

天日塩、岩塩中に潜む好塩性微生物の安全性に関する研究と それらの安価簡易検出法の開発

峯岸 宏明^{1,2}, 嶋根 康弘², 高井 研²

¹東洋大学理工学部応用化学科, ²国立研究開発海洋研究開発機構

概要 日本では、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などを容易に入手することが可能になった。現在では、料理や、その用途によって様々な種類の塩が使われており、塩自体を直接口にすることも多い。つまりは、塩と共に高度好塩菌を摂取している可能性が高い。食品中微生物については、食品衛生法の成分規格基準や衛生規範など国の基準があるが、すべての食品や有害微生物に対応しておらず、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できない。2015年、鹿児島・京都大学のグループは、物忘れや鬱など認知症の症状がある患者の脳に「高度好塩菌」が感染し、脳脊髄炎が起きていたと報告した。この報告は古細菌による感染症の初の報告となった。したがって、塩中にいる好塩性微生物の検出は食の安全面からも重要である。

平成26年度ソルト・サイエンス研究財団の一般公募研究助成採択課題「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」において、産地に関わらず、国内産市販塩には多種多様な高度好塩菌が存在しており、海外で発見された高度好塩菌の近縁種も国産の市販塩から分離できることを明らかとした。また、多くの高度好塩菌はピルビン酸、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、リン酸塩が含まれている中性培地で分離可能であることを示し、既知の培地ではJCM No.298培地が最も汎用性が高いことを示した。本研究ではJCM No.298培地を比較対照として実験を行った。

好塩性古細菌の培養に用いられる培地は高価になることが多いため、本研究ではコストを抑えつつ多種多様な好塩性古細菌が生育できる開発を目指した。試薬価格の調査を行った結果、好塩性古細菌の培地が高価になる理由はBacto AgarとNaClであった。好塩性古細菌の培養において寒天固体培地は必要不可欠であるが、寒天を減らし過ぎると培地の硬度が弱くなり操作に影響が出るだけでなく培地が乾燥しやすくなるためAgarMateを加えることで硬度の補填と培地の乾燥化を防ぐことができた。

次いで、培地中で最も使用量が多い、NaClについて検討を行った。和光純薬の塩化ナトリウムより日本食塩製造株式会社の精製塩の方が好塩性古細菌の増殖には有効であることが分かった。塩化ナトリウムの純度が生育に影響していると考えている。また、価格については、好塩性古細菌の培地で一般的に使用される濃度である20%で算出すると、和光純薬の塩化ナトリウムでは1,076円、日本食塩製造株式会社の塩化ナトリウムでは24円となる。よって、より安価な塩化ナトリウムに変更することで価格を抑えることができた。

汎用性の確認に使用した培地はJCM No.298培地、新規に構築したHMN-1~HMN-8培地の9種類の培地であり、HMN-6培地は市販塩サンプル810サンプル中426サンプルからのコロニーを確認することができ、最も汎用性が高かった。また、比較対照のJCM No.298培地より406円価格を下げることができた。

1. 研究目的

高度好塩菌は、その大部分が *Halobacteria* 綱に属する古細菌で、主に塩田、天日塩、岩塩、塩湖、塩蔵食品や市販塩なども高塩濃度環境中から分離されている。これらは、2.5 M 以上の高塩環境で良く増殖するが、海水程度から飽和 NaCl 濃度までの様々な塩濃度下でも増殖可能である。

日本では、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などを容易に入手することが可能になった。2016 年には、国内に流通する塩の種類は 4,000 種類以上に至っている。現在では、料理や、その用途によって様々な種類の塩が使われられており、塩自体を直接口にすることも多い。つまりは、塩と共に高度好塩菌を摂取している可能性が高い。食品中の微生物については、食品衛生法の成分規格基準や衛生規範など国の基準があるが、すべての食品や有害微生物に対応しておらず、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できない。

2015 年、鹿児島・京都大学のグループは、物忘れや鬱など認知症の症状がある患者の脳に「高度好塩菌」が感染し、脳脊髄炎が起きていたと報告した。患者らの脳組織を一部採取し、電子顕微鏡を用いて検査したところ不規則な形状をした大小様々な細胞が発見された。発見した細胞に対してメタゲノム解析を行った結果、好塩性好塩菌の 1 種である *Halorubrum lacusprofundi* と同一性が高い配列が多く検出された。新規に開発された抗菌薬により症状の回復が認められ、この報告は古細菌による感染症の初の報告となった。

近年まで塩の専売制度が施行されていた日本では、市販塩中の高度好塩菌の生態はほとんど明らかにされていない。我々はこれまでに、国内で入手可能な 810 種類の市販塩を収集し、高度好塩菌の分離を行い、生理生化学試験・化学分類試験・抗生物質感受性試験などの分類同定を行ってきた。また、平成 26 年度ソルト・サイエンス研究財団の一般助成採択課題「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」において、産地に関わらず国内産市販塩には多種多様な高度好塩菌が存在しており、海外で発見された高度好塩菌の近縁種も国産の市販塩から分離できることを明らかとした。また、

多くの高度好塩菌はピルビン酸、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、リン酸塩が含まれている中性培地で分離可能であることを示した⁽¹⁾。

そこで本研究では、平成 26 年の助成研究で得られた成果を基に、安価で簡易な高度好塩菌の検出系の開発を目指す。また、これまでの抗生物質感受性試験などの分類同定試験の結果から、市販塩中の高度好塩菌に対する有効な殺菌手段を見出すことを目的とした。

2. 研究方法

2.1 市販塩サンプルの調製と培地組成

本研究では、好塩性古細菌の安価簡易検出法の開発として、新規の培地構築を行い、市販塩を使用してその有効性を確認した。市販塩は、天日塩、岩塩、湖塩など日本国内で入手可能な 810 種類を使用した。各サンプルを 1.8 mL スクリューキャップ付きマイクロチューブに約 0.5 g ずつ秤取り、それぞれに 1.5 mL のサンプルバッファー (0.5% K_2SO_4 , 0.4% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 3.0% NaCl) を加え静かに攪拌し、これを塩サンプルとした。平成 26 年度ソルト・サイエンス研究財団の一般公募助成研究採択課題「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」において、205 種類の国内産市販塩および 121 種類の好塩性古細菌既知種を用いた解析により、理化学研究所微生物材料開発室 (Japan Collection of Microorganisms, JCM) が好塩性古細菌の培養用に推奨している培地の内、JCM No.298, 457 および 574 培地で多くのコロニーの確認ができていている (Table 1)。これらの培地は、好塩性古細菌の培地によく使用される有機窒素源である Casamino acids は使用されておらず、その成分中にピルビン酸を含むのが特徴的である。また近年、ピルビン酸は好塩性古細菌の有効な炭素源であることが示唆されている⁽²⁾。

これらの中でも JCM No.298 培地が最も多くコロニーの確認ができたため、本研究では JCM No.298 培地を新規に構築した培地の比較対照として用いることにした。pH の影響による生育の差が出ないように、pH は 7.0 に変更して行った。Table 2 に JCM No.298 培地の基本組成を示す。

新規培地の構築は、JCM No.298, 457 および 574 培地の共通成分であるピルビン酸、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、リン酸塩および、

Table 1. Colony forming from commercial salts and the validly species in each JCM 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 2. Component of JCM No. 298 medium

Glycerol	2.5 g
Sodium pyruvate	2.5 g
K ₂ HPO ₄	0.5 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	1.0 g
KCl	4.0 g
NaCl	200.0 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	20.0 g
*Trace metal solution	2.0 ml

Add components to distilled water and bring volume to 1.0 L. Adjust pH to 7.15.

*Trace metal solution

ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.1 g
MnCl ₂ ·4H ₂ O	0.03 g
H ₃ BO ₃	0.3 g
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.2 g
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.01 g
NiCl ₂ ·6H ₂ O	0.02 g
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.03 g
RO membrane water	2.0 ml/L

Adjust pH to 3.0 with HCl.

近年報告された好塩性古細菌のグリセロール代謝機構⁽³⁾を考慮し、これらを基本成分として、酵母エキスやペプトンなどの複合基質、糖などの単一炭素源を加え新規培地の構築を行った。新規培地は pH 7.0 に統一し、オートクレーブ滅菌は 121°C, 20 min の条件で行った。寒天固体培地を作製する際には、Bacto Agar を加えた。また、安価培地の作製にあたり、好塩性古細菌の培地に多用される試薬の価格調査を行い、比較対照である JCM No.298 培地の価格 (1L 当たり 2,648 円【定価・税込】) を超えないように、組成添加量などを調製した。

3. 研究結果

3.1 試薬の価格調査

JCM で好塩性古細菌の培養用に推奨されている約 30 種類の培地に使用されている試薬の定価税抜きの価格調査 (富士フイルム和光純薬) を行った (Table 3)。Trace metal solution に使用される金属塩は価格にほとんど影響しないので、今回は考慮に入れなかった。その結果、培地中の高コスト化の要因は NaCl と寒天固体培地の作製時に使用される Bacto agar であった。そのため、新規に開発した培地で最も多くの市販塩サンプルでコロニーが確認できた培地に対して、NaCl のメーカー、Bacto agar の量を検討し低コスト化を目指した。

Table 3. Price of reagent used for culture medium for haloarchaea

Reagents	Sales volume (g)	Selling price (yen)	Gram unit price
NaCl	1,000	4,200	4.20
Tris-HCl	250	19,000	76.0
MgSO ₄ ·7H ₂ O	500	1,100	2.20
MgCl ₂ ·6H ₂ O	500	1,600	3.20
K ₂ SO ₄	500	1,900	3.80
KCl	500	1,350	2.70
K ₂ HPO ₄	500	4,000	8.00
KH ₂ PO ₄	500	3,500	7.00
KHCO ₃	500	2,600	5.20
(NH ₄) ₂ SO ₄	500	1,300	2.60
NH ₄ Cl	500	1,900	3.80
Citric acid monohydrate	500	1,900	3.80
Citric acid	500	1,650	3.30
Sodium pyruvate	500	18,500	37.0
Glycerol	500	1,730	3.46
D(+)-Glucose	500	1,850	3.70
Bacto Agar (BD)	454	31,900	70.3
Casamino Acids (BD)	500	26,700	53.4
Yeast Extract (BD)	500	18,200	36.4
Bacto Tryptone (BD)	500	13,400	26.8
Bacto Neopeptone (BD)	500	37,700	75.4
Bacto Proteose Peptone No.3 (BD)	500	25,700	51.4
Bacteriological Peptone (Oxoid)	500	16,264	32.5

3. 2 新規好塩性古細菌用培地の開発

本研究では、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、リン酸塩およびグリセロールを基本培地成分として下記の 8 種類の培地を構築した。これら 8 種類の培地および JCM No.298 培地を使用して 810 種類の塩サンプルを 10 µl ずつ培地 1 枚当たり 16 点スポットし、コロニーの形成の有無を確認した (Table 4)。その結果、HMN-6 培地 (Table 5) が最も多くのコロニーが確認できた。

(1) HMN-1 培地 (1 L: 2,883 円)

Yeast Extract (BD), Bacteriological Peptone (Oxoid), クエン酸回路を起動させるために Citric acid monohydrate を加えた培地である。

(2) HMN-2 培地 (1 L: 2,271 円)

基本培地に Bacto Tryptone (BD) を加えた培地である。

(3) HMN-3 培地 (1 L: 2,145 円)

基本培地に Yeast Extract (BD) を加えた培地である。

(4) HMN-4 培地 (1 L: 2,135 円)

基本培地に Yeast Extract (BD), Bacto Tryptone (BD) を加えた培地である。

(5) HMN-5 培地 (1 L: 2,122 円)

基本培地に Citric acid, D (+)-Glucose を加えた培地である。

(6) HMN-6 培地 (1 L: 2,242 円)

HMN-5 より Sodium pyruvate, Glycerol, D (+)-Glucose の添加量を増やした培地である。

(7) HMN-7 培地 (1 L: 2,072 円)

基本培地に Bacto Tryptone (BD) と KHCO₃ を加えた培地である。

(8) HMN-8 培地 (1 L: 1,997 円)

HMN-2 培地の炭素源および NaCl を減らした培地である。

Table 4. Colony forming from commercial salts using by New media and JCM No. 298 medium

Medium	Results [/810]
JCM 298	265
HMN-1	276
HMN-2	362
HMN-3	295
HMN-4	292
HMN-5	251
HMN-6	426
HMN-7	378
HMN-8	345

Table 5. Component of HMN-6 medium

NaCl	200.0	g/L
MgSO ₄ ·7H ₂ O	14.0	g/L
K ₂ SO ₄	2.0	g/L
Sodium pyruvate	1.4	g/L
Glycerol	1.4	g/L
Citric acid	1.0	g/L
D(+)-Glucose	1.0	g/L
K ₂ HPO ₄	0.6	g/L
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.6	g/L
Trace metal solution	2.0	mL/L

Add components to distilled water and bring volume to 1.0 L. Adjust pH to 7.0

3.3 HMN-6 培地における寒天濃度の検討

培地中の高コスト化の要因は NaCl と寒天固体培地の作製時に使用される Bacto agar であった。Bacto agar の量を検討し低コスト化を目指した。しかし、Bacto Agar の量を減らすだけでは培地が軟化してしまうため、培地の軟化を抑えることのできる AgarMate を添加物として使用した。AgarMate とは培地の硬度を上昇、培地の透明度上昇や培地が乾燥しにくくなり長期保存ができるといった利点がある。Fig. 1 に示した硬度計を用いて調製した各培地の硬度を測定し、Bacto Agar と AgarMate の添加量の検討実験を行った。一般的に、好塩性古細菌の寒天固体培地中には 20.0 g/L の Bacto agar が使用されている。しかしながら、培地の寒天濃度に関して検討された報告はなく、本研究では寒天量による硬度に注目して実験を行った。本研究室によるこれまでの研究により、本課題では Bacto Agar 濃度 1.0~1.7% の間での検討した。

AgarMate の検討は培地 100 mL 当たりに加える量を 0 g, 0.05 g, 0.10 g, 0.15 g および 0.20 g の 4 条件として行い、Bacto agar は 1.5% にして行った (Fig. 2)。その結果、0.10 g 以上の添加で硬度が上昇し、それ以上添加しても大きな硬度変化が見られなかったため AgarMate の添加量は 0.10 g とした。

次いで、培地 100 mL 当たり AgarMate 添加量を 0.10 g とし Bacto agar の濃度を 1.0~1.7% の間での検討した (Fig. 3)。Bacto agar は添加量が増加するほど、硬度が高くなるが 1.4 % 以上ではその傾きは緩やかとなり 1.5% 以上の濃度では、十分な硬度を確保でき、寒天培地上における微生物コロニーの状態もほとんど変化がみられないことから、本培地における最適条件はコストを考慮し、1.5% とした。

3.4 培地に使用する塩化ナトリウムの影響について

塩化ナトリウムは好塩性古細菌の培地で最も量を必要とする試薬である。一般的に使用される好塩性古細菌用培地の NaCl 濃度は 20% であり、その価格は 840 円となる。しかしながら、試薬としての NaCl 以外にも食品用や工業用の NaCl も国内で販売されており、これらの違いによる生菌の違いは検討されていない。そこで、Table 6 に示す 4 種類の NaCl を使用し、生菌数の違いを確認した。

その結果、精製度が最も低い塩事業センター食塩を使用した培地の生菌数が最も少なく、和光純薬、特級塩うず塩、日本食塩精製塩ではほとんど違いが見られなかつ

たが、日本食塩製造株式会社の生菌数がやや多かった (Fig. 4)。さらに、価格も和光純薬の塩化ナトリウムはグラム価格 5.40 [円/g] に対し、日本食塩製造精製塩はグラム価格 0.12 [円/g] になるため価格を大幅に抑えることができた。



Fig. 1. Fruit hardness tester, type KM-1

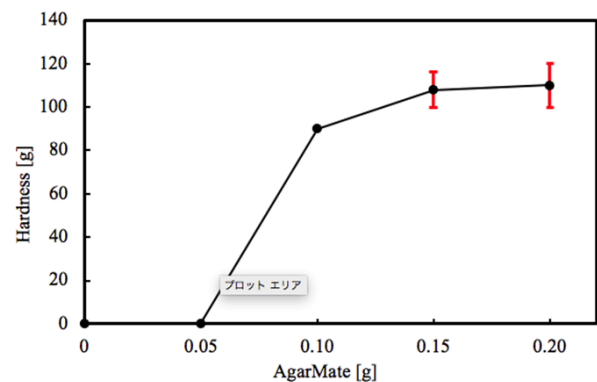


Fig. 2. Change of medium hardness by AgarMate

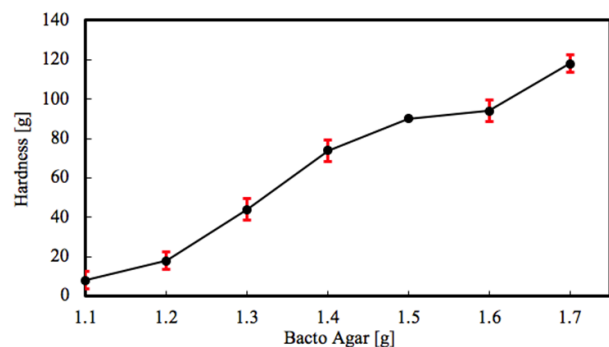


Fig. 3. Change of medium hardness by Bacto agar

Table 6. Composition of each salts

	Price [¥/g]	NaCl [%]	Mg ²⁺ [%]	Ca ²⁺ [%]	K ⁺ [%]	SO ₄ ²⁻ [%]
①和光純薬	4.20	99.5≧	0.002≦	0.002≦	0.005≦	0.002≦
②食塩(塩事業センター)	0.12	99.57	0.02	0.024	0.087	0.023
③特級塩うず塩(鳴門塩業)	0.13	99.7≧	-	-	-	-
④精製塩(日本食塩製造)	0.12	99.90≧	-	-	-	-



Fig. 4. Difference of viable count by each culture medium

3.5 複合基質の効果

本研究において最も多くのコロニーが観察されたのは HMN-6 培地であるが、これらには複合基質が含まれていない。そこで複合基質として Casamino Acids, Yeast Extract, Bacto Tryptone, Bacto Peptone, Bacto Neopeptone, Bacto Proteose Peptone No.3, Bacteriological Peptone をそれぞれ加えた培地を作製し、生育変化を確認するために培養を行った。その結果、HMN-6 培地に Yeast Extract を加えた HMN-6Y 培地が他の複合基質に比べ最も生育度が高かったが、HMN-6Y 培地からピルビン酸、グリセロールを除くとコロニー数が大幅に減少した。

4. 考察

好塩性古細菌の培養に用いられる培地は高価になることが多いため、安価培地の構築と多種多様な好塩性微生物

物を分離することができる培地の構築は重要な課題である。本研究ではコストを抑えつつ多種多様な好塩性古細菌が生育できる開発を目指した。平成 26 年度ソルト・サイエンス研究財団の一般公募研究助成採択課題「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」において、産地関わらず国内産市販塩には多種多様な高度好塩菌が存在しており、海外で発見された高度好塩菌の近縁種も国産の市販塩から分離できることを明らかとした。また、多くの高度好塩菌はピルビン酸、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、リン酸塩が含まれている中性培地で分離可能であることを示し、既知の培地では JCM No.298 培地が最も汎用性が高いことを示した。本研究では JCM No.298 培地を比較対照として実験を行った。

汎用性の確認に使用した培地は JCM No.298 培地、

HMN-1~HMN-8 培地の 9 種類の培地であり、HMN-6 培地は市販塩サンプル 810 サンプル中 426 サンプルからのコロニーを確認することができ、最も汎用性が高かった。また、高度好塩菌の分離に用いられている JCM No.298 培地より 406 円価格を下げる事ができた。

試薬価格の調査を行った結果、好塩性古細菌の培地が高価になる理由は Bacto Agar と NaCl であった。好塩性古細菌の培養において寒天固体培地は必要不可欠であるが、寒天を減らし過ぎると培地の硬度が弱くなり操作に影響が出るだけでなく培地が乾燥しやすくなるため AgarMate を加えることで硬度の補填と培地の乾燥化を防ぐことができた。

次いで、培地中で最も使用量が多い、NaCl について検討を行った。和光純薬の塩化ナトリウムより日本食塩製造株式会社の精製塩の方が好塩性古細菌の増殖には有効であることが分かった。塩化ナトリウムの純度が生育に影響していると考えている。また、価格については、好塩性古細菌の培地で一般的に使用される濃度である 20% で算出すると、和光純薬の塩化ナトリウムでは 1,076 円、日本食塩製造株式会社の塩化ナトリウムでは 24 円となる。よって、より安価な塩化ナトリウムに変更することで価格を抑えることができた。

5. 今後の課題

本研究のデータは定性的なデータが多いため、今後は定量化しその効果を明確化する必要がある。また、既知種に関しての生育を確認していないため、これらに関しても生育の有無を確認する必要がある。本研究では、各試薬の量は JCM で使用されている培地を参考にして調製したが、さらなる微調整によりさらにコストを抑えることが

可能であると考えられる。また、本研究で構築した HMN-6 培地は pH 7.0 であるが、pH を変化させることにより、好アルカリ性、好酸性菌が生育可能であるか確認する必要がある。また、液体培地での生育も確認必要であるが、今後はこれらを解決し、安価で汎用性の高い培地を構築していく予定である。

本研究課題のもう一つのテーマである好塩性微生物の安全性に関する研究では、これまでの抗生物質感受性試験などの分類同定試験の結果からノボビオシンとバシトラシンが抗生物質として有効であることが分かった。本研究課題で構築した培地でこれらの感受性試験を行う予定であったが、本培地はさらなる改良が可能であると考えられたため、今後は培地が完成次第これらについても研究していく予定である。

6. 謝辞

本研究の遂行にあたり、培地製作および塩サンプルの調製に協力していただいた東洋大学理工学部応用化学科生命工学研究室の 4 年生の宮脇泰広さんおよび研究室の皆様へ厚く御礼申し上げます。

7. 参考文献

- (1) 峯岸宏明 平成 26 年度ソルト・サイエンス研究財団の一般助成採択課題「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」報告書
- (2) Oren A (2015) Pyruvate: A key Nutrient in Hypersaline Environments? *Microorganisms*. 3(3):407-416.
- (3) Williams TJ, Allen M, Tschitschko B, Cavicchioli R. (2017) Glycerol metabolism of haloarchaea. *Environ Microbiol*. 19(3):864-877.

Development of Low-Cost Simple Detection Method and Study on the Safety of Halophilic Microorganisms in Solar Salt and Rock Salt

Hiroaki Minegishi^{1,2}, Yasuhiro Shimane², Ken Takai²

¹Faculty of Science and Engineering, Toyo University, ²Institute for Extra-cutting-edge Science and Technology Avant-garde Research, Japan Agency for Marine-Earth Science & Technology

Summary

In Japan, the liberalization of salt sales has made it possible to easily obtain various types of solar salt and rock salt regardless of whether in Japan or abroad. In 2019, the kind of salt that circulates in Japan has been more than 1,500. Nowadays, various kinds of salt are used differently depending on the cooking and its use, and often the salt itself is used directly. About microorganism in food, there are national standards such as ingredient standard and hygiene standard. It does not correspond to all food and harmful microorganisms, and it is not possible to determine the presence or absence of haloarchaea in general food and microorganism tests. In 2015, A group at Kagoshima-Kyoto University reported that "high halophilic bacteria" were infected in the brain of patients with dementia symptoms such as forgetfulness and depression, and encephalomyelitis had occurred. Therefore, detection of halophilic microorganisms in salt is also important from the viewpoint of food safety.

In the previous grant research, we revealed that there are a wide variety of haloarchaea in commercial salts, regardless of the place of production or manufacturing method. Then, they 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. Generally, The culture medium used to cultivate halophilic archaea is often expensive. In this study, we developed a variety of halophilic archaea that can grow at low cost.

As a result of investigation of the reagent price, the reason why the culture medium of halophilic archaea becomes expensive is Bacto Agar and NaCl. The water holding capacity and hardness of the medium were maintained by the addition of AgarMate. The price of salt could be reduced by changing the manufacturer company. The new medium was able to identify colonies from 426 samples out of 810 commercially available salt samples. In addition, the price was ¥ 406 lower than that of the JCM No.298 medium, which is the comparison control.