

9454 魚介類における好塩性の無芽胞グラム陰性嫌気性桿菌の研究

助成研究者：小林とよ子（東海学園女子短期大学）

共同研究者：上野 一恵（岐阜医療技術短期大学）

生鮮魚貝類（アサリ； Tapes japonica ,ハマグリ； Meretrix lusoria ,カキ； Crassostrea gigas ,バイ； Babyronia japonica ,ヒラメ； Lefteye flounder ,シバエビ； Pandalus borealis ,アマエビ； Metapenaeus joyneri ,イワシ； Sardinops melanosticta)における好塩性の無芽胞グラム陰性嫌気性桿菌(以下、好塩性の嫌気性菌と省略)の分布を2%NaCl添加培地を用いて検討した。その結果、好塩性の嫌気性桿菌は増菌培養法では魚介類264検体中134検体(50.8%)に、直接塗抹法でも114検体中、53例(46.5%)に分離された。増菌培養法による好塩性の嫌気性菌の分離の内訳では、カキ30検体中27例(90.0%)と高く、ついでハマグリ60検体中36例(60.0%)、アサリ110検体中61例(55.5%)であった。しかし、イワシ28検体からは一例も分離されなかった。直接塗抹法の内訳では、カキ30検体中22例(73.3%)、ハマグリ44検体中20例(45.5%)、アサリ40検体中11例(27.5%)であった。

分離率の季節による検討では、アサリおよびハマグリの直接培養法において夏期よりも冬期のほうが有意($P < 0.001$ および $P < 0.029$)に優れた分離率を認めた。生鮮貝類における好塩性の嫌気菌の生菌数は $4.3 \times 10^3 \sim 18.8 \times 10^3$ CFU/g の範囲にあった。これらの好塩性の嫌気性菌は、NaCl濃度0.5%以下の好気的および嫌気的環境下にあるGAM寒天培地には全く発育せず、嫌気的環境下の2%NaCl添加培地からのみ分離された。

好塩性の無芽胞グラム陰性嫌気性桿菌のType strainである Haloanaerobium praevalens DSM 2228株を対照として、貝類から分離した39株の好塩性の嫌気性桿菌との各種生化学的性状を検討した。その結果、食塩要求性が著しく異なり、著者らの分離株のNaCl発育濃度域は1~5%で、至適発育の濃度は2%であるが、H. praevalens DSM 2228株のNaCl発育濃度域は2~30%で、至適発育は13%であった。著者らの分離菌株は23°Cで至適発育し、37°Cでは発育しないGroup Iと、23°Cより37°Cの方が旺盛な発育を認めたGroup IIに分類された。一方、H. praevalens DSM2228株は5~60°Cの幅広い発育温度域を持ち、至適温度の37°C培養での発育は著者らの分離菌株より遅い。GC%では H. praevalens DSM 2228株は29.0%で、著者らの分離株も26.9~33.2%と比較的近似を示した。しかし、発育温度、食塩要求度、代謝産物、胆汁培地での発育、炭水化物の発酵、乳酸からのプロピオン酸の産生、その他酵素反応などから著者らの分離株は H. praevalens と異なる新しい菌種と考えられる。

9454 魚介類における好塩性の無芽胞グラム陰性嫌気性桿菌の研究

助成研究者：小林とよ子 (東海学園女子短期大学)

共同研究者：上野 一恵 (岐阜医療技術短期大学)

1. 研究目的

魚介類から分離される好塩性の好気性菌の研究については、腸炎ビブリオ(*Vibrio parahaemolyticus*)を中心として、海水中の *Vibrio* 属の季節的変動¹⁾ やその病原性²⁾ に関して詳細に検討されている。しかし、好塩性の嫌気性菌に関する報告³⁾、⁴⁾ は少なく、極めて限られている。著者らは、すでに貝類における好塩性の嫌気性菌の分布⁵⁾ を検討した結果、アサリ、バイ貝から新種と思われる好塩性の無芽胞グラム陰性嫌気性桿菌(以下、好塩性の嫌気性菌と省略)が分離されることを報告した。

今回、研究対象を更に拡大して、各種の生鮮魚貝類における好塩性の嫌気性菌の分布について、培養法および培養温度および季節における分離率の比較等について検討し、さらにこれらの分離菌株の各種生化学的性状や病原性についても検討したのでその成績について報告する。

2. 研究方法

2.1 検査材料

生鮮魚貝類378検体(アサリ; *Tapes japonica* 150検体、ハマグリ; *Meretrix lusoria* 104検体、カキ; *Crassostrea gigas* 60検体、バイ; *Babyronia japonica* 10検体、ヒラメ; *Icteye flounder* 6検体、シバエビ; *Pandalus borealis* 10検体、アマエビ; *Metapenaeus joyneri* 10検体、イワシ; *Sardinops melanosticta* 28検体)を実験に供した。これらの材料はいずれも名古屋市内のフードセンターで1月から3月末までの冬季(294検体)と、7月から9月末の夏季(84検体)に、その鮮度を確認して購入し、直ちに実験に供した。

2.2 使用培地

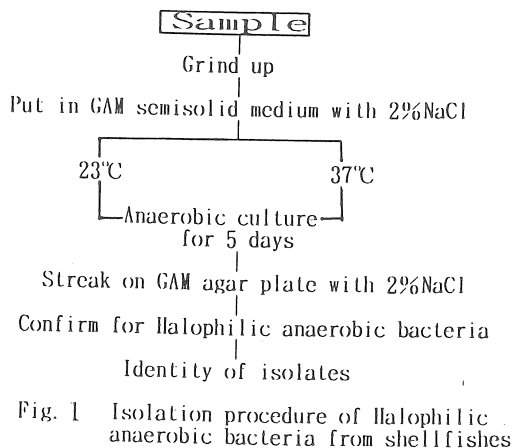
好塩性の嫌気性菌の分離には GAM 寒天平板培地(ニッスイ)を、増菌用培地には GAM 半流動培地(ニッスイ)を用いた。いずれの培地にもNaClを2%に添加し、嫌気環境下で培養した。嫌気培養には鉄系酸素吸収タイプ脱酸素剤であるアネロパック・ケンキ(三菱ガス化学)を用いた。

2. 3. 1 増菌培養法

検体は滅菌生理食塩水でよく洗浄後、魚は内臓を、貝類は中腸腺付近の約2 gを Fig. 1 の手順に従い、GAM半流動培地の2本宛に投入し、37°C・3日間嫌気培養した。

一部の菌株では23°Cと37°Cで培養し、分離菌の温度による影響を検討した。寒天平板上に発育した集落について、好塩性と嫌気性の有無を確認後、各種生化学的性状やガスクロマトグラフィーによる代謝産物の分析等により分離株を同定した。

本報における好塩性の嫌気性菌の決定には、嫌気性菌であることを確認した分離菌株で、さらに2% NaCl 加 GAM 寒天平板培地にのみ発育した無芽胞グラム陰性嫌気性桿菌を好塩性の嫌気性菌とした。



2. 3. 2 直接塗抹分離培養法による貝類から好塩性の嫌気性菌の分離

出来るだけ無菌的に殻を開けた貝の中心部から、約2白金耳量を GAM 寒天平板培地に塗抹し、直ちに37°Cで2日間嫌気培養し、発育した菌株について好塩性の嫌気性菌の有無を確認した。

2. 3. 3 魚介類における生菌数の測定

アサリ、ハマグリおよびカキのそれぞれについて各5検体を用いた。出来るだけ無菌的に採取した検体1g を秤量し、滅菌乳鉢中で細砕した。希釈液⁶⁾を用いて10倍乳剤とし、さらに10倍希釈法にて段階希釈した。夫々の希釈液 0.1ml を 2% NaCl 加 GAM 寒天培地2枚宛に接種して一様に塗抹し、37°Cで2日間嫌気培養した。生育した集落は、類似の集落毎にすべて釣菌した後、純培養菌について好塩性の嫌気性菌の確認を行い、菌数を算出した。これらの検体はすべて37°C培養で、冬季に実施した。

2. 4 分離株の発育に及ぼす培養温度の影響

一部の分離菌株については、37°Cと23°Cの異なる温度で嫌気培養し、培養温度が発育に及ぼす影響を検討した。

2. 5 分離菌株の NaCl 発育濃度域の検討

代表的な分離菌について、2% NaCl 加 GAM 寒天平板培地の24時間培養菌を0.3~8.3%の NaCl を添加した GAM 半流動高層培地(ニッスイ)に接種して、発育におよぼすNaCl

の濃度の影響を検討した。

23℃培養による発育の程度を4日間観察し、至適 NaCl 濃度を観察した。また、23℃至的発育株と37℃至的発育株の代表的な菌株を用いて、NaCl を0.3～5.3%に添加した1%ブドウ糖加 GAM broth に接種し、それぞれの温度で72時間まで培養し、経時的な発育の程度をOD 660 nm で測定し、分離菌株の発育の程度とNaClの至適濃度を検討した。

2.6 分離菌株の透過電子顕微鏡による細胞微細構造の観察

23℃至的発育菌株の3株について、2% NaCl 加 GAM broth (ニッスイ)で、23℃、一夜嫌気培養後、菌液を2.5%グルタルアルデヒド 0.1M リン酸緩衝液(pH7.2)で室温、3時間前固定した。次いで、Milling 緩衝液に溶解した1%4酸化オスミウムで4℃、一夜後固定した。固定した細菌細胞は2%の寒天に包埋し、1mm³ の細片に切り取った。寒天細片はアセトン系列で脱水し、プロピレンオキサイドで置換し、Epok 812に包埋した。超ミクロトーム(REJ-CHERT-JUNG)で超薄切片を作製し、これに酢酸ウラニールクエン酸鉛の二重染色を施して透過電子顕微鏡(LEM 2,000、明石製作所)を用い、加速電圧100 KV で観察、撮影した。鞭毛、線毛の有無は被検菌を0.5%リンタングステン酸ナトリウムでネガティブ染色して観察した。

2.7 分離菌株の各種生化学的性状

魚介類から分離した好塩性の嫌気性菌45株について、2% NaCl 加 GAM 糖不含半流動高層培地に各種の炭水化物を添加し、7日間、23℃および37℃培養後、pH の変化をガラス電極 pH メータを用いて測定した。また、API-ZYM を用いて19種の酵素反応をも測定した。

2.8 マウスに対する毒性試験

分離菌株を2% NaCl 加 GAM broth にて23℃または37℃、5日間増菌培養後、ミリポワフィルター(0.45 μm)で濾過した。その培養濾液 0.5 ml を ICR マウス (20g±1g)に腹腔内注射し、3日間マウスの状態の変化ならびに生死を観察した。

2.9 分離菌株の DNA の GC 含量の検討

被検菌株を2% NaCl 加 BHI broth で23℃嫌気培養した。菌体から DNA の抽出には、Marmurの方法⁷⁾ に従い、リゾチームで溶菌後、DNase 処理により純粋なDNA を抽出した。DNA の GC 含量の測定は藤本らの方法^{8) 9)} に従い、液体クロマトグラフィー (HPLC)を用いて行った。すなわち、菌体から抽出した DNA は吸光度260 nm で 1 mg/mlになるように蒸留水で希釈調整した。次いで、100℃、5分間加熱し、熱変性処理を行った。氷浴中で

急冷し、熱変性1本鎖 DNA 溶液とした。変性 DNA $10\mu\ell$ (DNA $10\mu\text{g}$ 含有) に等量のヌクレアーゼP₁⁹⁾ (ヤマサ醤油K.K-0.1mg ヌクレアーゼP₁/ml 酢酸緩衝液 pH 5.3-最終濃度 $2 \times 10^{-4}\text{M}$ ZnCl₂ を含有する 1/35M CH₃COONa に溶解) を加え、50°C、1時間反応させてヌクレオチドを完全に分解させた。得られた5'-ヌクレオチドと標準ヌクレオチド混合溶液(ヤマサ醤油)とを高速液体クロマトグラフィーを用いて分析した。

3 実験結果

3. 1 魚介類からの好塩性の嫌気性菌の分離

37°Cの嫌気培養を用いた増菌培養法により、魚介類から分離された好塩性の嫌気性菌の陽性例は264検体中134例(50.8%)であった。その内訳は、カキでは30検体中27例(90.0%)と最も多く分離され、ついでハマグリ60検体中36例(60%)、アサリ110検体中61例(55.5%)、バイ貝10検体中5例(50%)、ヒラメ6検体中3例(50%)、シバエビおよびアマエビでは各10検体中1例(10%)から分離された。しかし、イワシ28検体からは好塩性の嫌気性菌は分離されなかった。分離された好塩性の嫌気性菌はすべて無芽胞グラム陰性嫌気性桿菌であった。

3. 2 季節による分離率の変動

37°Cの嫌気培養による増菌培養法ならびに直接塗抹分離培養法での好塩性の嫌気性菌の分離率を比較した成績をTable 1 に示した。培養法の検討では、増菌培養法では90検体中66例(73.3%)から好塩性の嫌気性菌が分離された。一方、直接塗抹分離培養法では84検体中31例(36.9%)からのみ分離され、増菌培養法より明らかに劣っていた。その内訳はハマグリ44検体中20例(45.5%)、アサリ40検体中11例(27.5%)であった。ハマグリからの好塩性の嫌気性菌の分離は、夏期よりも冬期のほうが有意($P < 0.001$ および $P < 0.029$)に優れた分離率が認められたが、アサリにおいては分離率に季節的変動は認められなかった。

3. 3 生鮮貝類における好塩性の嫌気性菌の菌数

アサリ、ハマグリおよびカキにおける好塩性の嫌気性菌の生菌数は $4.3 \times 10^3 \sim 18.8 \times 10^3$ CFU/g の範囲であった。平板上に発育した分離菌株は、集落およびグラム染色による形態の相違から、2種類の好塩性の嫌気性菌の存在が示唆された。

3. 4 分離菌株の各種生化学的諸性状について

魚介類から分離された好塩性の嫌気性菌株45株の各種生化学的性状を、好塩性の無芽胞グラム陰性嫌気性桿菌の type strain である *Halobacterium praevalens* DSM 2228株と比較検討した成績を Table 2に示した。

3. 4. 1 発育温度域

分離菌株は発育温度の相違により23℃を至適発育温度とし、37℃では発育しない Group I と、23℃より37℃の方が旺盛な発育を認めた Group II の2つの菌群に分類された。一方、比較した type strain である *II. praevalens* DSM 2228 株は5～60℃の幅広い発育温度域を有し、37℃を至適発育温度とするが、23℃では極めて緩慢な発育を示した。

3. 4. 2 NaCl 発育濃度域

著者らが分離した Group I に属する菌株の NaCl 濃度と菌の発育との関係を Fig 1 に示した。NaCl を0.3%から8.3%に含有した1%ブドウ糖加 GAM broth を用いて23℃、24時間および72時間嫌気培養後、OD 660 nm で濁度を測定した結果、Group I の菌株の発育に及ぼす NaCl の至適濃度は1.3%から3.3%あり、0.3%以下の NaCl 濃度では、発育は全く認められなかった。また、4%以上の NaCl 濃度では菌の発育は大変低下した。各濃度の NaCl 添加培地に発育した24時間培養菌でのグラム染色所見においても、2% NaCl 添加培地に発育した菌株が最も均一な形態を示した。従って、分離菌株の各種生化学的性状検査等に使用する培地はすべて2% NaCl を添加して用いた。一方、*II. praevalens* DSM 2228 株の NaCl 発育濃度域は2～30%の NaCl 濃度で増殖し、至適 NaCl 濃度は13%であった。

3. 4. 3 集落と形態

2% NaCl 添加 GAM 寒天上の集落は Group I に属する菌株は、光沢のあるやや白っぽい集落を形成するが、Group II に属する菌株は、黄色を帯びた集落を形成することが認められた。特に Group II-a に属する菌株は乾燥した R 型に近い集落で、Group II-b に属する菌株はムコイド状の集落を形成するが、type strain である *II. praevalens* DSM 2228 株は光沢のある黄色を帯びた集落を形成した。菌体細胞の形態はいずれも先端のやや丸い、多形性のグラム陰性桿菌で、芽胞および運動性は認められなかった。

Group I に属する菌株の電顕像では、鞭毛や線毛は認められなかった。Fig 2 に示す如く、*Escherichia coli* や *II. praevalens* DSM 2228 株と比較した、著者らの分離菌株は外膜がやや薄く、内膜との間が狭いが、典型的なグラム陰性桿菌の Cell wall の微細構造の所見を示した。

3. 4. 4 代謝産物

分離菌株の代謝産物のガスクロマトグラフィーによる分析所見は、揮発性脂肪酸が主で、不揮発性脂肪酸の産生は殆ど認められなかった。Group I に属する菌株ではグルコースからの主要代謝産物は、酢酸(A)と酪酸(B)であった。Group II に属する菌株は、いずれもプロピオン酸(P)、酢酸、酪酸を産生することで Group I の菌株と異なっていた。type strain である *II. praevalens* DSM 2228 株の代謝産物のパターンは、Group II のそれに類似し、酪酸が主要産物で、少量の酢酸を産生した。スレオニンからプロピオン酸の産生は全菌株が陽性を示したが、乳酸からプロピオン酸の産生は Group II の菌株のみが陽性で、Group I および *II. praevalens* DSM 2228 株は陰性であった。

3. 4. 5 各種生化学的性状

分離菌株のゼラチン液化能はいずれの菌株とも弱陽性を示した。20%胆汁培地中での発育はGroup Iのみが陽性で、Group II と *II. pracvalens* DSM 2228 株は陰性であった。インドール産生能は、Group II-a と II-b が陽性で、他の菌株は陰性であった。硝酸塩の還元、レシチナーゼ産生、リパーゼ産生、ウレアーゼ産生、カタラーゼ産生、溶血性およびマウス致死性はいずれの菌株とも陰性であった。28種類の炭水化物の発酵試験の成績では、Group I-a、I-b とともにグルコース、フルクトース、マルトース、マンノース、リボースを分解した。*II. pracvalens* DSM 2228 株はグルコース、フルクトース、マンノースを分解したが、他の炭水化物はすべて陰性であった。一般に好塩性の嫌気性菌の炭水化物の分解能は、*II. pracvalens* DSM 2228株を含めて弱く、炭水化物発酵陽性株でも pH の低下は弱く pH 5.6~5.9に留まった。

3. 4. 6 API-ZYM による酵素反応の性状

分離菌株のAPI-ZYM を用いた19種の酵素反応の成績では、著者らの分離菌株は全株がホスホアミダーゼと酸性ホスファターゼを産生した。さらにGroup I-b と Group II-c はアルカリホスファターゼとエステラーゼリパーゼを産生し、Group I-a、Group I-bおよびGroup II-cはエステラーゼリパーゼを産生することが認められた。しかし、*II. pracvalens* DSM 2228株はすべての酵素反応が陰性であった。

3. 5 好塩性の嫌気性菌のDNAのGC 含量

分離菌株の DNA GC%は Table 2に示す如く、27~33%であった。23℃が至適温度で、37℃は発育できない Group I の菌株のうち、I-a の GC%は 30.5 ± 0.3 、I-b の GC %は26.9で2群に分類された。一方、37℃を至適発育温度とする Group II では、II-a の GC %は30.3、II-bの GC %は 27.0 ± 0.2 、II-c の GC %は33.2で3群に分類された。しかし、type strainである*II. pracvalens* DSM 2228株のDNA GC%は29.0であった。

4. 考 察

食品から好塩性の嫌気性菌の分離は、Baumgartner¹⁾ による塩漬けイワシからの分離報告が最初である。しかし、残念なことにその分離菌株は死滅して、その細菌名は現在承認されていない。今回、著者らは約50%の魚介類から好塩性の嫌気性菌を分離した。食品別では、増菌培養法では貝類から好塩性の嫌気性菌の分離は、貝類264検体中129例(48.9%)から分離されたのに対して、イワシおよびエビ類からの好塩性の嫌気性菌の陽性例は、54検体中4例(7.4%)のみであった。両者の検体数に開きがあるため、検体別に差があるか否かについては、さらに検体例数を増やして検討する必要があるが、分離された好塩性の

嫌気性菌の菌株は比較的生存力が弱く、死滅しやすいことが認められた。そのため、今回の検査材料はすべて市販品を利用したため、イワシおよびエビ類では生きている検体は少なく、多くが氷中に保存されていた。一方、貝類は100%生きている材料を利用した。このことが貝類からの好塩性の嫌気性菌が高く検出された一因とも思われた。

生鮮魚貝類における好塩性の嫌気性菌の生菌数は $4.3 \times 10^3 \sim 18.8 \times 10^3$ CFU/g の範囲であり、菌数は比較的少ないが直接塗抹分離培養法の成績からしても、これらの好塩性の嫌気性菌は魚介類の腸管内フローラを形成していることが示唆された。魚介類から好塩性の嫌気性菌の分離率は、増菌培養法および直接塗抹分離培養法のいずれにおいても夏期よりも冬期のほうが優れ、5%以下の危険率で有意差が認められた。夏季において分離率が低下した理由については不明である。しかし、夏季には検体中に雑菌が多いためか、2日間培養でも寒天平板上に多菌種がオーバーグロースする事が多く、好塩性の嫌気性菌の分離培養に大変困難をきたした。従って、好塩性の嫌気性菌など分離に長期間の培養を必要とする発育の遅い菌種については、今後さらに選択分離培地の考案を必要とし、さらなる検討を要する課題と思われた。

今回、著者らが対照株として用いた *Haloanaerobium praevalens* は Zeikus (1983)⁴⁾ により Great Salt Lake の湖底の沈殿物から高率に分離された好塩性の嫌気性菌である。本菌の形態はグラム陰性桿菌で、芽胞を形成せず非運動性である。これらの細胞形態は著者らの分離菌株と類似している。そこで、著者らは魚介類からの分離菌株の各種生化学的性状を、*H. praevalens* の type strain である *H. praevalens* DSM 2228株と比較検討した結果、食塩要求性が著しく相違していることが認められた。著者らの分離菌株の NaCl 発育濃度域は1~5%で、その至適濃度は2%である Slight halophiles¹⁰⁾ であるのに対して、*H. praevalens* DSM 2228株のNaCl 発育濃度域は2~30%と高く、その至適 NaCl 濃度は13%の Extreme halophile であることが明らかとなった。また、著者らの分離菌株の発育至適温度は23℃で、37℃では発育しないGroup I と23℃より37℃の温度で旺盛な発育を認めるGroup IIの2つの菌群に分類された。一方、*H. praevalens* DSM2228株は5~60℃の幅広い発育温度域を持ち、37℃が至適発育温度で23℃では極めて緩慢な発育を示した。両菌株の共通点としては顕像で、いずれの菌株も線毛や鞭毛を欠き、細胞壁の微細構造が同様にグラム陰性桿菌の特徴である内膜と外膜が認められた。また、分離菌株の DNA GC%は27~33%で、*H. praevalens* DSM2228株も29.0%と比較的近似を示した。しかし、28種類の炭水化物の分解能試験の成績の違い、培養液中の代謝産物のガスクロマトグラフィーによる分析結果より、乳酸からのプロピオン酸の産生、その他酵素反応などの違いから著者らの分離株は*H. praevalens*と異なる新しい菌種と考えられた。

分離菌株の病原性に関する検討については、培養液をそのままマウス腹腔内に注射し、その生死を観察した結果では、マウス致死性はいずれも陰性であった。しかし、これらの菌株の毒性についてはいまだ不明であり、著者らは今後さらに他の病原性因子について検

討し、また培養液の濃縮法や各種の培養細胞に対する細胞毒性試験などの検討を進めるべく予定している。

文 献

- 1) Kaneko, T. and R. R. Colwell: Ecology of *Vibrio parahaemolyticus* in Chesapeake bay. *J. Bacteriol.*, 113, 24-32, 1973.
- 2) 竹田美文、三輪谷俊夫、: ビブリオ感染症、医歯薬出版、1982.
- 3) Baumgartner, T. G. : The salt limits and thermal stability of a new species of anaerobic halophiles. *Food Research* 2; 321-329, 1937.
- 4) Zeikus, J. G., Hegge, P. W., Thompson, T. E., Phelps, T. J. and Langworthy, T. A. : Isolation and description of *Haloanaerobium praevalens* gen. nov. and sp. nov., an obligately anaerobic halophile common to Great salt lake sediments. *Current Microbiology*, 9, 225-234, 1983.
- 5) 小林とよ子、朝日良成、今朝洞忠孝、渡辺邦友、上野一恵 : 貝類から分離した好塩性の嫌気性グラム陰性無芽胞桿菌の研究, 嫌気性菌感染症研究、16、87-94、1986.
- 6) Ueno, K. et al. : Anaerobic bacteria, Role in disease, C. C. Thomas, U. S. A., 1972.
- 7) Marmur, J. : A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms, *J. Mol. Biol.*, 3, 208-218, 1961.
- 8) Fujimoto, M., Kuninaka, A., and Yoshino, H. : Microbiological identification of single cell proteins based on DNA GC contents, *Agr. Biol. Chem.*, 38, 155, 1974
- 9) 国中明:ヌクレアーゼP₁ 蛋白質 核酸 酵素、30、81-84、1985.
- 10) Ollivier B. et al : Anaerobic bacteria from hypersaline environments, *Microbiological Reviews*, 58, 27-38, 1994

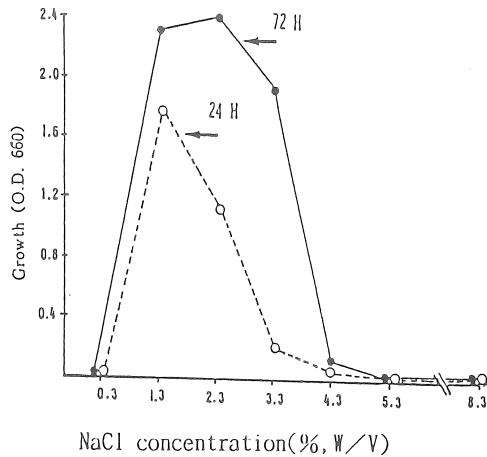
Table 1 Comparison of the isolation rate for Halophilic non-sporeforming anaerobic Gram negative rods from shellfishes (37°C incubated)

Shellfish	Isolation method	Summer		Winter		statistical analysis (χ^2 -test)
		No. of sample	No. of Halophilic anaerobes isolated	No. of sample	No. of Halophilic anaerobe isolated	
<i>Meretrix lusoria</i>	Enrichment	30	8	30	28	P<0.001
	Direct	14	3	30	17	P<0.029
<i>Tapes japonica</i>	Enrichment	30	13	30	17	N.S
	Direct	10	2	30	9	N.S.
<i>Crassostrea gigas</i>	Enrichment	—	—	30	27	—
	Direct	—	—	30	22	—
Total		84	26	180	120	P<0.037

Table 2 Enumeration of halophilic non-sporeforming anaerobic Gram negative rods in shellfishes (37 °C incubated)

Organism	<i>Tapes japonica</i>	<i>Meretrix lusoria</i>	<i>Crassostrea gigas</i>
GNR* 1	5.3×10^3	18.8×10^3	4.3×10^3
GNR 2	4.7×10^3	—	11.2×10^3

* GNR : Gram-Negative Rod



The organism was anaerobically cultured in the 1% glucose GAM broth with various concentrations of salt at 23°C

Fig. 2 Effect of NaCl concentration on the growth of isolated Halophilic anaerobic Gram negative rod (Group I)

Table 3 Characteristics of Halohhlic non-sporeforming anaerobic Gram negative rods isolated from shellfishes

Characteristic	Organism		Group I		Group II			H. praevalens* ¹ DSM 2228 circular, entire, convex, yellow
	a	b	a	b	c			
Colony morphology	circular, entire, convex, gray-white, smooth		circular, entire, convex, yellow					
Gram stain	Rod		Rod				Rod	
Cell morphology	Rod		Rod					
Spore	-		-					
Motile	-		-					
GC(%)	30.5 ±0.3	26.5	30.3	27.0 ±0.2	33.2		29.0	
Growth at	23 °C	+	+	+	+		5~60°C	
	37 °C	-	+	+	+			
NaCl(%) require for growth	1~4		1~4	2~5	1~5		2~30	
Metabolites from	Glucose Non-glucose Threonine→C ³ Lactate →C ³	A, B, (p)* ² A, B, p, iv, ib +	B, P, a B, a, p +	B, a, p B, a, p +	A, B, p A, B, p +		B, a B, a +	
Gelatin liquefaction	+	+	+	+	+		+	
Growth in 2%bile medium	+	+	-	-	-		-	
Indole production	-	-	+	+	-		-	
Nitrate reduction	-	-	-	-	-		-	
Lipase production	-	-	-	-	-		-	
Urease production	-	-	-	-	-		-	
Catalase production	-	-	-	-	-		-	
Hemolysin production	-	-	-	-	-		-	
Mice lethality	-	-	-	-	-		-	

*¹: Type strain of Haloanaerobium praevalens

*²: A, a:Acetic acid, P, p:Propionic acid, ib: Isobutyric acid, B, b:Butyric acid,
iv: Isovaleric acid,

Table 4 Characteristics of Halophilic non-sporeforming anaerobic Gram negative rods isolated from shell fishes

Organism Characteristic	Group I		Group II			H. praevallens DSM 2228
	a	b	a	b	c	
Cellobiose	-	-	-	-	w	-
Esculin pH	-	-	-	-	w	-
Esculin hydrolyzed	-	-	-	-	-	-
Fructose	+	+	+	w	-	+
Glucose	+	+	+	-	-	+
Inositol	-	w	+	+	-	-
Maltose	+	+	w	-	-	-
Mannose	w	+	-	-	-	+
Ribose	+	+	-	-	w	-
Adonitol	-	-	-	-	-	-
Amygdalin	-	-	-	-	-	-
Arabinose	-	-	-	-	-	-
Erythritol	-	-	-	-	-	-
Glycogen	-	-	-	-	-	-
Lactose	-	-	-	-	-	-
Mannitol	-	-	-	-	-	-
Melezitol	-	-	-	-	-	-
Melibiose	-	-	-	-	-	-
Raffinose	-	-	-	-	-	-
Rhamnose	-	-	-	-	-	-
Salicin	-	-	-	-	-	-
Sorbitol	-	-	-	-	-	-
Starch pH	-	-	-	-	-	-
Starch hydrolyzed	-	-	-	-	-	-
Sucrose	-	-	-	-	-	-
Trehalose	-	-	-	-	-	-
Xylose	-	-	-	-	-	-
Galactose	-	-	-	-	-	-
Dulcitol	-	-	-	-	-	-

Table 5 Characteristics of Halophilic non-sporeforming anaerobic Gram negative rods to API-ZYM

Enzyme	Group I		Group II			H. praevallens DSM 2228
	a	b	a	b	c	
Phosphatase alkaline	-	+	-	-	+	-
Esterase (C ₄)	-	-	-	-	-	-
Esterase lipase (C ₈)	+	+	-	-	+	-
Lipase (C ₁₄)	-	-	-	-	-	-
Leucine arylamidase	-	-	-	-	-	-
Valine arylamidase	-	-	-	-	-	-
Cystine arylamidase	-	-	-	-	-	-
Trypsin	-	-	-	-	-	-
Chymotrypsin	-	-	-	-	-	-
Phosphatase acid	+	+	+	+	+	-
Phosphoamidase	+	+	+	+	+	-
α-galactosidase	-	-	-	-	-	-
β-galactosidase	-	-	-	-	-	-
β-glucuronidase	-	-	-	-	-	-
α-glucosidase	-	-	-	-	-	-
β-glucosidase	-	-	-	-	-	-
N-acetyl-glucosaminidase	-	-	-	-	-	-
α-mannosidase	-	-	-	-	-	-
α-fucosidase	-	-	-	-	-	-

On halophilic non-sporeforming anaerobic Gram negative rods in sea fish and shellfishes

Toyoko Kobayashi and Kazue Ueno*

Tokai Gakuen Women's College and Gifu College of Medical Technology*

Summary

Halophilic non-sporeforming anaerobic Gram negative rods are commonly found sea fish and shellfishes bacteria that is associated with the sea fish and shellfishes. An assay to detect halophilic non-sporeforming anaerobic Gram negative rods in sea fish and shellfishes (Tapes japonica, Meretrix lusoria, Crassostrea gigas, Babynonia japonica, Ieteleye flounder, Pandalus borealis, Melapenacus joyneri, Sardinops melanosticta) that uses a enrichment culture with 2% NaCl and simple plate agar with 2% NaCl culture isolation procedure was studied. By the enrichment culture method, halophilic non-sporeforming anaerobic Gram negative rods were detected in 50.8% of the sea fish and shellfishes. Ninety percent in Crassostrea gigas, 60% in Meretrix lusoria, 55.5% in Tapes japonica and 0% in Sardinops melanosticta were detected. Detection rate of halophilic non-sporeforming anaerobic Gram negative rods from shellfishes in winter season gave higher than in summer season was observed ($P < 0.001$ and $P < 0.029$). Concentration of halophilic non-sporeforming anaerobic Gram negative rods in shellfishes detected $4.3 \times 10^3 \sim 18.8 \times 10^3$ c.f.u./g. in winter season.

Three new species of Halophilic anaerobic non-sporeforming Gram negative-rod, Haloanaerobium psychrophillum, Haloanaerobium longum and Haloanaerobium butyricum are described. We compared 45 strains of halophilic anaerobic non-sporeforming Gram negative rods isolated from the sea shellfish with DMS 2228 strain of Haloanaerobium praevalens (Type strain of genus Haloanaerobium). all of these strains were obligate anaerobic Gram negative, non-sporeforming bacteria which proliferated optimally at approximately 2 ~ 3% or $\geq 5\%$ salt. These organisms possessed single outer-wall membranous layer. DNA base composition was 26.9 ~ 33.2 mol % guanosine plus cytosine. Strain of these isolates have negligible DNA homology with DMS 2228 strain of H. praevalens described previously. Acetic acid, butyric acid and propionic acid were the major glucose fermentation end products formed. Glucose, fructose, inositol, ribose, maltose and mannose were fermented. A number of additional biochemical and physiological tests were performed. On the basis of those characteristics, isolates were identified as new Haloanaerobium species (H. psychrophillum, H. butyricum and H. longum).