 M には生育できない。これは死海のような塩環境を反映しているようであり、Haloferax volcanii はその代表株である²⁾ 観察結果は Table 1 に示したように 0.005 M Mg²⁺ 培地に生育できない菌株は No. 21, 31, 57, 95, 135, 147, 177, 178 の 8 株であり、NaCl 要求が低く Mg²⁺ 要求が高いものは No.95 と No.178 であった。

1. 2. 3. 生育の pH. 供試菌はいずれも 3 ~ 4 M NaCl SGC の pH 5.0 培地に生育できないが、pH 6.0 と 7.0 の培地に生育した。

1. 2. 4. アミノ酸の要求性. アミノ酸要求性のない菌株は No. 21, 31, 52, 76-1, 133, 134-1, 135, 136, 177, 178 の 10 株である。(Table 1)

1. 3. Br 耐性

最近 Halobacterium は Br 耐性が中度であるが、Haloarcula vallismortis と Haloferax (H. mediterranei, H. gibbonsii) は高度に耐性であり、特に Haloferax volcanii は極端に耐性であることが示された³⁾。NaCl と NaBr の比率の異なる SGC 培地における生育を観察した結果、Table 2 に示すように [Br]/[Cl]+[Br]=0.3 まで生育する中度の耐性の No. 21, 31, 57, 95, 135, 147 の 6 株と [Br]/[Cl]+[Br]=0.5 まで生育する高度耐性の No. 50, 52, 67, 76-1, 78, 84, 93, 94, 100-1, 116, 117, 133, 134-1, 136, 178 の 15 株に分けられたが、No. 105 は極端に高度の Br 耐性を示し、[Br]/[Cl]+[Br]=0.7 にも生育し、一方 No. 177 は比率 0.3 でも生育せず耐性が弱かった。

1. 4. 低塩溶液中での溶菌

Halobacterium は蒸留水に懸濁すると直ちに溶菌し透明な赤色溶液になるが、一方 Halococcus はこの溶菌に耐性であることが知られている⁴⁾。 Halobacterium cutirubrum 標準株は蒸留水中の濁度が 4 M NaCl 溶液中のその 5.5% にまで急速に低下し、Haloarcula vallismortis も略同様の現象を示し、Table 3 に示すように No. 21, 31, 50, 52, 57, 67, 76-1, 78, 84, 93, 94, 95, 100-1, 116, 117, 133, 134-1, 135, 136, 177, 178 の 21 株においてこのタイプの著しい溶菌が見られた。Haloferax volcanii は Ha-

lobacterium に比べて低塩溶液中の溶菌に耐性がやや強く、溶菌 % は 84.5% であったが、No.105 と No.147 がこのタイプを示した。

1. 5. 供試高度好塩菌中ユニークな特性を有する No.105 菌について。

上記の諸性質の観察結果から No.105 菌が特にユニークな特性を有することが見いだされた。No.105 は形態学的には長桿菌で Halobacterium cutirubrum に類似するが、非着色性であり、生育に必要とする最低の NaCl 濃度は 1.5 M と低く、最適濃度も 2 M と低い。また 0.1 M, 0.02 M, 0.005 M Mg^{2+} の何れの濃度においても Mg 濃度にほとんど関係なく同様に良い生育を示した。さらに NaBr 耐性が極めて高く、 $[Br]/[Cl]+[Br]=0.7$ の培地に供試菌中ただ 1 株本菌のみ生育した。尚蒸留水中の溶菌に対しても他の菌株に比べてやや高い抵抗性を示した。

2. 脂質特性。

脂質のメタノリシス画分の薄層クロマトグラムは供試 23 株全部について $R_f=0.6$ の脂肪酸のメチルエステルのスポットは全く検出されず、 $R_f=0.22$ のスポットのみ検出され、このことから全菌株とも高度好塩性古細菌のジエーテル結合脂質を有することが明らかになった。(Fig. 2A) No.105 は赤色菌でないが、エステル結合脂質の真性細菌タイプではなくて、エーテル結合脂質の古細菌タイプの脂質特性を有することが注目された。

次に供試菌株中に $C_{20}:C_{20}$ ジエーテル結合脂質の他に $C_{20}:C_{25}$ ジエーテル結合脂質を含むものが存在するかどうかを調べた結果、Fig. 2B に示すように No.133 菌にのみ2つのスポットが現れ、 $C_{20}:C_{25}$ のジエーテル結合脂質成分を有することがわかり、本菌はこの点で他の供試菌とは異なるユニークな脂質特性を示した。著者ら⁹⁾はさきに好アルカリ性でない非着色性高度好塩菌 No.172 が $C_{20}:C_{20}$ の他に $C_{20}:C_{25}$ ジエーテル結合脂質を有することを報告した。今回の No.105 菌は同じく非着色性で高度好塩菌としての古細菌タイプの脂質を有するが、 $C_{20}:C_{20}$ のジエーテル結合型のみである点で両者は異なる。

さらに No.105 と No.133 の両菌について薄層クロマトグラフにより極性脂質を調べた。Fig.3 に示すように上から phosphatidyl glycerol, phosphatidyl glycerophosphate, glycolipid のグループのスポットが検出されるが、No.105 と No.133 はともに Halobacterium cutirubrum, Halococcus morrhuae, Haloferax volcanii, Haloarcula vallismortis のいずれの菌のパターンとも異なり、興味ある脂質成分を含むものと考えられ、今後詳細に検討しなければならない。

3. 輸入天日塩中の好塩菌の生態調査。

昨年度の好塩菌の分離に用いてその後室温に1年以上放置しておいたオーストラリア、メキシコ、タイ国産の3種の輸入天日塩について、研究方法の項に記したように7種類の培地で培養試験を行った。結果は Photo.1 に示したように、NB 培地では 1 M NaCl でも 4 M NaCl でもタイ国産の試料に微弱な生育が認められた以外は全く生育がなく、耐塩菌や中度好塩菌は1年間に逐次死滅したと考えられる。一方赤色高度好塩菌は尚かなり

生存し、(3), (5), (6) の培地によく生育し、 $10^3/g$ の生菌数がみとめられた。タイ国産のものは (4) の pH 5.5 培地に生育する菌や (7) の NaBr 耐性の強い菌も認められ、Haloferax 属のものなど多様の高度好塩菌が尚生存していることがわかった。

4. いかの塩辛仕込試験と細菌の動態調査。

いかの塩辛仕込試験は研究方法の項に記したように塩の種別（天日塩と市販家庭用塩）と塩濃度（10, 20, 30%）及び仕込温度（20℃, 30℃）により 12 区分に分けて行い、1 M NaCl NB 寒天平板培地を用いて、仕込直後、3 日、7 日、14 日後の生菌数測定を行った。

市販家庭用塩は好塩菌を含まず微生物学的に清潔であるが、これを用いた 10% 塩区では仕込当初 $10^4/ml$ の菌数であったものが、37℃, 3 日後に $10^7/ml$ と著しい生菌数の増加を示し、好塩菌を含む天日塩仕込のものと大差が見られなかった。いかは肉身、肝臓ともに多数の細菌を含みそれらが増殖したものと考えられ、この場合いかの塩辛の細菌による汚染度は用いた塩の微生物学的清潔度とは関係がないようである。一方塩濃度を 20% に高めた区では生菌数の経時的増加はほとんどなく生育が抑えられ、30% 塩濃度区では細菌が徐々に死滅し、14 日後にはいずれの仕込区分に於ても細菌が 0 になった。

またいかの肉身と肝臓を別々に塩蔵した試験では、肝臓単独仕込の場合当初 $10^5/ml$ の細菌が存在したが、肝臓成分が静菌効果を示し 10% 塩仕込で増殖はなく次第に生菌数を減少し、27 日後には全て死滅してしまった。20% 以上の塩濃度仕込では 7 日後に全て死滅し、肝臓は高い塩濃度と相俟って強い抗菌力を示した。これに対しいかの肉身の単独仕込では当初 $10^3/ml$ の生菌数であったものが 3 日後には 10%, 20%, 30% 塩濃度仕込区でそれぞれ $10^7/ml$, $10^5/ml$, $10^4/ml$ に増殖し、肝臓仕込の場合と全く異なった。27 日後においてもいずれの仕込区でも細菌が生存し、30% 塩区では赤色高度好塩菌が検出された。

以上の試験において任意に分離した 56 株中 80% は球菌であり、Micrococcus と Staphylococcus であり、3 ~4 M NaCl または KCl 培地に生育できる耐塩菌が多かったが、1 ~3 M NaCl を特異的に要求する中度好塩菌も含まれた。

[考察]

昨年度好塩菌の分離に用いた後室温に 1 年放置した産地の異なる 3 種類の輸入天日塩について好塩菌の生態調査を行った。昨年度天日塩には例外なしに赤色高度好塩菌とともに非着色性の種々の耐塩菌や中度好塩菌が存在することを明らかにし、それらの菌を分離したが、1 年間放置後耐塩菌や中度好塩菌は徐々に死滅するのに赤色高度好塩菌はなお $10^3/g$ の生菌数が得られた。タイ国産天日塩のフローラは Haloferax 属菌を含むなど他の 2 種類の天日塩に比べて多様性を示した。

昨年度 322 株の赤色高度好塩菌を分離し、試料、集積培地、斜面培養の肉眼的観察のいずれかの点で異なるもの 84 株を代表株として選択した。本年度はその中からさらに生育の好塩パターンと斜面培養の状貌から Table 1 に記した 23 株を選別して、形態学的諸性質、生育に必要な最低 NaCl 濃度と Mg^{2+} 濃度、生育の pH、アミノ酸要求性、NaBr

耐性、蒸留水中での溶菌特性を観察した。その結果 Halococcus, Natronobacterium, Natronococcus の3属に属するものはなかったが、従来の Halobacterium 属の他に、生育に必要な最低の NaCl 濃度が 1.5 M と低いものや、アミノ酸を要求しないものや、NaBr 耐性の強いものなど Haloferax や Haloarcula 属に類似の菌が多数含まれていた。

供試菌はすべて古細菌タイプのジエーテル結合脂質を有し、No.133 菌は C₂₀:C₂₀ ジエーテル結合脂質成分の他に C₂₀:C₂₅ ジエーテル結合脂質成分を有し、そのユニークな特性が注目された。

赤色高度好塩菌でこの C₂₀:C₂₅ ジエーテル結合脂質成分を有するものは Natronobacterium と Natronococcus の好アルカリ好塩菌^{9, 10, 14)} と Halococcus morrhuae¹⁵⁾ と Halococcus saccharolyticus¹³⁾ が知られるのみである。著者ら⁹⁾ は以前非着色性高度好塩菌 No.172 が C₂₀:C₂₅ 脂質成分を有することを報告したが、今回 C₂₀:C₂₅ 成分を有することが発見された No.133 菌は赤色高度好塩菌であり、生育に必要な最低 NaCl 濃度が 1.5 M と低く、アミノ酸要求性がないこととともにユニークな特性を有する興味ある菌である。

現在 Halobacterium, Haloarcula, Haloferax の各属の分類は脂質成分を重視している。Halobacterium は phosphatidyl glycerosulfate と sulfated triglycosyl 及び tetraglycosyl diether を含み、Haloarcula は phosphatidyl glycerosulfate と triglycosyl diether を有し、Haloferax は phosphatidyl glycerosulfate を欠き、diglycosyl diether と sulfated diglycosyl diether を有する点で区別される。

我々の No.105 と No.133 の両株の極性脂質の2つの溶媒系を用いた薄層クロマトパターンは Halobacterium cutirubrum, Halococcus morrhuae, Haloarcula vallismortis, Haloferax volcanii のものと異なった。最近報告されている fast atom bombardment mass spectrometry 法¹⁶⁾ などによる精査や物質の単離確認が必要である。

10 ~ 30% の天日塩と市販家庭用塩を添加していかの塩辛仕込試験を行った結果、10% 塩区では細菌の増殖があるが、20% 以上の塩濃度区では生菌数が徐々に減少し、森¹⁷⁾ の結果と同様であった。細菌はいかに由来し、いか肉身単独仕込では 10 ~ 30% 塩区のいずれでも細菌の増殖がみられたが、肝臓単独仕込では 10% 塩区でも静菌効果が見られ、塩濃度の増加と相俟って抗菌力が強まった。いかの塩辛仕込では塩濃度の低いこともあり、昨年¹⁾ の鮭の塩蔵試験¹⁾ と異なり使用した塩の微生物学的清潔度が塩蔵食品の汚染度に反映するという結果は得られなかった。

[今後の課題]

今回の2年に亘る研究により製塩工業に関係する多くの試料や塩蔵食品から多種多様な好塩菌が分離された。差し当っては菌学的にユニークな特性を有することが見いだされた No.105 と No.133 の両菌について、考察の項で述べたような最新の技術を用いて脂質特性を明らかにし、分類学的位置を明らかにする必要がある。また広い立場からは好塩菌

及びその酵素や生産物の利用面の開発が重要な問題であり、そのために今回の分離株が役立つことが期待される。

[引用文献]

1. 大西 博, 平成元年度 (財)ソルトサイエンス研究財団助成研究報告集. p.205 ~ 219 (1991)
2. W.D.Grant and H.Larsen, Group III. Extremely halophilic archaeobacteria. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Ed. by J.T.Staley, M.P.Bryant, N.Pfenning and J.G.Holt) Vol.3, p.2216 ~ 2233 (1989)
3. S.N.Sehgal and N.E.Gibbons, Can. J. Microbiol. 6, 165 ~ 169 (1960)
4. T.Kauri, R.Wallace and D.J.Kushner, System. Appl. Microbiol. 13, 14 ~ 18 (1990)
5. H.Onishi, M.E.McCance and N.E.Gibbons, Can. J. Microbiol. 11, 365 ~ 373 (1965)
6. A.Oren and D.Bekhor, Current Microbiol. 19, 371 ~ 374 (1989)
7. D.Abram and N.E.Gibbons, Can. J. Microbiol. 6, 535 ~ 543 (1960)
8. H.N.M.Ross, M.D.Collins, B.J.Tindall and W.D.Grant, J. Gen. Microbiol. 123, 75 ~80 (1981)
9. H.Onishi, T.Kobayashi, S.Iwao and M.Kamekura, Agric. Biol. Chem. 49, 3053 ~ 3055 (1985)
10. M.De Rosa, A.Gambacorta, B.Nicolaus, H.N.M.Ross, W.D.Grant and J.D.Bu'Lock, J. Gen. Microbiol. 128, 343 ~ 348 (1982)
11. S.C.Kushwaha, G.Juez-Perez, F.Rodriguez-Valera, M.Kates and D.J.Kushner, Can. J. Microbiol. 28, 1365 ~ 1372 (1982)
12. M.Torreblanca, F.Rodriguez-Valera, G.Juez, A.Ventosa, M.Kamekura and M.Kates System. Appl. Microbiol. 8, 89 ~ 99 (1986)
13. N.Moldoveanu, M.Kates, C.G.Montero and A.Ventosa, Biochim. Biophys. Acta, 1046, 127 ~ 135 (1990)
14. M.De Rosa, A.Gambacorta, B.Nicolaus and W.D.Grant, J. Gen. Microbiol. 129, 2333 ~ 2337 (1983)
15. B.J.Tindall, H.N.M.Ross and W.D.Grant, System. Appl. Microbiol. 5, 41 ~ 57 (1984)
16. K.-D.Kloppel and H.L.Fredrickson, J. Chromatography 562, 369 ~ 376 (1991)
17. 森 勝美, 醸協, 82, 489 ~ 494 (1987)

Table 1. Cell morphology and requirements of NaCl and Mg²⁺, and amino acids for growth of extreme halophiles isolated from solar salt.

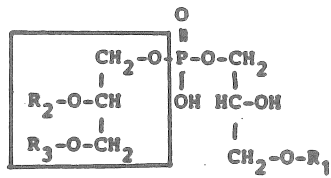
Strain No.	Origin of solar salt for isolation	Cell morphology	NaCl requirement for growth (M)		Mg ²⁺ requirement for growth	Amino acids requirement for growth
			Minimum	Optimum		
21	Uncertain	Short pleomorphic rod	3.0	4.0~5.0	0.02	-
31	Australia	Pleomorphic	3.0	4.0~5.0	0.02	-
50	"	Short pleomorphic rod	2.5	4.0	0.005	+
52	"	Pleomorphic	3.0	4.0	0.005	-
57	"	"	3.0	4.0	0.02	+
67	"	Short pleomorphic rod	3.0	4.0	0.005	+
76-1	"	"	2.5	3.0~4.0	0.005	-
78	"	"	3.0	4.0	0.005	+
84	"	Pleomorphic	3.0	3.0~4.0	0.005	+
93	"	"	2.5	3.0	0.005	+
94	"	"	3.0	4.0~5.0	0.005	+
95	"	"	1.5	2.0~4.0	0.02	+
100-1	"	"	3.0	3.0	0.005	+
105	"	Long rod	1.5	2.0	0.005	+
116	"	Pleomorphic	2.5	4.0	0.005	+
117	"	"	2.5	3.0~4.0	0.005	+
133	Thailand	Short rod or oval	1.5	3.0~4.0	0.005	-
134-1	"	"	1.5	3.0~4.0	0.005	-
135	"	Pleomorphic	2.5	3.0~4.0	0.02	-
136	"	Short rod or oval	1.5	3.0~4.0	0.005	-
147	Mexico	Pleomorphic	3.0	4.0~5.0	0.02	+
177	"	"	3.0	4.0	0.02	-
178	"	Pleomorphic rod	1.5	4.0	0.02	-

Table 2. The tolerance of extreme halophiles towards bromide.

Strain No.	Growth in SGC medium of different bromide concentration [Br]/[Cl]+[Br]=		
	0.3	0.5	0.7
21	+	-	-
31	+	-	-
50	+	+	-
52	+	+	-
57	+	-	-
67	+	+	-
76-1	+	+	-
78	+	+	-
84	+	+	-
93	+	+	-
94	+	+	-
95	+	-	-
100-1	+	+	-
105	+	+	+
116	+	+	-
117	+	+	-
133	+	+	-
134-1	+	+	-
135	+	-	-
136	+	+	-
147	+	-	-
177	-	-	-
178	+	+	-

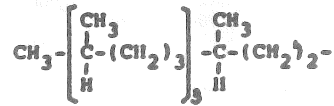
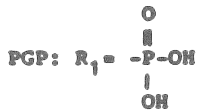
Table 3. Cell lysis of extreme halophiles in distilled water.

Strain No.	Turbidity (Klett-Summerson unit)		Lysis (%)
	in 4 M NaCl	in distilled water	
21	250	6	97.6
31	294	28	90.5
50	324	6	98.1
52	325	9	97.2
57	266	10	96.2
67	280	5	98.2
76-1	330	7	97.9
78	314	22	93.0
84	286	6	97.9
93	305	8	97.4
94	327	10	96.9
95	275	10	96.4
100-1	325	8	97.5
105	240	35	85.4
116	290	2	99.3
117	309	9	97.1
133	296	10	96.6
134-1	308	9	97.1
135	282	5	98.2
136	340	24	92.9
147	290	35	87.9
177	244	6	97.5
178	302	6	98.0



PG: $R_1 = -H$

$R_2, R_3 =$ phytanyl group (C_{20})



or sesterterpanyl group (C_{25})

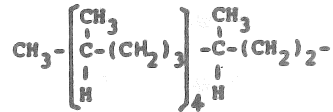


Fig. 1. Structure of phospholipids and glycolipids in extreme halophiles⁹⁾. PG, phosphatidyl glycerol; PGP, phosphatidyl glycerophosphate. In the glycolipids, the glycerophosphate moiety (outside the square) is replaced by a sugar moiety. Upon methanolysis the glycerol diether moiety (inside the square) is liberated.

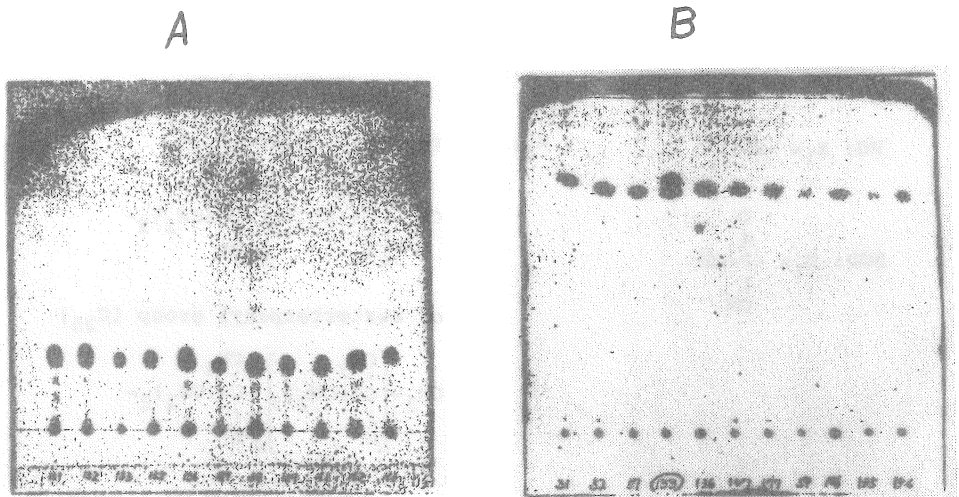


Fig. 2. Thin-layer chromatographic analysis of whole organism methanolysates of the halophiles.

A: Plates were developed with petroleum ether:diethyl ether (85:15 v/v).

B: Plates were first developed with petroleum ether:acetone (95:5 v/v), dried and then re-developed in the same direction with toluene:acetone (97:3 v/v).

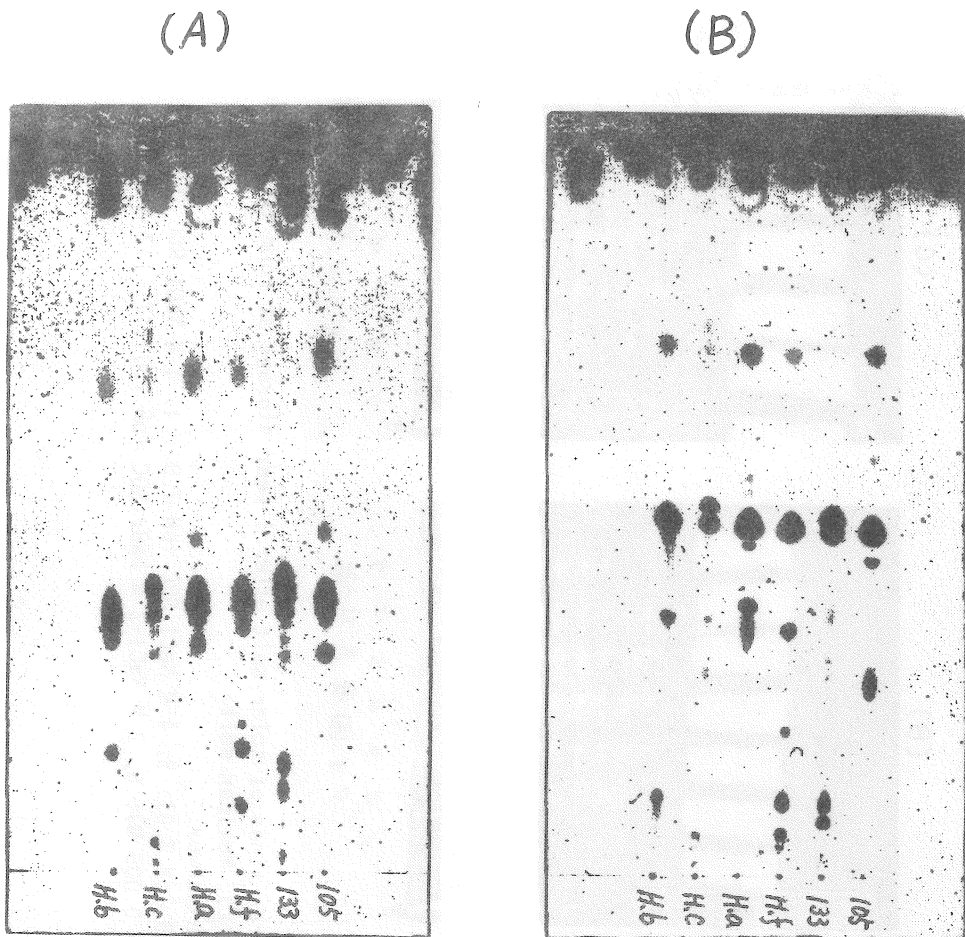


Fig. 3. Thin-layer chromatogram of polar lipids from the following strains: Halobacterium cutirubrum(H.b), Halococcus morrhuae(H.c), Haloarcula vallismor-tis(H.a), Haloferax volcanii(H.f), a strain No. 105 and a strain No. 133. The solvent system: (A), chloroform:methanol:acetic acid:water (85:22.5:10:4 v/v), and (B) chloroform:methanol:90% acetic acid (65:4:35 v/v).

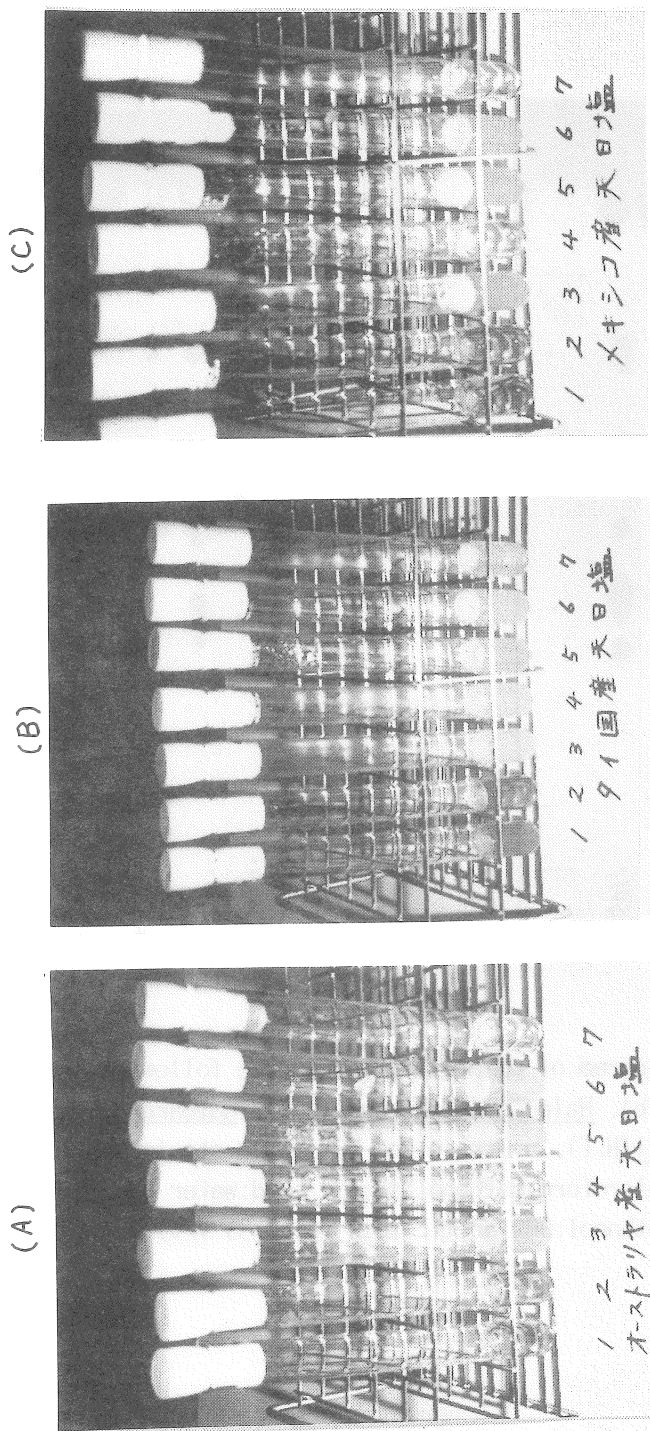


Photo. 1. Ecological survey of the three kinds of solar salt after 1 year storage at room temperature.

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

The following 7 media were used for the survey.

- 1, 1 M NaCl NB (pH 7.0);
- 2, 4 M NaCl NB (pH 7.0);
- 3, 4 M NaCl SGC (pH 7.0);
- 4, 4 M NaCl SGC (pH 5.5);
- 5, 4 M NaCl SGC (pH 7.0, low Mg^{2+} concentration as 0.005 M);
- 6, 2 M NaCl+2 M NaBr SGC (pH 7.0);
- 7, 1.2 M NaCl+2.8 M NaBr SGC (pH 7.0).

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

Some characteristics of the 23 strains of extremely halophilic archaeobacteria selected, were examined according to the most recent taxonomic criteria and experimental methods. That is, morphological properties, the minimum concentration of NaCl and Mg^{2+} required for growth, pH range and amino acid requirement for growth, tolerance towards NaBr, and lysis in distilled water. Also, detection of archaeobacterial diether lipid and of $C_{20}:C_{25}$ diether core lipids as well as $C_{20}:C_{20}$ moiety was carried out according to thin layer chromatography. Furthermore, the thin layer chromatographic pattern of polar lipids of the 23 strains were compared with those of the known red extreme halophilic bacteria.

It was found that the properties of the halophiles examined, were analogous to those of genus Halobacterium, Haloarcula or Haloferax but not genus Halococcus, Natronobacterium or Natronococcus. In particular, the following 2 strains showed very interesting and unique characteristics: a strain No.133 had $C_{20}:C_{25}$ diether core lipid as well as $C_{20}:C_{20}$ moiety, and a strain No. 105 was a non-pigmented extremely halophilic archaeobacterium showing the minimum NaCl requirement as low as 1.5 M for the growth, the uniformly good growth in the wide range of 0.005 ~ 0.1 M Mg^{2+} , and high tolerance towards NaBr. Also, it was suggested from the thin layer chromatographic patterns of their polar lipids that the both strains would possibly be novel halophilic archaeobacteria.

After storage for 1 year at room temperature, ecological survey of halophilic bacteria was done with the 3 kinds of solar salt from Australia, Mexico and Thailand. The result showed that salt-tolerant and moderately halophilic bacteria almost died out during the storage while red extremely halophilic bacteria were still alive giving 10^3 viable cells per 1 g of salt.

Microbiological tests of salted squid making added with 10 ~ 30% of solar salt or refined salt, demonstrated that the salted fish meat alone permitted bacterial growth over all NaCl concentrations while the salted squid guts alone had bacteri-cidal action with increasing NaCl concentration.