

9108 塩塊に保存されたバクテリアに関する研究

森下日出旗(大阪市立環境科学研究所)

塩は元来、微生物を殺す殺菌性 Killing effect を有することでよく知られている。例えば、漬物に塩を使用するのは腐敗バクテリアの増殖を阻止し、野菜を保存するためのものであり、醤油、味噌においては高濃度の塩により特殊環境を造り腐敗バクテリアを防ぎ発酵、醸造を行なわしめると云うものである。

日本人は古来よりこの事を行なってきた。このことはいずれも塩の持つ特性を利用したものである。しかしながら、この殺菌作用を有する塩の中にバクテリアが存在することが解った。その塩は海外からの輸入塩塊であり、特に天日塩にそのことが見られた。

実験に使用した天日塩塊はオーストラリアからのものであり、この塩から分離されたバクテリアには、3種類のもが見られたが、これらはすべて好塩性細菌であり、Na-freeでは生育出来ず特異的にNa⁺を要求するものであった。この事からこれらは絶対的好塩性細菌 Obligate halophilic bacteria であり、低度好塩性細菌 Slightly halophilic or marine bacteria、中等度好塩性細菌 Moderate halophilic bacteria、高度好塩性細菌 Extreme halophilic bacteria であった。今回は低度、及び中等度好塩性細菌について、興味ある知見が得られたので報告する。

得られたバクテリアは殆どすべて耐塩性を示し、最高3.5M NaClまで生長が可能であり、全体の95%をしめた。また、生育温度に対しても25°Cが最適温度であるが、37°C、42°Cでも生育できる広域温度適応好塩性細菌もみられた。また、培地の栄養要求性についても、貧栄養性 Oligotrophic characterを有する富栄養性のEutrophic bacteriaであった。

また0.115M NaClを含むBYP mediumでは、0.5M NaClの存在でのみ生育でき、他のSalts, KCl, MgCl₂, LiClでは、生育できないものと、できるものが見られた。特に興味ある点はLiClによる高浸透圧環境で生育がみ見られたことである。Liイオンは生細胞に対して全く要求性が見られないことから、イオン強度、それに伴う高浸透圧環境が要求される事が明らかとなった。

9108 塩塊に保存されたバクテリアに関する研究

森下日出旗(大阪市立環境科学研究所)

はじめに

わが国における製塩は、海水を利用した天日塩 (Solar salts) であり、その量は年間110万トンといわれている。一方、外国からの塩の輸入もみられ、その輸入量は約7倍、720万トンに達している。その輸入量の50%はメキシコからで、また残り40%はオーストラリアからのものである。これに対して、ヨーロッパではその多くは岩塩 (Rock salts) に依存している。

これらの天日塩 (Solar salts) は、歴史的に魚や肉の保存や皮の加工によく使用されたが、そのような場合によく赤変が起り問題になっていた。¹⁾ このことは、微生物に因ることが明らかになり、²⁾ その原因微生物は高度好塩菌 (Extremely halophilic bacteria) である事が証明された。³⁾

塩は本来、微生物を殺す殺菌作用 (Killing effect) を有することで良く知られている。それ故、わが国では昔から漬物等に塩を使って腐敗バクテリアの増殖を阻止し、野菜を保存している。また醤油、味噌においては、高濃度の塩により特殊環境を造り腐敗バクテリアを防ぎながら醸造、発酵を行なっている。この様にわが国では、古来より塩の持つ特性をうまく生活に利用してきた。この事は日本の食文化として認められているところである。

しかしながら、この殺菌作用を有する塩の中にバクテリアが存在することが解ってきた。この事は海外からの輸入塩にみられ、それはオーストラリアやメキシコからの天日塩 (Solar salts) にみられた。

そこで、これらの輸入塩からバクテリアの分離を試みた。これらの中には高度好塩菌 (Extremely halophilic bacteria)、中等度好塩菌 (Moderately halophilic bacteria)、低度好塩菌または海棲細菌 (Slightly halophilic bacteria or marine bacteria) の存在することが明らかとなった。⁴⁾

そこで、その存在形態と共にこれらのバクテリアのもつ性質について検討した。

材料及び方法

実験に使用した塩塊は、オーストラリア産の輸入塩でオーストラリアから船で運ばれた天日塩 (Solar salts) である。それ故、少なくとも輸入のために1ヵ月以上は経過しているものと思われる。

実験に先立ちこれらの塩塊に付着しているバクテリアを除去するため滅菌蒸留水で洗浄して使用した。これをBYP medium⁵⁾ (Polypeptone 10.0 g, Beef extract 3.0 g, Yeast extract 3.0 g, Dist. water 1,000 ml, pH 7.2) に0.5 M および 1.5 M の濃度になるように塩塊を加え、それぞれ 30°C で培養し、バクテリアの分離を行なった。また高度好塩菌の分離のため、SGC medium⁶⁾ (Casamino acid 7.5 g, Yeast extract 10.0 g, Na-citrate 3.0 g, KCl 2.0 g, MgSO₄·7H₂O 20.0 g, FeSO₄·7H₂O 0.05 g, MnSO₄·4H₂O 0.25 mg, NaCl 250.0 g, Dist. water 1,000 ml, pH 7.4) を使用した。

なお、生長量は Bausch and Lomb 20 分光光電光度計 (島津製作所製) で650 nm にて測定した。⁵⁾ また、生理、生化学的性質として、温度、栄養、耐塩性、塩類影響などを調べた。

結果及び考察

輸入塩塊より分離した分離株28株について、まず NaClの要求性を調べてみた。いずれの株も NaCl環境では生育出来、NaCl-free 環境では生育がみられず NaClの要求性を示すことが明らかとなった。また、これらのバクテリアは海水と同じNaCl濃度と等張の浸透圧環境を、非電解質のSorbitolによって作製した環境において、生長を調べてみたところ、生長は見られなかった。それ故、これらのバクテリアは何か浸透圧以外の生長因子を、生育環境に要求しているものと思われる。

Naイオンを特異的に要求する場合、好塩性細菌 (Halophilic bacteria) と認められる。^{5,7,8)} SGC 培地で分離した10株の分離株についても同様で NaCl-freeでは生育はみられず、4 M NaClで生育が見られた。それ故、これらは高度好塩性細菌 (Extremely halophilic bacteria) であると認められた。このうち、Bacteriorhodopsin が欠損しているものも分離された。

そこでまず、分離細菌の耐塩性について調べてみた。結果をFig. 1 に示した。この結果によると、0 M NaCl では生長は見られないものの、3.5 M NaCl でも生長が見られ、3 M NaClで89 %、3.5 M NaClで 53 % の株に耐塩性がみられた。この結果、殆どのバクテリアは耐塩性を有していることが明らかとなった。

典型的な海棲細菌は NaCl-freeでは生育できず、0.5 M NaClが最適濃度で、1.5 M NaClでは生育出来ない特性を有している。^{5,7,8)}

次に、生長のための環境におけるNaClの最適濃度について調べてみた。結果はFig. 2 にしめした。分離株の No. 8, No. 10 の株はいずれも 0.5 M NaCl を最適濃度としており、低度好塩性細菌 (Slightly halophilic bacteria) であるものの、海棲細菌 (Marine bacteria) と同様であった。^{5,7,8,9)} しかし、分離株 No. 8 の場合、3.5 M NaCl でも生長が見られ、非常に高い耐塩性を有していた。多分、このことは Marine bacteria 由来のものでありながら塩塊に埋め込まれている内にこの様な高い耐塩性を獲得したものとおもわれる。^{10,11)}

また別の分離株、即ちNo. 2 やNo. 24 についても調べてみた。結果をFig 3 に示した。この場合、1 M NaCl 濃度に生長の最適性がみられ、しかも、2.5 M NaCl や 3 M NaClでも生長がみられ、高い耐塩性を有している事が明らかとなった。

次に、栄養要求性について調べてみた。結果をFig. 4 に示している。本来海洋由来の Marine bacteria は従属栄養細菌 (Heterotrophic bacteria) が殆どで⁽¹²⁾ 栄養的にも貧栄養細菌 (Oligotrophic bacteria) として知られ、⁽¹³⁾ 普通使用されている培地の1/10 または1/100 でも生長が可能である。これに対して分離株 No. 2 の場合、低濃度の培地では生育が見られると共に、2倍濃度の高濃度培地でも良い生長を示すことから、高い栄養濃度、即ち富栄養培地で生長が可能であった。

この事から、これらのバクテリアは富栄養細菌 (Eutrophic bacteria) であった。一方、No. 8 株の場合、低栄養培地では生長が見られず、絶対的富栄養性 (Obligately eutrophic character) を示した。

次に、温度について検討してみた。結果はTable 1 に示した。海棲細菌 (marine bacteria) の場合、37°C では生育出来ず低温性を示すことから、好冷性細菌 Psychrophilic bacteria として知られているが、^(7,14) 分離株についても調べてみた。その結果、2つのタイプに分けられ、37°C では生育出来ない本来の Marine bacteria type のものと 37°C や42°C でも生育がみられる高温でも生育可能のものもみられた。このことは、No. 2 株と No. 10株についてもそうであった。しかし、これらの分離株はいずれも 25°C が最適温度であり、この事から海棲細菌が高温に適応したものと考えられる。

次に、Na以外のカチオンによる等張環境での生長について調べてみた。結果はTable 2 に示している。その結果、NaCl以外では生長出来ないものと、出来るものがみられた。BYP培地そのものは、すでに16.9 mM Naを含有している。⁽²⁾ しかしこの濃度では海棲細菌は生育出来ないのが普通である。⁽⁵⁾ そのため浸透圧やイオン濃度等、適当な環境条件が、海棲細菌にとって保持されれば、細胞形態を維持し、酵素も働き生長が可能となる。^(2,15,16) この事に関して、海に棲むバクテリアは遺伝的にも海の塩環境に適応しており、浸透圧とイオン強度についてその調節能力を有している。^(5,17) さらに、これらのバクテリアはNaイオンを特異的に生長のための環境に要求している。^(5,17) しかも、その最適濃度は0.5 M NaClである。さらに、このNa⁺は物質の取込のための能動的透過性Active transport^(18,19) やATPaseなど酵素の活性化にも必要であることが知られている。⁽²⁾

輸入塩から分離したバクテリアは絶対好塩性 (Obligately halophilic character) を有しているものの、海のバクテリアとしては、耐塩性、温度、塩の種類などについて可なり変異を起こしていた。この結果からみると、分離されたバクテリアは海水由来で海棲細菌 (Marine bacteria) であるとしても、塩塊と云う特殊環境に埋め込まれ、さらに輸送という時間的経過をたどっているうちに、変異と適応を繰り返しながら可なり多様性 (Diversity) を有する特有なバクテリアになっていることが明らかとなった。

まとめ

オーストラリアからの輸入塩塊にバクテリアが存在し、そのバクテリアを分離することに成功した。そして、その分離株の性質を検討した結果、低度好塩性細菌または海棲細菌 (Slightly halophilic bacteria or Marine bacteria)、中等度好塩性細菌 (Moderately halophilic bacteria)、高度好塩性細菌 (Extremely halophilic bacteria) のいずれのバクテリアも存在することが明らかとなった。

しかし、分離されたバクテリアの中には、温度、栄養、耐塩性、塩類等への挙動など可なり変化した性質が認められた。このことは海水由来のバクテリアが塩塊と云う特殊環境に細胞を埋め込まれたために、変異と適応によりその性質において極めて多様性を有するバクテリアとして存在している事が明らかとなった。

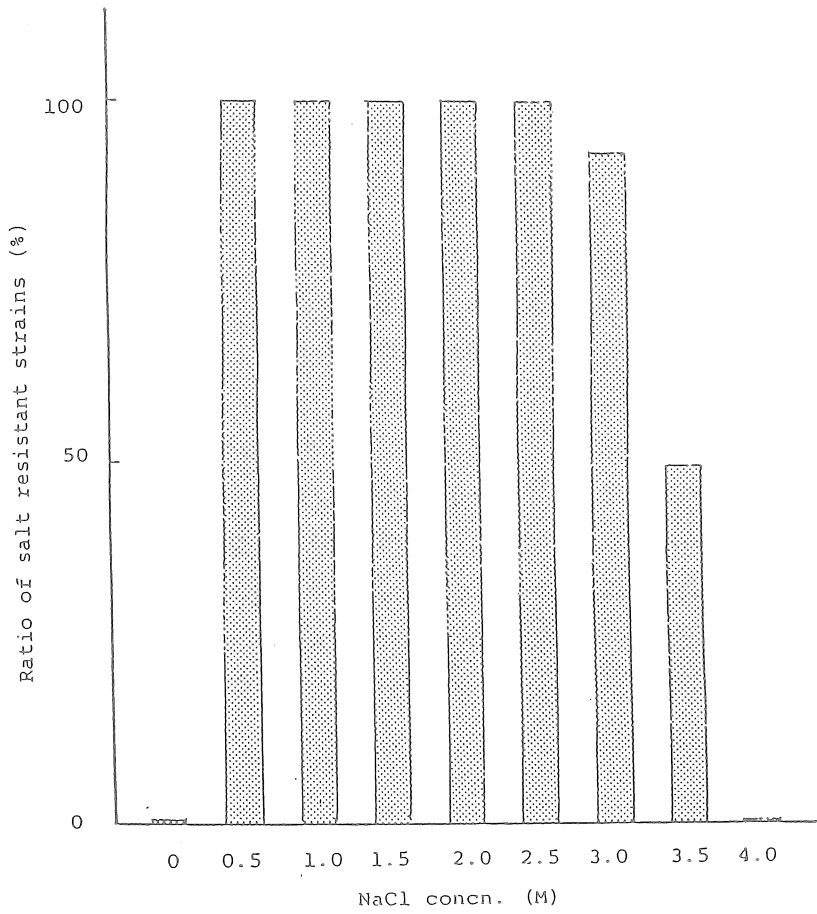


Fig. 1. Salt resistance of isolated bacterial cells

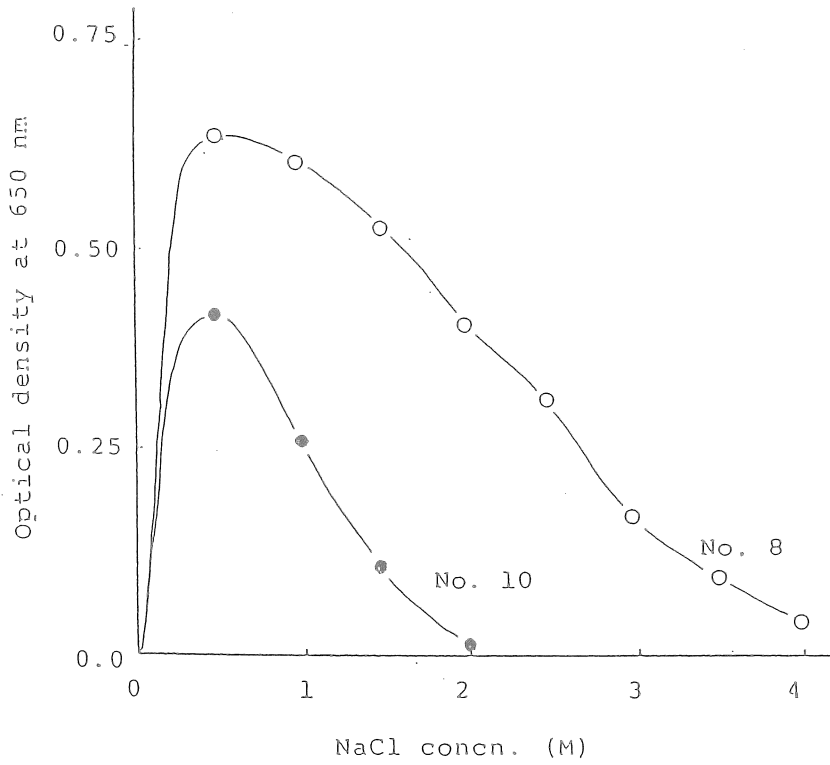


Fig. 2. Effect of NaCl concentrations on growth of isolated bacterial strains No. 8 and No. 10

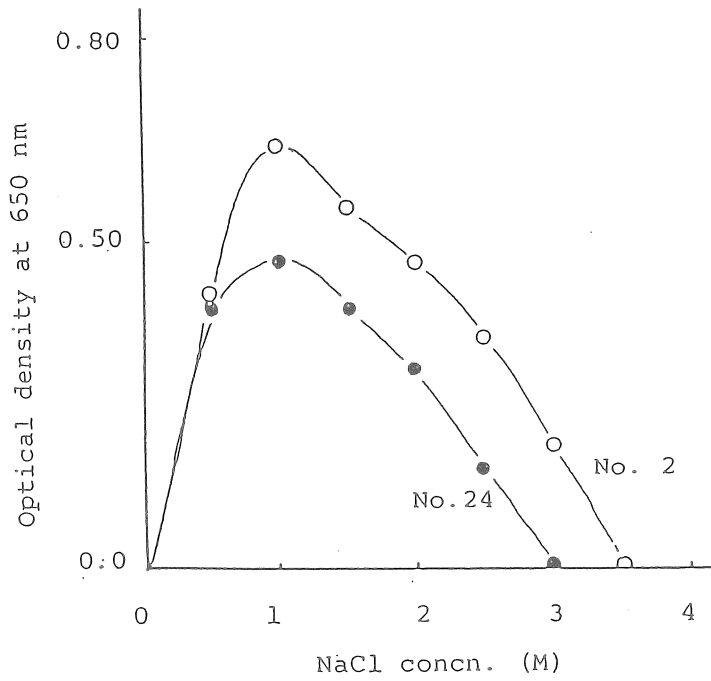


Fig. 3. Effect of NaCl concentrations on growth of isolated bacterial strains No. 2 and 24

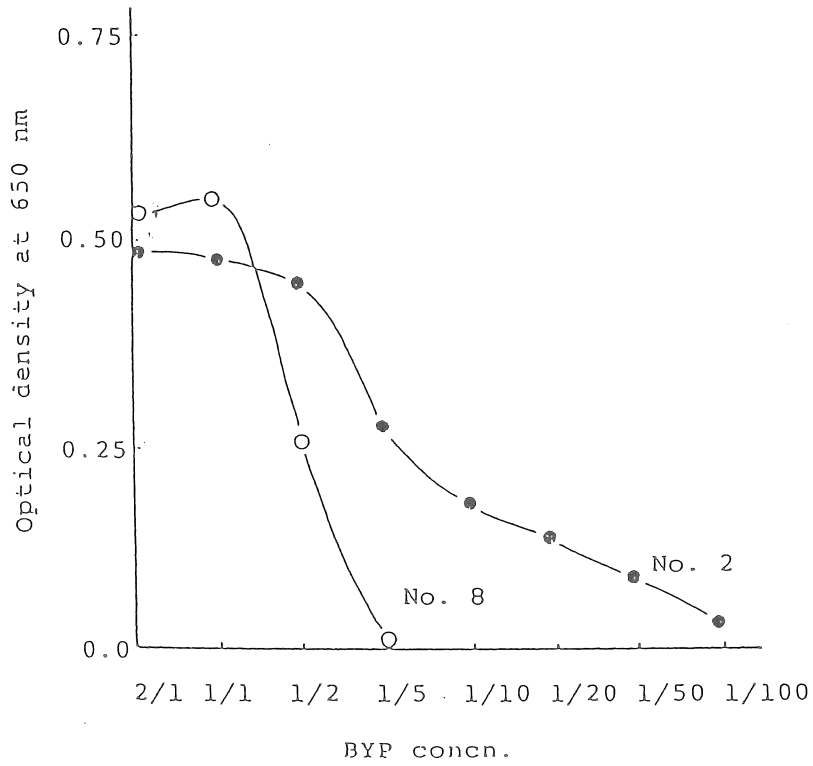


Fig. 4. Effect of nutritional concentrations on growth of isolated bacterial strains No. 2 and 8

Table 1. Growth of different temperature of isolated bacterial cells in 0.5 M NaCl environment

Strain No.	Temperature (° C)				
	15	25	30	37	42
2	0.0	0.340	0.260	0.260	0.245
10	0.0	0.560	0.310	0.280	0.150
8	0.0	0.149	0.110	0.040	0.0
28	0.0	0.141	0.129	0.020	0.0

Data were expressed as optical density at 650 nm in 0.5 M NaCl BYP medium

Table 2. Growth of different salts and sorbitol environment in isolated bacterial cells

Strain No.	0.5 M NaCl isotonic					
	0	NaCl	KCl	MgCl ₂	LiCl	Sorbitol
2	0.0	0.315	0.495	0.440	0.283	0.0
10	0.0	0.490	0.110	0.520	0.427	0.0
8	0.0	0.460	0.0	0.0	0.0	0.0
19	0.0	0.490	0.0	0.0	0.0	0.0

Data were expressed as optical density at 650 nm in BYP medium

文献

1. Baas-becking L.G.M., 1931. Historical notes on salt and salt manufacture. *Scientific Monthly*, 32, 434-446.
2. Harrison F.C., and M.E. Kennedy, 1922. XVI The discoloration of cured codfish, *Trans. Roy. Soc. Canada*, 16, 101-152.
3. Norton C.F., and W. Grant, 1988. Survival of halobacteria within fluid inclusion in salt crystals. *J. Gen. Microbiol.* 134, 1365-1373.
4. Morishita H. and M. Kitano, 1992. Salt resistance in bacteria isolated from imported salts. 7th Internat. Symp. Salt, Kyoto, Japan, Abst. pp 84.
5. Morishita H. and H. Takada, 1976. Sparing effect of lithium ion on the specific requirement for sodium ion for growth of Vibrio parahaemolyticus. *Can. J. Microbiol.*, 22, 1263-1268.
6. Payne S.I., S.N. Sehgal and N.G. Gibbons, 1960. Immersion refractometry of some halophilic bacteria, *Can. J. Microbiol.* 6, 9-15.
7. MacLeod R.A., 1965. The question of existence of specific marine bacteria, *Bact. Rev.*, 29, 9-23.
8. Morishita H., 1980 b. Specific requirement of Na⁺ for growth and macromolecular synthesis of slightly halophilic marine bacterium, *Vibrio parahaemolyticus*, In : H. Morishita and M. Masui, (Editors) *Saline Environment*, Jap. Conf. Halo. Microbiol., Press, pp 77-91.
9. Kushner D.J., 1985. The Halobacteriaceae, In : C.R. Woese and R.S. Wolfe (Editors) *The Bacteria*. Vol. 8. Academic Press Inc., London, pp 171.
10. Morishita H., 1978 a. Control by episome on salt resistance in bacteria, In : H. Noda (Editor) *Origin of Life*. Jap. Sci. Soc. Press, pp 431-439.

11. Morishita H., 1978 b. Genetic regulation on salt resistance in halophilic bacteria, *Energetics and Structure of Halophilic Microorganisms*, In : S.R.Caplan and M. Ginzburg (Editors) *Development of Halophilic Microorganisms*. Vol. 1, Elsevier/North-Holland Biomedical Press, pp 599-606.
12. Wood E.J.F., 1953. Heterotrophic bacteria in marine environments of Eastern Australia, *Aust. J. Mar. Freshwater Res.*, 4, 160-200.
13. Kuznetsov S.I., G.A.Dubinina and N.A.Lapteva, 1979. Biology of oligotrophic bacteria, *Ann. Rev. Microbiol.*, 33, 377-387.
14. Morita R.Y., 1975. Psychrophilic bacteria, *Bact. Rev.*, 39, 144-167.
15. Hochachka P.W. and G.N.Somero, 1973, *Strategies of Biochemical adaptation*, W.B.Saunders Co., Philadelphia, pp 1-103.
16. Morishita H., 1980 a. The growth of heterotrophic marine bacteria in artificial and natural sea water media. *Ann. Rept. Osaka City Inst. Pub. Health & Environ. Sci.*, 42, 8-14.
17. Presser C.L. and F.A.Brown, 1961. *Comparative Animal Physiology*, W.B. Saunders Co., Philadelphia, pp 1-6
18. Drapeau G.R. and R.A.MacLeod, 1936. Na^+ dependent active transport of α -aminoisobutyric acid into cells of marine pseudomonad, *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, 12, 111-115.
19. MacLeod R.A., C.A.Clarige, A.Hori and J.F.Murray, 1958. Observations and the function of sodium in the metabolism of marine bacteria, *J. Biol. Chem.*, 232, 829-834.

Study on bacteria isolated from solar salt rock

Hideki Morishita and Masaaki Kitano

Osaka City Institute of Public Health and Environmental
Sciences

Summary

In Japan, a lot of salts was imported from many foreign countries, main part of it from Mexico(50%) and Australia (40%). These salts consist of mainly solar salts. We found that the bacteria exist in these imported solar salts, and it was tried to isolate the bacteria from these salts.

The bacterial cells isolated required Na ion for the growth in the culture medium and could not grow in salt-free medium. They also indicated no growth in the hypertonic environment by the non-electrolytes such as sorbitol or sucrose. They exhibited a obligately halophilic character. Some bacterial cells had rather high salt resistance, it was possible to grow in the salt environment of wide range of NaCl concentrations from 0.5 M to 3.0 M, and reached the full growth in the concentrations of NaCl from 0.5 M to 2.0 M. However, the growth rate was maximum in 0.5 M NaCl concentration in some bacterial cells. Therefore, it was suggested that they were slightly halophilic bacteria or marine bacteria. Some bacterial cells also could grow in hypertonic environment with 0.5 M KCl, MgCl₂ and LiCl instead of NaCl. Optimal temperature for growth of isolated bacterial cells was at 25° C in BYP medium and some bacterial cells could grow even at 42° C.

Based on these results, it was recognized that a slightly halophilic bacteria which originated from marine bacteria had considerable diversity on salt resistance for the growth by the adaptation in solar salts rock.