

高度好塩菌の多様性解析による国内産市販塩の安全性に関する研究

峯岸 宏明¹、亀倉 正博²、越後 輝敦³、嶋根 康弘⁴、高井 研¹

¹ 海洋研究開発機構深海・地殻内生物圏研究分野, ² 好塩菌研究所, ³ 東洋大学バイオ・ナノエレクトロニクス研究センター, ⁴ 海洋研究開発機構海洋生命理工学研究開発センター

概要

研究の目的 近年、塩の販売自由化により国内外問わず様々な天日塩や岩塩を容易に入手することが可能になった。2009年には、国内に流通する食塩の種類は1,500種以上に至った。しかし、市販塩中の好塩性微生物の生態はまだまだ明らかにされていない。日本独自の発酵食品である味噌、醤油、漬物などはこの塩を多量に含んでおり、非好塩菌による腐敗を防ぐと共に、耐塩菌や好塩菌による限定分解により独特の風味を醸し出す。塩は日本独自の発酵産業にとって大変重要で欠かせないものであり、好塩性微生物、特に市販塩中に多く存在すると考えられる高度好塩菌は日本人にとって大変身近な微生物である。しかしながら、大腸菌、黄色ブドウ球菌、サルモネラ菌など病原性微生物の検査を行う一般的な食品微生物検査においては好塩菌有無の判別はされていない。特に高度好塩菌は塩濃度が20%以上の培地でなければ生息できないため、これまでの食品微生物検査の手法では検出できない。

そこで、本研究では高度好塩菌の分離に使用される30種類の培地を使用して、国内産市販塩205種類における高度好塩菌の多様性を明らかにすることを目的とした。

実験方法 好塩性菌用培地30種類を用いて国内で入手可能であり、産地、製造方法が明記してある市販塩205種についての高度好塩菌の生育の有無および分離株の相同性解析を行った。

研究結果・考察 各固体培地に塩サンプルを10 µl ずつ滴下し、37°Cで2週間培養した結果、205種類中175種類の塩サンプルから微生物のコロニーが確認された。また、培地30種類中26種類で微生物コロニーが確認できた。特に培地成分中にピルビン酸を含む培地で多くのコロニーの確認がされた。生産地、製造工程に関係なく国内産市販塩には他種多様な高度好塩菌が存在することが明らかとなった。

我々は海水を通じて、世界中に分布している高度好塩菌を知らず知らずの内に体内に摂取していると言える。現在のところ、高度好塩菌に関して病原性の報告はないものの地球環境が刻一刻と変わる中、我々人間に影響を及ぼす高度好塩菌が発見される可能性も否定できない。今後、食塩に関しては一般微生物検査に加え、高度好塩菌の検出を行うことが我々の食の安全に繋がると考えられる。そのためにより簡易的な検出方法を構築する必要があると同時に、高度好塩菌の性質をより詳細に調べる必要がある。

1. 研究目的

1997年に塩の専売制度が廃止されることにより塩の製造販売が自由化し、さらに2002年には塩の輸入制限が撤廃された。塩の販売自由化により国内外問わず様々な天日塩や岩塩を容易に入手することが可能になった。2009年には、国内に流通する食塩の種類は1,500種以上に至

った。しかし、近年まで塩の専売制度が施行されていた日本では、市販塩中の好塩性微生物の生態はまだまだ明らかにされていない。我々はこれまでに、659種類(内国産塩は205種類)の市販塩を収集し、数多くの高度好塩菌を分離し新属新種を提唱してきた。この結果より、市販塩中には多種多様な高度好塩菌が存在することが明らかとな

った^[1]。高度好塩菌はその大部分が Euryarchaeota 門 Halobacteria 綱 Halobacteriales 目 Halobacteriaceae 科に属する古細菌の総称で、最も高い NaCl 濃度に適応した微生物であり、飽和 NaCl 濃度下で生育可能なものも多い。2015 年 5 月現在、学名として正式に発表されている高度好塩菌は 48 属 194 種 (IJSEM 誌 in press 等を含めると 50 属 201 種) が正式に学名として認められている。これらは主に塩田、天日塩、岩塩、塩湖、塩蔵食品や市販塩から分離されている。

日本独自の発酵食品である味噌、醤油、漬物などはこの塩を多量に含んでおり、非好塩菌による腐敗を防ぐと共に、耐塩菌や好塩菌による限定分解により独特の風味を醸し出す。塩は日本独自の発酵産業にとって大変重要で欠かせないものであり、好塩性微生物、特に市販塩中に多く存在すると考えられる高度好塩菌は日本人にとって大変身近な微生物である。しかしながら、大腸菌、黄色ブドウ球菌、サルモネラ菌など病原性微生物の検査を行う一般的な食品微生物検査においては好塩菌有無の判別はされていない。特に高度好塩菌は塩濃度が 20% 以上の培

地でなければ生息できないため、これまでの食品微生物検査の手法では検出できない。そこで本研究では高度好塩菌の分離に使用される 30 種類の培地を使用して、国内産市販塩 205 種類における高度好塩菌の多様性を明らかにすることを目的とした。各種市販塩に存在する高度好塩菌の種類を明らかにすることは市販塩の安全性の明瞭性に寄与できると考えられる。また、これら培地の中で最も高度好塩菌を分離できる培地の確認および既知種における生育を確認することで、その培地を市販塩や塩蔵発酵食品の好塩性微生物検査指標の一つとすることを最終目的とした。

2. 研究方法

国内で入手可能であり、産地、製造方法が明記してある市販塩 205 種を本研究では用いた。Fig. 1 に生産地、Fig. 2 に県、主原料および製造工程別の市販塩数を示す。これら市販塩 0.3 g を 2.0 ml マイクロテストチューブに秤取り、それぞれに滅菌水 1.5 ml を加え静かに懸濁し、これを塩サンプルとした。

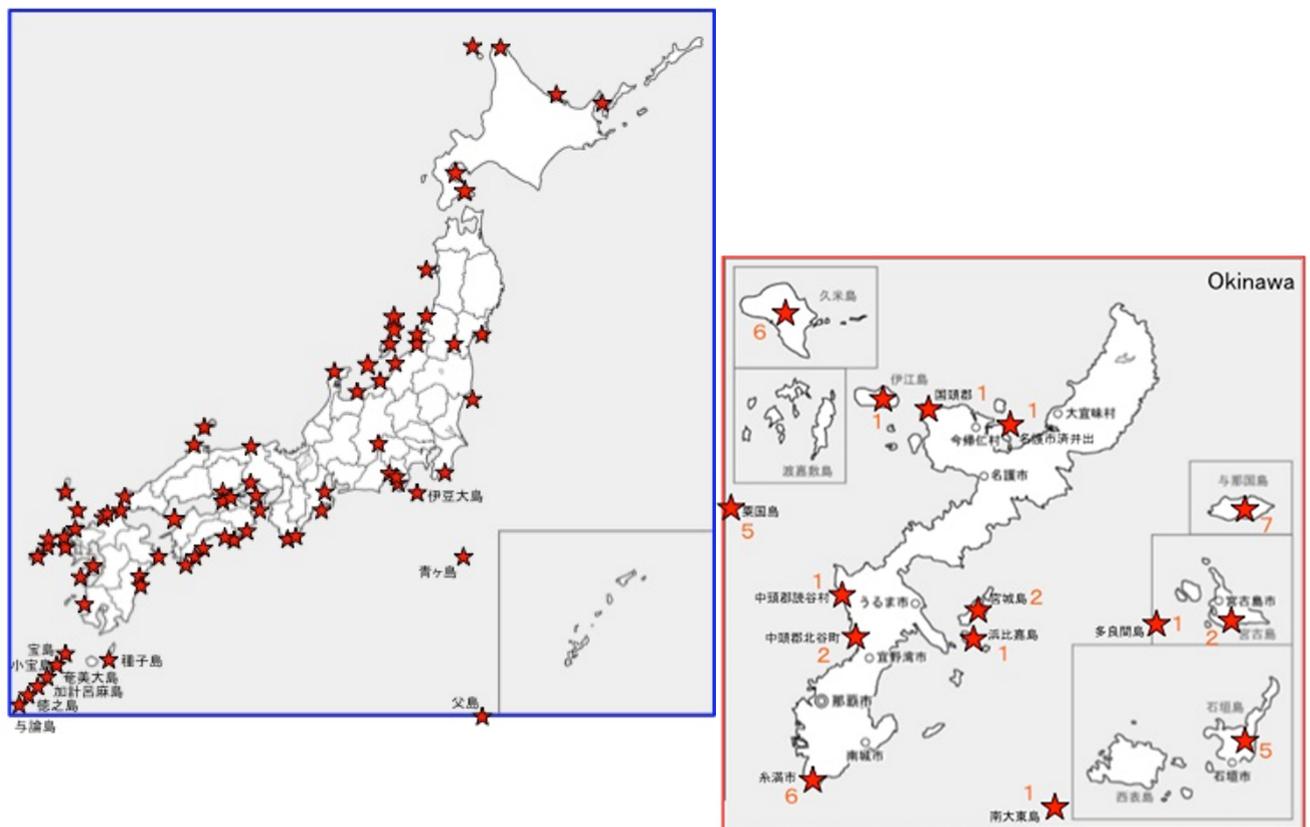
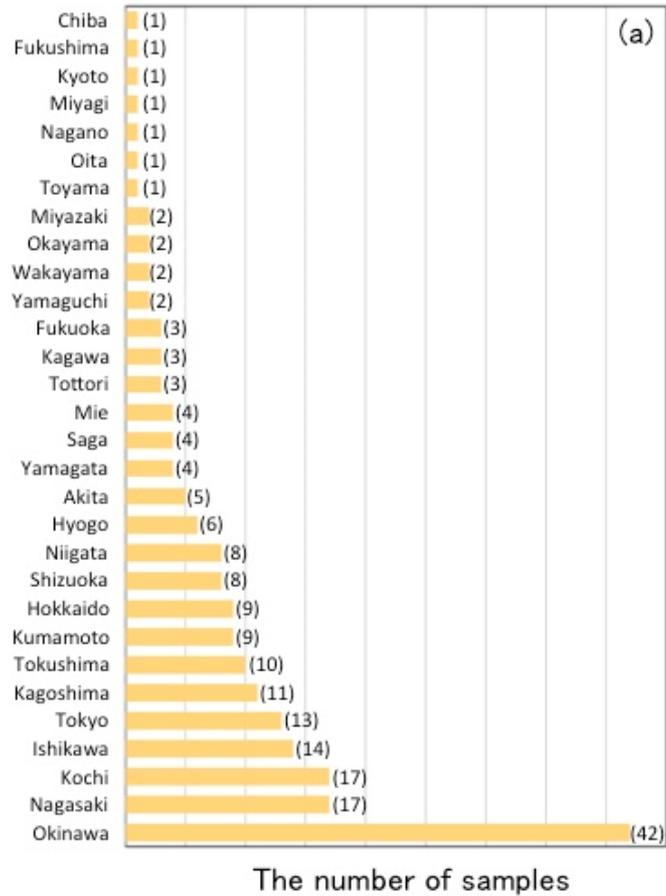


Fig. 1. Production area of commercial salt samples in Japan



(b)

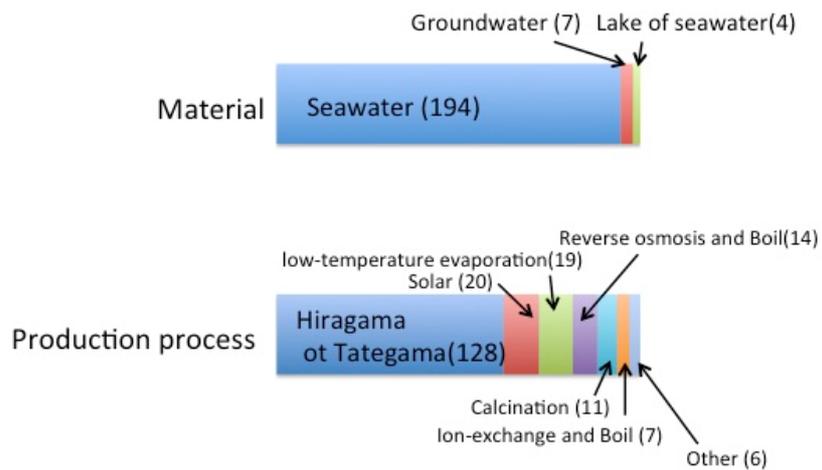


Fig. 2. The breakdown of commercial salt samples by prefecture, material and production process
The number of samples by (a) prefecture, (b) material and production process.

分離用の培地は理研 JCM により公表されている好塩性菌用培地 30 種類(JCM No. 59, 115, 166, 167, 168, 169, 170, 189, 212, 225, 294, 298, 306, 307, 348, 402, 442, 457, 546, 574, 620, 645, 733, 769, 776, 777, 787, 788, 905 および 914)を使用した (Table 1)。

これら固体培地に調製した塩サンプルを 10 μ l ずつ滴下し、37°C で 2 週間培養した。各培地における微生物生育の有無を目視で確認し、生育した菌株については画線培養法により単離した。また、既知種 121 種を用いて同様の実験を行い、各培地における生育を観察した。

市販塩より単離した菌株は 16S rRNA 遺伝子の塩基配列解析により近縁種を推定した。市販の DNA 抽出キットを用いて DNA を抽出し、高度好塩菌特異的なプライマー^[2,3]を用いて、PCR 法 (熱変性:95°C, 30 秒、アニーリング:

55°C, 1 分、伸長反応:72°C, 2 分、を 30 サイクル)により 16S rRNA 遺伝子塩基配列を増幅した。PCR 産物は酵素処理後、シーケンス反応を行いサンガー法によりその配列を決定した。得られた塩基配列は Blast による相同性検索を行った。

3. 研究結果

3. 1 スクリーニング結果

各固体培地に塩サンプルを 10 μ l ずつ滴下し、37°C で 2 週間培養した結果、205 種類中 175 種類の塩サンプルから微生物のコロニーが確認された。微生物コロニーが確認出来なかった 30 種類の塩サンプルは製造工程にイオン交換膜、逆浸透膜、焼成工程が含まれているものが多かった。産地による違いは見られなかった。

Table 1. Characteristics of JCM medium

JCM No.	pH	NaCl (g)	MgCl ₂ ·6H ₂ O (g)	MgSO ₄ ·7H ₂ O (g)	Casamino acids (g)	Yeast extract (g)	Carbon source...
777	4.5	200	2	-	4	2	L-Glutamic acid
776	5.0	200	20	-	4	2	L-Glutamic acid
645	6.5	180	20	-	5	0.1	
905	6.8	20	300	-	1	1	Sodium pyruvate, Soluble starch
189	7.0	125	160	-	-	1	Polypepton(Nihon Seiyaku), Soluble starch
225	7.0	125	160	-	1	1	Soluble starch
212	7.0	200	13	20	-	5	Glucose
294	7.0	270	-	20	-	1	Glucose
914	7.0-7.2	150	-	20	5	5	Sodium glutamate, Trisodium citrate
168	7.0-7.2	200	-	20	5	5	Sodium glutamate, Trisodium citrate
307	7.0-7.2	200	-	10	2	2	Sodium glutamate, Trisodium citrate
787	7.0-7.2	200	-	10	0.5	0.5	Sodium glutamate, Trisodium citrate
769	7.0-7.2	230	-	20	0.5	0.5	Glucose, Proteose peptone No.3, Sodium pyruvate, Trisodium citrate
298	7.15	200	20	-	-	-	Glycerol, Sodium pyruvate
115	7.4	150	-	20	7.5	10.0	Trisodium citrate
170	7.4	180	75	7.4	-	1	Sodium succinate, Vitamin solution
457	7.4	195	35	50	-	0.05	Sodium pyruvate
59	7.4	200	-	20	7.5	10.0	Trisodium citrate
402	7.4	200	20	-	5	5	
169	7.4	250	-	20	7.5	10	Trisodium citrate
348	7.4	250	-	20	-	5	Proteose peptone (Difco)
620	7.5	156	26	40.6	-	10	
442	7.5	184	23	26.8	-	1	Peptone (Oxoid), Sodium pyruvate
574	7.5	200	25	29.2	-	0.05	Peptone (Oxoid), Sodium pyruvate, Vitamin solution
733	7.4-7.8	119.5	16.6	-	-	1	Difco Marine Agar 2216
546	8	195	32.5	50.8	-	5	
166	8.5	250	-	2.5	15	-	Glutamic acid, Trisodium citrate
788	8.5-8.8	220	1	-	4	0.5	Glucose, Sodium glutamate, Trisodium citrate
167	9.0-9.5	200	-	0.24	5	5	Sodium glutamate
306	9.0-9.5	200	-	0.1	2	2	Sodium glutamate, Trisodium citrate

また、培地 30 種類中 26 種類で微生物コロニーが確認できた。pH 8.5 以上のアルカリ性培地である JCM No. 167 および 306 培地、好酸性好塩菌用培地 JCM No. 777 培地 (pH 4.5)、NaCl 濃度が 12% である JCM No. 733 培地ではコロニーが確認できなかった。培地成分中にピルビン酸を含む JCM No. 298、457 および 574 培地ではそれぞれ 161、149、158 種類の市販塩でコロニーの確認ができた。また、既知種 121 種について同様の実験を行った結果、塩サンプルの実験と同様に JCM No. 298、457 および 574 培地において、それぞれ 100、101 および 100 株のコロニーが確認できた (Table 2)。Table 3 に JCM No. 298、457 および 574 培地を示す。これら共通成分はピルビン酸、塩化ナトリウム、硫酸マグネシウム、塩化カリウム、アンモニウム塩、リン酸塩であった。

3. 2 分離株の近縁種推定

市販塩から計 1,096 株を分離し、384 株について 16S rRNA 遺伝子塩基配列に基づく近縁種の推定を行った。残りの株は現在純化中である。16S rRNA 遺伝子塩基配列の相同性検索の結果、最も多く取得できた菌株は *Halobacterium noricense* に近縁であり 212 株であった。次いで *Halorubrum* 属に近縁である菌株が 48 株、*Haloplanus* 属に近縁である菌株が 25 株、*Haloarcula* 属に近縁である菌株が 20 株取得できた。その他にも *Halarchaeum* 属、*Halobaculum* 属、*Halobellus* 属、*Halococcus* 属、*Halolamina* 属、*Halomicrobium* 属、*Halopenitus* 属、*Halosimplex* 属、*Halostagnicola* 属、*Haloterrigena* 属、*Natronomonas* 属、*Salarchaeum* 属の近縁種を取得できた。また、384 株中 81 株で新種、内 12 株で *Halopenitus* 属に近縁な新属の可能性が示唆された。

Table 2. Colony forming from commercial salts and the validly species in each medium.

JCM No.	pH	NaCl (%)	Mg ²⁺ (mM)	Salt sample (/205)	Validly species (/121)
777	4.5	20	9.8	0	1
776	5.0	20	98.0	9	3
645	6.5	18	98.0	36	76
905	6.8	2	1.47 (M)	15	35
189	7.0	12.5	787.0	145	98
225	7.0	12.5	787.0	147	97
212	7.0	20	145.1	141	96
294	7.0	27	81.1	82	38
914	7.0-7.2	15	81.1	38	95
168	7.0-7.2	20	81.1	116	95
307	7.0-7.2	20	40.6	110	94
787	7.0-7.2	20	40.6	123	99
769	7.0-7.2	23	81.1	107	90
298	7.15	20	98.0	161	100
115	7.4	15	81.1	42	86
170	7.4	18	398.9	142	99
457	7.4	19.5	375.0	149	101
59	7.4	20	98.0	64	92
402	7.4	20	81.1	114	96
169	7.4	25	98.0	79	76
348	7.4	25	98.0	96	78
620	7.5	15.6	292.6	84	94
442	7.5	18.4	221.9	143	100
574	7.5	20	241.4	158	100
733	7.4-7.8	12.0	81.6	0	11
546	8	19.5	366.0	59	93
166	8.5	25	10.1	1	74
788	8.5-8.8	22	4.9	100	92
167	9.0-9.5	20	1.0	0	62
306	9.0-9.5	20	0.4	0	42

Table 3. Media data of JCM No. 298, 457 and 574. Red character is the common component

<u>JCM No. 298 medium (HALOSIMPLEX MEDIUM)</u>	
Glycerol	2.5 g/L
Sodium pyruvate	2.5 g/L
K ₂ HPO ₄	0.5 g/L
(NH ₄) ₂ SO ₄	1.0 g/L
KCl	4.0 g/L
NaCl	200.0 g/L
MgSO ₄ ·7H ₂ O	20.0 g/L
Trace metal solution	2.0 ml/L
<hr/>	
pH 7.15	
<u>JCM No. 457 medium (ARTIFICIAL SEAWATER FOR HALOPHILES)</u>	
NaCl	195.0 g/L
MgCl ₂ ·6H ₂ O	35.0 g/L
MgSO ₄ ·7H ₂ O	50.0 g/L
KCl	5.0 g/L
NaHCO ₃	0.25 g/L
NaNO ₃	1.0 g/L
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.5 g/L
KH ₂ PO ₄	0.05 g/L
NH ₄ Cl	0.03 g/L
Yeast extract	0.05 g/L
Sodium pyruvate	1.0 g/L
<hr/>	
pH 7.4	
<u>JCM No. 574 medium (DB CHARACTERIZATION MEDIUM No.2)</u>	
NaCl	200.0 g/L
MgSO ₄ ·7H ₂ O	29.16 g/L
MgCl ₂ ·6H ₂ O	25.0 g/L
KCl	7.0 g/L
1M K ₂ HPO ₄ -KH ₂ PO ₄ buffer	2.0 ml/L
1 M NH ₄ Cl	5.0 ml/L
1 M CaCl ₂ solution	5.0 ml/L
1 M Sodium pyruvate solution	10.0 ml/L
Yeast extract (BD)	0.05 g/L
Peptone (Oxoid)	0.25 g/L
Trace element solution	1.0 ml/L
FeCl ₂ solution	1.0 ml/L
Vitamin solution	3.0 ml/L
<hr/>	
pH 7.5	

4. 考察

本研究では国内産市販塩 205 種類および JCM 培地 30 種類を用いて網羅的に高度好塩菌の分離解析を行った。国内産市販塩の製造で最も主流なのは平釜または立釜によるものであるが、産地にかかわらず多くの高度好塩菌が分離できた。しかしながら、同じ産地にもかかわらず分離できない平釜・立釜塩も存在した。高度好塩菌の多くは熱に弱いものが多いことから、熱処理時間の差が影響していると考えられる。一方で、焼成塩から分離された株も存在した。焼成工程は平釜や立釜よりも高温で処理するため、高度好塩菌には苛酷な環境である。これら分離株は焼成後のパッケージング作業等でコンタミした可能性が考えられる。イオン交換膜や逆浸透膜ではこれら微生物は膜状でトラップされると考えられるが、これら製造工程を含む塩からも高度好塩菌が確認できた。焼成塩同様、処理後の工程によりコンタミしたと考えられる。完全天日塩では全ての試料で高度好塩菌が確認できた。熱処理時間を伸ばすことにより高度好塩菌を滅菌することは可能であると考えられる。

培地成分中にピルビン酸を含む JCM No. 298、457 および 574 培地ではそれぞれ 161、149、158 種類の市販塩でコロニーの確認ができた。これら培地の共通成分としてピルビン酸、塩化ナトリウム、硫酸マグネシウム、塩化カリウム、アンモニウム塩、リン酸塩が含まれていた。高度好塩菌は他の原核生物同様ピルビン酸を効率よくエネルギー源として使用できると考えられる。一般的に高度好塩菌の培養には有機窒素源であるカザミノ酸が使われてきたが、これらの培地組成には含まれておらず、多くの高度好塩菌は無機窒素も効率よく使えると考えられた。

本研究においては、他種多様な高度好塩菌が分離できた、現在 *Halobacteriaceae* 科に属する高度好塩菌は 48 属 194 種が学名として正式に発表されているが、国内産市販塩からこのうち 16 属 (*Haloarcula* 属, *Halobacterium* 属, *Halarchaeum* 属, *Halobaculum* 属, *Halobellus* 属, *Halococcus* 属, *Halolamina* 属, *Halomicrobium* 属, *Halopenitus* 属, *Haloplanus* 属, *Halorubrum* 属, *Halosimplex* 属, *Halostagnicola* 属, *Haloterrigena* 属, *Natronomonas* 属, *Salarchaeum* 属) が分離できた。このように生産地、製造工程に関係なく国内産市販塩には他種

多様な高度好塩菌が存在することが明らかとなった。これまで国内から分離された高度好塩菌は *Haloarcula japonica* [4]、*Natrialba asiatica* [5]、*Salarchaeum japonicum* [6] の 3 種のみであった。最も分離数が多かった *Halobacterium noricense* はオーストラリアのアウスゼーの岩塩抗から分離された株である [7]。次いで分離数が多かった *Halorubrum* 属の分離報告は日本国内にはない。日本国内には岩塩抗が存在しないため、日本における塩の原料は長野県大鹿村の山塩といった例外もあるものの、そのほとんどは海水であり、我々は海水を通じて、世界中に分布している高度好塩菌を知らず知らずの内に体内に摂取していると言える。現在のところ、高度好塩菌に関して病原性の報告はないものの地球環境が刻一刻と変わる中、我々人間に影響を及ぼす高度好塩菌が発見される可能性も否定できない。今後、食塩に関しては一般微生物検査に加え、高度好塩菌の検出を行うことが我々の食の安全に繋がると考えられる。そのためにより簡易的な検出方法を構築する必要があると同時に、高度好塩菌の性質をより詳細に調べる必要がある。

5. 今後の課題

本研究により、国内産市販塩中に既知種の近縁種だけでなく数多くの新属新種が存在することが分かった。産地、製法に関わらず国内産市販塩は多種多様な高度好塩菌が存在している。高度好塩菌は一般的に病原性無しとされているが、新属新種も数多く分離されており、これらについての性質は未知である。

今回分離した新属新種と推定された株については生理生化学試験等を行い、性質を決定しているが、検査項目に関しても検討が必要である。また、今回は国内産の市販塩に着目して研究を行った、国内には輸入塩も数多く存在する。これらについても安全性のために高度好塩菌の検査を行うべきである。

一方、培地成分としてピルビン酸、塩化ナトリウム、硫酸マグネシウム、塩化カリウム、アンモニウム塩、リン酸塩が含まれている中性培地を使用することにより他種多様な高度好塩菌が検出可能であることが分かった。今後は好塩性微生物検査用に簡易的に他種多様な好塩菌を分離できるように最適化が必要である。

6. 謝 辞

本研究の遂行にあたり、微生物の単離作業、培地製作等に協力していただいた独立行政法人海洋研究開発機構の皆様、東洋大学理工学部応用化学科生命工学研究室の皆様に厚く御礼申し上げます。

7. 参考文献

- [1] Minegishi H, Mizuki T, Echigo A, Fukushima T, Kamekura M, Usami R. (2008) Acidophilic haloarchaeal strains are isolated from various solar salts. *Saline Systems*. 4:16.
- [2] Minegishi H, Kamekura M, Itoh T, Echigo A, Usami R, Hashimoto T. (2010) Further refinement of *Halobacteriaceae* phylogeny based on the full-length RNA polymerase subunit B' (*rpoB'*) gene. *Int J Syst Evol Microbiol*. 60:2398-2408.
- [3] Minegishi H, Kamekura M, Kitajima-Ihara T, Nakasone K, Echigo A, Shimane Y, Usami R, Itoh T, Ihara K. (2012) Gene orders in the upstream of 16S rRNA genes divide genera of the family *Halobacteriaceae* into two groups. *Int J Syst Evol Microbiol*. 62:188-195.
- [4] Takashina T, Hamamoto T, Otozai K, Grant WD and Horikoshi K. (1990) *Haloarcula japonica* sp. nov., a new triangular halophilic archaeobacterium. *System. Appl. Microbiol.* 13:177-181
- [5] Kamekura M, Dyall-Smith ML, Upasani V, Ventosa A, Kates M. (1997) Diversity of alkaliphilic halobacteria: proposals for transfer of *Natronobacterium vacuolatum*, *Natronobacterium magadii*, and *Natronobacterium pharaonis* to *Halorubrum*, *Natrialba*, and *Natronomonas* gen. nov., respectively, as *Halorubrum vacuolatum* comb. nov., *Natrialba magadii* comb. nov., and *Natronomonas pharaonis* comb. nov., respectively. *Int J Syst Bacteriol*. 47:853-857.
- [6] Shimane Y, Hatada Y, Minegishi H, Echigo A, Nagaoka S, Miyazaki M, Ohta Y, Maruyama T, Usami R, Grant WD, Horikoshi K. (2011) *Salarchaeum japonicum* gen. nov., sp. nov., an aerobic, extremely halophilic member of the Archaea isolated from commercial salt. *Int J Syst Evol Microbiol*. 61:2266-2270.
- [7] Gruber C, Legat A, Pfaffenhuemer M, Radax C, Weidler G, Busse HJ, Stan-Lotter H. (2004) *Halobacterium noricense* sp. nov., an archaeal isolate from a bore core of an alpine Permian salt deposit, classification of *Halobacterium* sp. NRC-1 as a strain of *H. salinarum* and emended description of *H. salinarum*. *Extremophiles*. 8:431-439.

Verification of the Safety from the Diversity of *Haloarchaea* in Commercial Salts Made in Japan

Hiroaki Minegishi¹, Masahiro Kamekura², Akinobu Echigo³, Yasuhiro Shimane⁴, Ken Takai¹

¹Department of Subsurface Geobiological Analysis and Research, Japan Agency for Marine-Earth Science & Technology (JAMSTEC), ²Halophiles Research Institute, ³Bio-Nano Electronics Research Center, Toyo University,

⁴Research and Development Center for Marine Biosciences, JAMSTEC

Summary

In Japan, we have become possible to easily obtain various solar salt and rock salt since 2002. In 2009, the kind of salt that circulates in Japan has been more than 1,500. We have isolated a lot of halophilic microorganisms from commercial salt to date. However, the ecology of halophilic microorganisms in commercial salt has not been still clear. Salt is an ingredient extensively used in food preparations. Miso, soy sauce and pickles as unique Japanese fermented food contain this salt in a large amount. It gives a specific flavor to the product. Most importantly, salt acts as a food preservative by reducing water activity. In this study, we isolated many halophiles capable of growth in 30 kinds of JCM medium from 205 commercially available salts in Japan.

Commercial salt samples (0.3 g each) were dissolved in 1.5 ml sterile water, and one drop each was spread on agar plates of each JCM medium. After incubation for 2 weeks at 37 °C, colonies were picked up and transferred to new plates. The 16S rRNA gene was amplified by PCR with haloarchaea specific primer sets.

An extremely halophilic microorganisms were observed, mostly on JCM No. 298, 457 and 574 medium. These media have pyruvate as carbon source. Additionally, these media have included sodium chloride, magnesium sulfate, potassium chloride, ammonium salt and phosphate as a common component. We separated 1096 strains from commercial salts. And we analyzed 16S rRNA gene sequences about 384 strains of them.

The diversity of viable archaea from the family *Halobacteriaceae* in commercial salts in Japan was important with 16 genera identified out of the 48 genera validly published to date. The most represented genus was the *Halobacterium*. The second most important genera were *Haloplanus* and *Haloarcula*. In contrast, many genera were identified in various salts: *Halarchaeum*, *Halobaculum*, *Halobellus*, *Halococcus*, *Halolamina*, *Halomicrobium*, *Halopenitus*, *Halorubrum*, *Halosimplex*, *Halostagnicola*, *Haloterrigena*, *Natronomonas* and *Salarchaeum*. On the other hand, new species or genera have been included 81 strains.