

# 河水から分離した好塩性細菌について

安永 統 男 · 銭 谷 武 平

## On the Halophilic Bacteria Isolated from River Water

Norio YASUNAGA\* and Buhei ZENITANI

In the outbreaks of food poisoning unknown of the causes to fishes and shells in Japan, recently it is presumed that the majority of the causative agents may be the so-called pathogenic halophilic bacteria, considering as a certain group of marine origin on account of their salt requirement.

But notwithstanding the active and extensive researches on their distribution in sea water and marine environment, no natural source of the organisms is completely confirmed at present. Furthermore, the route of them from sea to man and habitat in winter season are unknown if they are a sort of marine bacteria.

On the other hand, the fact that the optimum growth temperature of them is higher than that of most marine bacteria, and that similar bacteria are abundant in inshore sea water, especially in summer, indicates the possibility of contamination by them from terrestrial environment, above all river water. From this point of view, the authors tried to isolate halophilic bacteria from river water in Nagasaki city during winter and summer, and could obtain many bacteria having a halophilic property.

The present paper reports the method of isolation, the biological characters of the strains isolated and their requirement of salt to grow. The results are as follows;

- 1) The nutrient agar medium—3% NaCl, 0.1% bile salts, lactose and BTB—regarded as useful for detecting the so-called pathogenic halophilic bacteria and the peptone water with NaCl (3% after inoculation of the samples of river water) were employed. All incubations were performed at 37° C for 20-24 hours. The halophilic bacteria were not isolated from the agar media mixed directly with samples of river water, but by streak plating method after incubation of the peptone water inoculated samples of river water to 3% of sodium chloride. All the isolates were lactose-negative strains and no lactose-positive strains had a halophilic property (Table 1).
- 2) Generally, there were many differences in biochemical characters among the strains. Of these, 15 strains (41.7%) isolated in summer were identical with the pathogenic bacteria mentioned above in the basal characters (Table 2), and except the one strain identical in the majority of the other characters (Table 3).
- 3) The ability to grow in the peptone water containing the various concentrations of sodium chloride was found to be remarkably different between the strains obtained in winter and in summer (Table 4). It is considered that the phenomenon resulted from the differences in nature of river water in winter and summer.

---

\* 長崎県衛生研究所 (Hygienic Research Laboratory of Nagasaki Prefecture)

近年、魚介類による食中毒の原因菌として、所謂、病原性好塩菌が大きな関心を集めているが、その食塩嗜好性から海に由来するものであろうとの説が有力で、海水や海水性環境から本菌を分離する試みが各方面で盛んに行われている。しかし、これまでの活発な分布調査にも拘らず、本菌の由来源についての完全な証明はなされていない。また、たとえ本菌が海水性の細菌であるとしても、海から魚介類等を通して消費地に至る経路や、食中毒の発生をみない冬季における分布状態は全く知られていない。

筆者等は病原性好塩菌の適温が本来の意味の海水細菌より相当高いこと<sup>1)</sup>、および本菌類似の細菌が、特に夏季の沿岸海水中に多く分布していること<sup>2)3)</sup>に注目して、陸地からの汚染を推測していたが、汚染源として最も可能性の強い河川を対象に好塩性細菌の分離を試みたところ、冬夏を通じて多数の菌株を分離することが出来た。

本報では、これら好塩性細菌の分離方法、病原性好塩菌の検索を目的とした生物学的性状、および各濃度の食塩培地における発育状態の検査結果について報告する。

## 実 験 方 法

### 1. 河 水 の 採 取

実験に用いた河水の採取は、長崎市内を貫流する河川の数箇所を選定し、昭和36年11月29日から昭和37年2月28日までと、昭和37年8月8日から同年9月14日までの2期に分けて、それぞれ必要に応じ10数回に亘って無菌的に採水を行った。

これらの河水は、全体を通じ冬夏の平均がpH 6.9~7.1, Cl<sup>-</sup> 16~27ppmで、水温は冬季で10°C, 夏季で25°C前後であった。大腸菌群のMPNは $10 \times 10^3 \sim 30 \times 10^4$ で採水場所や日時により可成りの差がみられ、また夏が冬より50~100倍程度多かった。

### 2. 菌 株 の 分 離

菌株の分離には、河水を加えて最終的に食塩濃度が3%になるように調製したペプトン水と、3%食塩、0.1%胆汁酸塩加BTB乳糖寒天培地を使用した。

直接河水から平板を用いて分離する場合は、白金耳による画線培養では、集落は殆んど発生させることが出来なかったので、河水1 mlを37°Cで20~24時間混積培養することにより培地表面に集落を発生させた。また、増菌培養を採用する場合は、河水5 mlを前記ペプトン水に加え37°Cに20~24時間放置後、その1白金耳を平板に塗沫して、同様な条件で培養を行った。これらの平板から目的に応じ乳糖分解性と非分解性菌の孤立集落を各1~3個宛菌した。

分離菌株は3%食塩加ペプトン水と食塩を全く含まぬペプトン水に接種し、37°Cで24時間培養後、好塩性の判定を行った。その結果、前者に良好に発育し、後者に全く発育のみられなかった菌株のみを好塩性細菌として以後の実験に供した。

### 3. 生物学的性状検査

分離好塩性菌株の生物学的性状検査は、すべて食塩を3%添加した培地を使用した。そのうち運動性、インドール産生、硫化水素産生、チトクローム酸化、ゼラチン液化、ブドウ糖分解、クエン酸塩利用、VP, cetrinide培地における発育、色素産生、サッカロースおよびその他の炭水化物分解の各試験は、概ね、厚生省の病原性好塩菌による食中毒措置要領<sup>4)</sup>に準拠して行い、アンモニア生成およびメチレン青還元試験については応用菌学(実施編)<sup>5)</sup>を、カタラーゼ、MRおよび牛乳凝固、液化の各試験は細菌学実習提要<sup>6)</sup>の記載に従った。尿素分解試験は分離菌を3%食塩加普通寒天培地で37°C、20時間培養後、白金耳で菌をかきとり、尿素分解能検査用ビオテスト"栄研"のディスク一枚を入れて試薬を溶出させた3%食塩水1 mlへ懸濁させ、37°Cに4時間放置して色調の変化を観察した。

また、各濃度の食塩加培地中における発育試験においては、pH 7.2のペプトン水へ食塩を0, 0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 3.0, 5.0, 7.0, 10, 15 および20%になるように添加したものに、3%食塩加ペプトン水で37°C、20時間培養した菌液を1滴づつ滴下し、37°Cで48時間培養後菌の発育による混濁を肉眼で観察し判定を行った。

## 実験結果および考察

### 1. 河水からの好塩性細菌の分離状態と乳糖分解性との関係

河水中の細菌のうち、前記平板に発育する集落は黄色の乳糖分解性と緑色の乳糖非分解性の二種の集落に分れるが、河水を直接平板で混濁培養すると黄色の集落が圧倒的に多く、3%食塩加ペプトン水で増菌培養後平板に塗抹すると、殆んどの場合緑色の集落のみの発育が多かった。

病原性好塩菌はこの培地上で通常直径2~3mmの濃緑色の集落を形成するので、乳糖非分解性菌を釣菌する場合はこれに類似する集落を選んだが、比較のために乳糖分解性菌も釣菌して好塩性試験を行なった。

その結果はTable 1に示したように、直接平板からは乳糖分解性の如何によらず、分離菌のすべてが非好塩性を示し、しかも食塩無添加のペプトン水でも良好に発育した菌株であったが、増菌培養後平板に塗抹したものからは、好塩性若しくは好塩性に近い菌株が分離出来た。これらはすべて乳糖非分解性であって乳糖分解性菌については前と同様な非好塩性を示した、冬季においては分離乳糖非分解性菌186株のうち83株が、夏季においては67株のうち36株が好塩性菌で、出現率はそれぞれ44.6%と54.0%であった。

Table 1. Isolation of the halophilic bacteria from river water and their abilities of lactose-decomposition.

Period collected river water	Method of isolation*	Acid from lactose	Strains isolated	Halophilic strains	Halophilic bacteria%
From Nov. 29, 1961 to Feb. 28, 1962  (winter)	A	-	23	0	0
		+	36	0	0
	B	-	186	83	44.6
		+	12	0	0
From Aug. 8, 1962 to Sept. 14, 1962  (summer)	A	-	16	0	0
		+	21	0	0
	B	-	67	36	54.0
		+	20	0	0

\* Method A: River water samples were mixed directly with agar medium.  
Method B: River water samples were once inoculated into peptone water with NaCl (3% after inoculation), and after incubation streaked on agar medium.

この実験結果は夏季は勿論、冬季においても、河水中には好塩性細菌または好塩性細菌になり得る性質を備えた細菌が存在することを意味しており、可成り汚染はされていたが分離源が淡水性の河水であると云う事実と関連して、今後の病原性好塩菌の由来の究明に何らかの示唆を与えるかも知れない。また、乳糖分解性菌の大部分は大腸菌群に属する細菌であろうと思われるが、これらの菌に好塩性がなかったことから、乳糖利用能と好塩性とは或る関係が存するように思われる。

### 2. 分離好塩性菌株の生物学的性状

冬季の分離好塩性菌株83株中37株と、夏季の分離株36株について、厚生省の病原性好塩菌検査要領に従い、そのうちの基本となる形態学および生化学的性状を主体に検査を行った結果をTable 2に示した。

Table 2. Main biological characters of the halophilic isolates.\*\*

Type of strains	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	X I	X II	X III	X IV	X V	X VI	X VII	X VIII	X IX	X X	X X I	X X II
Motility	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+
Production of indol	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Presence of cytochrome oxidase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Reduction of nitrate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Liquefaction of gelatine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Acid from glucose (aerobic and anaerobic)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Gas from glucose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Production of H <sub>2</sub> S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Utilization of citrate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
V. P. test	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M. R. test	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Acid from lactose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Acid from sucrose	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
No. of strains	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	2	2	2	3	1	4	2	8	3	2	3	1
Winter season																						
Summer season	1	6	8	4	1	1	7	0	0	0	0	0	0	6	0	0	2	0	0	0	0	0

\* The upper 7 items are the basal characters for the so-called pathogenic halophilic bacteria, and the 15 strains belonging to the type I, II and III were identical with them.

\*\* All of the strains were Gram-negative rods.

Table 3. Other characters of the isolates corresponded with the so-called pathogenic halophilic bacteria\* in basal characters.

Type of strains		A	B	C	D
Acid from	Rhamnose	(+)	-	-	-
	Arabinose	-	-	-	-
	Xylose	-	-	-	-
	Galactose	+	+	(-)	(-)
	Mannose	(-)	+	+	+
	Fructose	(-)	+	+	+
	Maltose	+	+	+	+
	Treharose	+	+	+	+
	Raffinose	-	-	-	-
	Dextrine	(-)	+	+	+
	Starch	+	+	+	+
	Glycogen	(-)	+	+	+
	Salicin	(+)	(+)	(+)	-
	Glycerine	(-)	+	+	+
	Adonit	-	-	-	-
	Mannit	+	+	+	+
	Dulcit	-	-	-	-
	Sorbit	-	-	-	-
	Inosit	+	-	-	-
Catalase test		+	+	+	+
Urease test		-	-	-	-
Ammonia test		+	+	+	+
Reduction of methylenblue		+	+	+	+
Liquefaction and coagulation of milk		+	+	+	+
Growth on cetyltrimethyl-ammonium bromide agar		-	-	-	-
Production of pigment on King's media	A	Yellowish	No or yellowish	No	No or yellowish.
	B	Reddish	No or yellowish	No or yellowish	No or yellowish.
Flagellum		Polar	Polar	Polar	Polar
Type of strains in Table 2		I	II III	II III	II III
No. of strains		1	1 1	1 3	4 4

\* Take opposite indication to (+) or (-), usually produce no pigment and have a single polar flagellum.

Table 4. Ability of the halophilic isolates to grow in the various concentrations of sodium chloride.\*

No. of strains	Concentration (%) of sodium chloride in peptone water											
	0	0.1	0.2	0.5	1.0	3.0	5.0	7.0	10	15	20	
Isolates in winter	6	-	±~+	+	+~#	##~#	##	##	+~±	-	-	-
	5	-	-	-	-~±	±~+	##	##	##	##	##~#	±~-
	4	-	-~±	±~+	+	+~#	##	##~+	+~±	±~-	-	-
	3	-	-	-	±~+	##	##	##	##	##~#	+~±	-
	3	-	±~+	+~#	##~#	±~#	##	##	##	##~#	##~#	-
	2	-	-	+	##	##	##	##	##	##	##	-
	2	-	-	-	+~#	##	##	##	##	##	##~#	±~-
	2	-	-	-	-	-	##~#	##~#	##~#	##~#	##~+	-
	2	-	-	-	+	##	##	##	##~#	+	-	-
	2	-	-~±	+	+~#	##	##~#	##~#	##~#	##~+	-	-
	2	-	-	-~±	+~#	##~#	##	##	+	-	-	-
	1	-	+	+	##	##	##	##	##	##	+	-
	1	-	-	-	+	+	##	##	##	##	+	-
	1	-	-	-	±	±	+	+	##	##	##	-
	1	-	-	-	-	-	##	##	##	+	-	-
Isolates in summer	13	-	-	-	+	##	##	##	##~+	-	-	
	10	-	-	-	±~+	+~#	##	##	##~+	-	-	
	5	-	±~+	+	+~#	##~#	##	##	##~#	±~-	-	
	3	-	-	-~±	##~#	##	##	##	##	+	-	
	1	-	-	-	+	##	##	##	##	-	-	
	1	-	+	+	##	##	##	##	##	-	-	
	1	-	+	+	+	##	##	##	##	-	-	
	1	-	±	+	+	+	##	##	##	-	-	
	1	-	-	±	##	##	##	##	+	-	-	

\* Results recorded after 48 hr of incubation at 37°C.

Growth recorded as relative turbidity by visual estimation.

##=maximal turbidity; #=moderate turbidity;

+ =slight turbidity; ±=detectable turbidity; - =no turbidity.

これらの性状のうち、グラム染色、形態、運動性、チトクローム酸化、インドール産生、硝酸塩還元、ゼラチン液化、ブドウ糖の酸化醗酵およびガス産生の各試験において、病原性好塩菌の性状と一致した菌株は一応疑わしいものとして取り扱うことになっているが、冬季の分離菌株にはこのような株はなく、夏季のものでは36株中15株がそれに相当し分離率は41.7%であった。

なお、これだけの性状検査結果からでも分るように、河水から分離される好塩性細菌は多種に亘っているが、このことは自然界に存在する好塩細菌は、特殊な菌を除いては、好塩性を基にして分類が出来ない程種類が多く、過去において非好塩性細菌が好塩性を獲得したためであろうとする説<sup>7)8)</sup>と関連して興味がある、

次に、先の15株について更に詳細な性状を検査した結果を Table 3 に示した。この成績を病原性好塩菌の標準株の性状と比較してみると、糖およびアルコール類の分解能において可成りの相違を示した Type I 株を除いては、サリシンとガラクトースの分解性等に若干の差異がみられたが、大部分の性常において一致した。

これらが病原性好塩菌であるかどうかは不明であるが、このように極めて類似する細菌が河水から分離されたことと云うことは河水からの病原性好塩菌汚染の可能性を推測するものであろう。

### 3. 分離好塩性細菌の発育と食塩濃度との関係

生物学的性状検査を行った好塩性菌株73株について、食塩の各濃度における発育程度をペプトン水を用いて試験した結果、Table 4 のような成績を得たが、冬季の株と夏季の株とを比較すると著しい相違のあることが分る。

すなわち、冬季の分離株のうちには食塩濃度15%で良好な増殖を示した多数の菌株と、更に20%でもわずかではあるが発育した菌株もあった。夏季の株はすべて10%までを発育限度とし、また0.5%乃至は1%でもすべて発育を示したが、冬季の株はこの濃度では全く増殖しなかった菌株もあった。

このように、冬季と夏季の分離株の間に差異があること、および15%食塩加培地でも良好に発育する細菌が淡水性の環境から分離された理由としては、分離源である河水の性状が夏と冬では異なるためであろうと想像される。

なお、病原性好塩菌は37°Cにおいては0.5%の食塩濃度で或る程度発育し、10%では全く発育しないとされているが<sup>9)</sup>、このような菌株は冬のものに11株、夏のものに7株含まれていた。

## 摘 要

- 1) 河水からの病原性好塩菌の汚染を想定して、長崎市内の河川を対象に冬夏の二期に分けて好塩性細菌の分離を試みたところ、多数の菌株を分離することが出来た。
- 2) これら好塩性細菌は河水から直接は分離出来ずすべて増菌培養することによってのみ得られたが、全株とも乳糖非分解性を示し乳糖分解性株には分離方法の如何によらずすべて好塩性はなかった。
- 3) 病原性好塩菌検査要領に従う生化学的性状は、一般に各菌株の間で可成りの相違がみられ分離株が多種類に亘っていることを示しているが、このうち病原性好塩菌と基本的性状の一致するものは夏季の株に41.7%含まれていた。
- 4) 冬と夏の分離株の食塩に対する増殖態度には相当の差異がみられたが、これは分離源である河水の性状が冬と夏では異なるためと推定される。

## 文 献

- 1) 柳沢文徳：魚介類食中毒と好塩性細菌，社団法人：日本食品衛生協会，p.85 (1961)。
- 2) 宮本泰・中村一威・滝沢金次郎・児玉威：日本公衆衛生学雑誌，8，673 (1961)。
- 3) 宮本泰・中村一威・滝沢金次郎・児玉威：日本公衆衛生学雑誌，8，703 (1961)。
- 4) 厚生省環境衛生局食品衛生課：食品衛生研究，12，7 (1962)。
- 5) 宮路憲二：応用歯学下巻(実施篇)，岩波書店 (1958)。
- 6) 伝染病研究所学友会編：細菌学実習提要，丸善 (1956)。
- 7) W.L.FLANNERY：Bact. Rev.，20，49 (1956)。
- 8) 片桐正之：好塩性，耐塩性の化学，生命現象の化学II，朝倉書店，p.405(1961)。
- 9) 堀江進：Modern Media，8，259 (1962)。