

[J. Ferment. Technol., Vol. 54, No. 11, p. 766~775, 1976]

Tetracoccus soyae と *Bacillus* sp. の耐塩性の測定法と耐塩性に及ぼす因子について*

坂井 拓夫・笠井八重子・田島 滋・大亦正次郎

大阪府立大学農学部農芸化学科

Studies on the Determination Methods for the Halotolerance of *Tetracoccus soyae* and *Bacillus* sp.*

Takuo Sakai, Yaeko Kasai, Shigeru Tajima, and Shojiro Omata

Department of Agricultural Chemistry, College of Agriculture
University of Osaka Prefecture, Sakai, Osaka 591

Salt is one of the physicochemical factors which control the growth of microorganisms. Estimation of halotolerance seems to be important for the analysis of effects of salts. The present paper proposes a method for quantitative estimation of halotolerance.

It was found that general bacteria could be divided into 3 groups according to their growth in the presence of 10% NaCl: The first comprises bacteria whose growth was not effected; the second, bacteria whose growth rate was reduced; and the third, bacteria most of which were killed but some of which acquired halotolerance and grew. It was shown that growth rate could be a standard for halotolerance of *Tetracoccus soyae*, which was typical of the second group. Growth lag time was also a standard for *Bacillus* sp. M-9 which was typical of the third group. Halotolerance of *Tc. soyae* was found to be affected by initial pH and that of M-9 was by osmotic pressure and initial pH.

緒 言

食塩は微生物の生育を支配する1因子であるが、その微生物に与える影響は物理的、化学的に複雑なことが考えられる。

従って、微生物の耐塩性を研究する上では、こうした食塩の複雑な影響を解析する方法を確立する必要があると思われる。しかし、一般に耐塩性の定義はきわめてあいまいであり、耐塩性の測定法や研究の対象とする菌株の選定など、耐塩性の研究上解明されるべき点が多い。

本報では、細菌の耐塩性に関する研究の一環として、

前報で示した耐塩性の *Bacillus* 属細菌¹⁾ と耐塩性の乳酸菌 *Tetracoccus soyae*^{2,3)} を用いて両菌の塩に対する挙動について解析することを試みた。

実 験 方 法

使用菌株 本実験には *Tetracoccus soyae* (以下 *Tc. soyae*) と *Bacillus* sp. M-9 (以下 M-9 菌) を主として供試菌株として用いその他の菌株はすべて本学醸酵化学研究室に保存のものを用いた。

培地および培養法 M-9 菌の培地は Table 1 に示す YMPG-培地、*Tc. soyae* の場合は CMM-培地を基本培地とした。培養は M-9 菌の場合、Table 1 に示す FGP-培地で、30°C、18時間、*Tc. soyae* の場合、CM-培地で30°C、15時間それぞれ振盪培養したものを種菌

* 細菌の耐塩性に関する研究 (第2報)
Studies on Halotolerance of Bacteria (II)

Table 1. Composition of media.

YMPG-medium		CMM-medium	
yeast extract	0.5%	casamino acid	0.05%
meat extract	1.0	yeast extract	0.1
peptone	1.0	KH ₂ PO ₄	0.2
glucose	0.9	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.05
(pH 6.6-6.8)		NH ₄ Cl	0.5
		(pH 7.0)	
FGP-medium		CM-medium	
Na ₂ fumarate	0.8%	casamino acid	0.5%
glucose	2.0	yeast extract	0.1
(NH ₄) ₂ HPO ₄	1.3	KH ₂ PO ₄	0.2
KCl	0.2	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.05
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.05	(pH 7.0)	
MnCl ₂ ·4H ₂ O	0.005		
(pH 6.6-6.8)			
GP-medium		CMG-medium	
glucose	2%	casamino acid	0.05%
(NH ₄) ₂ HPO ₄	1.3	yeast extract	0.1
KCl	0.2	KH ₂ PO ₄	0.2
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.05	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.05
MnCl ₂ ·4H ₂ O	0.005	NH ₄ Cl	0.5
(pH 6.6-6.8)		Glucose	1.0
		(pH 7.0)	

とし、培地の2%を接種して試験管を用いて振盪培養した。

生育度の測定法 菌の生育は通常生菌数で測定したが、簡便な方法として濁度法も用いた。濁度は平沼光電光度計 EPO-B 型を用い、生育度を 660 nm における濁度をもって示した。生菌数の測定法は以下のように行った。すなわち、培養液を適当に希釈し M-9 菌は YMPG-寒天培地、*Tc. soyae* は CM-寒天培地(無機塩を除いたもの)の各平板培地を用い常法によって 30°C、24~48 時間培養後に出現するコロニーを計数し、この値から生菌数を求めた。

生菌数の変化の測定法 M-9 菌について YMPG-培地で 30°C、24 時間、*Tc. soyae* の場合は CM-培地で 30°C、15~18 時間振盪培養したものを試菌液として用いた。細菌の細胞の食塩との接触は M-9 菌の場合は YMPG-培地、*Tc. soyae* はカザミノ酸 0.05%、酵母エキス 0.1% を含む培地 (pH. 7.0) を用いて、これに種々の物質を添加したもの (pH 6.0-7.0) 4.5 ml に上記の試菌液を 0.5 ml 加え、30°C で 1 時間振盪することによって。

実験結果および考察

種々の細菌の生育に及ぼす食塩の影響 前報で示したように、²⁾ 細菌の生育し得る限界食塩濃度は使用する培地および培養条件で異なり、これを正確に求めることは困難である。そこで、種々の細菌と著者らが耐塩性の研究に使用してきた M-9 菌と *Tc. soyae* の生育限界食塩濃度を比較し、細菌種族間の食塩に対する挙動の傾向を求めた。本研究では十分な栄養状態での生育を比較するため培地として YMPG-培地を使用して 30°C で振盪培養した。Table 2 に示すように多くの *Pseudomonas* 属細菌と *Agrobacterium* 属細菌は 6% の食塩存在下では生育できない。しかし、同じグラム陰性菌でも *Escherichia*, *Aerobacter* 等 Enterobacteriaceae に属する菌株は、6~8% の食塩存在下でも生育可能であった。また、グラム陽性菌では *Bacillus* 属の一部を除き、すべて 10% 食塩存在下で生育した (Table 3)。このように、グラム陰性菌とグラム陽性菌の間に、食塩濃度 10% を境にして明らかな生育の差が認められた。10% の食塩を含む培地に生育し得る菌株でも、菌株間

Table 2. Effect of NaCl on the growth of various Gram-negative bacteria.

Strain	Growth Conc. of NaCl			Type of growth
	6 %	8 %	10 %	
<i>Escherichia coli</i> AKU 0004	+++	—	—	
<i>Escherichia coli</i> AKU 0006	+++	—	—	
<i>Escherichia coli</i> IFO 3301	+++	+	—	
<i>Aerobacter cloacae</i> IAM 1221	+++	++	—	
<i>Aerobacter aerogenes</i> IFO 12059	+++	++	—	
<i>Erwinia carotovora</i> IFO 3380	++	—	—	
<i>Serratia marcescens</i> IFO 3054	++	+	—	
<i>Serratia marcescens</i> IFO 3736	++	—	—	
<i>Proteus vulgaris</i> IFO 3167	++	+	—	
<i>Proteus mirabilis</i> IFO 3849	+++	+++	—	
<i>Alcaligenes faecalis</i> IAM B-141-1	+++	+	—	
<i>Achromobacter polymorph</i> AKU 0122	+++	+++	++	II
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> IAM 1037	—	—	—	
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> IAM 1525	—	—	—	
<i>Pseudomonas fragi</i> IFO 3458	—	—	—	
<i>Pseudomonas graveolens</i> AKU 0808	—	—	—	
<i>Pseudomonas iodum</i> IFO 3558	+++	+++	++	III
<i>Pseudomonas ovalis</i> AKU 0820	—	—	—	
<i>Pseudomonas striata</i> AKU 0813	—	—	—	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> IFO 3456	+	—	—	
<i>Arthrobacter oxydans</i> IFO 12138	—	—	—	

The cultivation was carried out in YMPG-medium containing indicated amount of NaCl, at 30°C, on a shaker. The type of growth was explained in the text and in Fig. 1. Symbols indicate no growth (—), growth within 16 hr (++), growth within 32 hr (++) and growth within 7 days (+).

では生育状態がかなり異なるであろうことが考えられた。そこで、各菌株の生育曲線を濁度法でしらべた結果、食塩濃度10%までと限定した場合、Fig. 1 に示すようにそれらの生育曲線から3つのタイプに分類できることを見い出した。すなわち、食塩濃度10%以下ではほとんど生育に影響を受けないタイプ（I型、*Staphylococcus aureus*）、10%食塩存在下では死滅することはないが、増殖速度が低下するタイプ（II型、*Micrococcus flavus*, *Tetracoccus soyae*）、10%食塩存在下では短時間に大部分が死滅し、見かけ上、誘導期の時間が延長され、主に誘導期に影響を受けるタイプ（III型、*Bacillus* sp., M-9 菌）に分類された。

高濃度食塩による細菌の死滅 M-9菌が高濃度食塩と接触することにより死滅することは先に述べたが、10%食塩存在下で生育可能な他の細菌と比較する目的で、YMPG-培地で24時間培養した菌体を12%食塩培

地中に移植し、1時間接触後、生菌数の変化を測定した。Table 4 に示すように、グラム陽性菌の中で食塩によって著しく死滅したものは *B. subtilis* のみであった。*Tc. soyae* では M-9 菌にみられるような高濃度食塩存在下での死滅は起こらず、すでに食塩に対する耐性を獲得しており、同じ耐塩性菌でも食塩に対する挙動が *Tc. soyae* と M-9 菌では著しく異なっていることが明らかとなった。M-9 菌と *Tc. soyae* に対する食塩の毒物としての作用を他の無機塩と比較検討した。Table 5 に示すように、M-9 菌の生育を阻害する物質の中で、無機塩類は殺菌的な効果を示したが、同じ浸透圧下でもポリエチレングリコール (PEG #200) や、高濃度では生育を阻害するグリセリンやグルコースは殺菌効果を示さなかった。このことは、無機塩の殺菌効果が、その塩の作り出す浸透圧のみによるものではないことを示していると考えられる。しかし、*Tc.*

Table 3. Effect of NaCl on the growth of various Gram-positive bacteria.

Strain	Growth Concn. of NaCl			Type of growth
	6 %	8 %	10 %	
<i>Bacillus pumilus</i> IFO 12086	+++	+++	++	III
<i>Bacillus subtilis</i> IFO 3013	+++	+++	++	III
<i>Bacillus subtilis</i> IFO 3007	+++	+++	++	III
<i>Bacillus subtilis</i> IFO 3026	+++	+++	++	III
<i>Bacillus subtilis</i> IFO 3027	+++	+++	++	III
<i>Bacillus subtilis</i> IFO 3037	+++	+++	++	III
<i>Bacillus subtilis</i> var. <i>niger</i> AKU 0217	+++	+++	++	III
<i>Bacillus subtilis</i> IFO 3009	+++	+++	++	III
<i>Bacillus</i> sp. M-9	+++	+++	++	III
<i>Bacillus circulans</i> IFO 3329	—	—	—	
<i>Bacillus sphaericus</i> IFO 3341	—	—	—	
<i>Bacillus sphaericus</i> IFO 3526	—	—	—	
<i>Micrococcus flavus</i> AKU 0502	+++	+++	++	II
<i>Micrococcus glutamicus</i> ATCC 13032	+++	+++	++	II
<i>Micrococcus</i> sp. No. 431 AKU 0511	+++	+++	++	II
<i>Staphylococcus aureus</i> IFO 3340	+++	+++	+++	I
<i>Staphylococcus aureus</i> IFO 3183	+++	+++	+++	I
<i>Tetracoccus soyae</i> Ueno et Omata	+++	+++	++	II
<i>Sarcina lutea</i> IFO 3232	+++	+++	++	II
<i>Sarcina marginata</i> AKU 0543	+++	+++	++	II
<i>Corynebacterium equi</i> IAM 1038	+++	+++	++	II
<i>Brevibacterium divaricatum</i> NRRL 2311	+++	+++	+	II
<i>Brevibacterium lactofermentum</i> AKU 0644	+++	+++	++	II

Footnotes are same as in Table 1.

soyae においては、M-9 菌にみられるような死滅現象はいずれの無機塩によっても認められなかった。

上記の種々の塩の阻害程度や、アニオン、カチオンの影響をさらに詳細に考察するため、定量的に表示して、これらの関係を明確にすることを試みた。

耐塩性の測定法について 食塩による生育阻害が M-9 菌では主として誘導期の延長、*Tc. soyae* では対数期の生育速度の減少として現れる性質を考慮して、食塩が生育に及ぼす影響を測定することを試みた。すなわち、M-9 菌では生菌数（または濁度）の対数を縦軸に、培養時間を横軸にとってプロットして得た曲線の直線部分を、ゼロ時間の時の生菌数（濁度）まで外挿した点までの時間を、見かけの誘導期 T_L (hr) とした。*Tc. soyae* では 660 nm における濁度の対数を縦軸に、培養時間を横軸にとってプロットして得た曲線の直線部分を濁度 0.1 に内挿した点までの培養時間を $T_{0.1}$ (hr) とした。このようにして求めた値の対数と食塩濃

度の間には Figs. 2, 3 に示したように、ほぼ直線関係が認められた。

食塩の毒作用について 前述したように、M-9 菌は *Tc. soyae* と比較して高濃度の食塩に対する耐性は弱く、食塩に接触させた場合、高い率で死滅するが、生き残った菌はやがて適応的に耐性を獲得し、増殖できることが明らかとなった。このことは、食塩が M-9 菌に対して死に到らしめる薬物としての作用を示している。そこで、この作用をさらに詳細に考察するため定量的な取り扱いを試みた。

1933年、Ingraham⁴⁾ は、一般に接種菌量と誘導期の長さとの間に直線関係が成立し、この直線の傾斜は添加された薬物の濃度によって異なることに注目して、薬物の存在しない場合とする場合との直線の傾斜の比から阻害度を求めている。また、Hoffman と Rahn⁵⁾ は、誘導期の長さや薬物濃度との間には、ある範囲内で直線関係の成立することを認めている。さらに、田

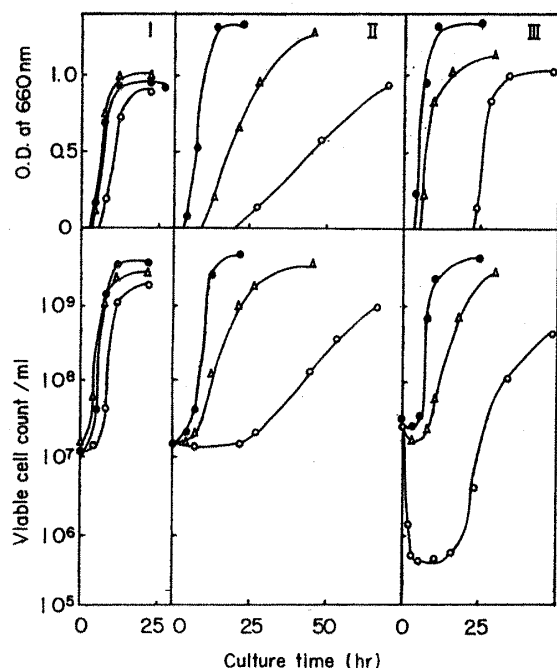


Fig. 1. Effect of NaCl on the growth of three bacteria typical of three kinds of halotolerance.

Three bacteria (I: *Stp. aureus*, II: *Tc. soyae*, III: *Bacillus* sp. M-9) were cultivated in YMPG-medium containing indicated amounts of NaCl at 30°C, on a shaker. Aliquots were removed at the time indicated and immediately subjected to viable cell count.

(●) 0% NaCl, (△) 6% NaCl, (○) 10% NaCl

宮ら⁹⁾は、薬物によって微生物に対する作用様式が異なることをもとにして、薬物阻害作用と薬物濃度との間に一つの函数関係が成立することを認め、薬物の対数期の生育抑制、あるいはみかけ上の誘導期の延長を阻害度の指標として(1)式より阻害度 H を求めている。

$$H = 1 - \frac{T}{T_G} \quad (1)$$

(T : 薬物のない場合の T_L (あるいは $T_{0.1}$), T_G : 薬物の存在する場合の T_L (あるいは $T_{0.1}$)) この式によって求めた阻害度 H と薬物濃度 G との間には、一般にシグモイド形の関係が存在することがわかっている。また、その傾斜や位置 (Figs. 4 と 5 を参照) は一つの薬物と一つの微生物では一定である。多くの実験結果から、阻害度 H と薬物濃度 G との間に、(2) 式に示すような函数関係が近似的に成立することが帰納的に導き出されている。

$$H = \frac{G^n}{\phi^n + G^n} \quad (2)$$

ここに示された n および ϕ は恒数で、この値は薬物の種類、供試菌の種類その他の実験条件によって決まるものである。 ϕ は $H=0.5$ (阻害度50%) のときの薬物濃度、 n は正の数で薬物の濃度に対する微生物の感受性を示す値である。式(2)は

$$\log \left(\frac{H}{1-H} \right) = n \log G - n \log \phi \quad (3)$$

Table 4. Effect of high concentration of NaCl on viability of various bacteria.

Strain	Gram-stain	Viability (viable cell number/ml)	
		Control	Exposure to NaCl
<i>Escherichia coli</i> AKU 0004	—	4.6×10^8	3.2×10^8
<i>Aerobacter aerogenes</i> IFO 12059	—	3.8×10^8	3.6×10^8
<i>Serratia polymuthicum</i> AKU 0062	—	3.8×10^8	2.7×10^8
<i>Alcaligenes faecalis</i> IAM B-141-1	—	3.5×10^8	1.6×10^8
<i>Pseudomonas fluorescens</i> AKU 0821	—	4.7×10^8	2.8×10^8
<i>Bacillus</i> sp. M-9	+	3.2×10^8	8.4×10^5
<i>Bacillus subtilis</i> var. <i>niger</i> AKU 0217	+	3.1×10^8	7.6×10^6
<i>Bacillus sphaericus</i> IFO 3527	+	3.8×10^8	2.6×10^8
<i>Sarcina lutea</i> IFO 3232	+	4.8×10^8	3.9×10^8
<i>Brevibacterium</i> sp. P145 AKU 0643	+	4.2×10^8	4.1×10^8
<i>Staphylococcus aureus</i> IFO 3340	+	2.3×10^8	2.5×10^8
<i>Corynebacterium equi</i> IAM 1038	+	3.0×10^8	2.2×10^8
<i>Tetracoccus soyae</i> Ueno et Omata	+	3.0×10^8	2.5×10^8

Bacterial cells were exposed to 2M NaCl in YMPG-medium at 30°C for 1 hr on a shaker.

Table 5. Effect of various reagents on the viability of Strain M-9 and *Tc. soyae*.

Reagent	Concn. (M)	Osmotic pressure (atm)	Viability (cell number/ml)	
			M-9	<i>Tc. soyae</i>
Control	—	—	3.2×10^8	3.0×10^8
NaCl	1	50	9.6×10^8	3.8×10^8
	2	99	8.5×10^8	3.0×10^8
KCl	1	50	1.7×10^8	3.9×10^8
	2	99	4.0×10^8	3.0×10^8
LiCl	1	50	2.0×10^7	2.2×10^8
	2	99	2.0×10^5	2.0×10^8
MgCl ₂	1	75	7.0×10^8	2.8×10^8
	2	149	2.0×10^8	2.7×10^8
Na ₂ SO ₄	1	75	8.9×10^4	3.0×10^8
PEG#200	1	25	2.0×10^8	3.0×10^8
	2	50	5.2×10^7	—
Glycerol	2	50	4.0×10^8	3.0×10^8
	4	99	1.9×10^8	—
Glucose	2	50	1.5×10^8	2.5×10^8
	3	75	1.3×10^8	—

Assay of viability was carried out according to the method described in the text.

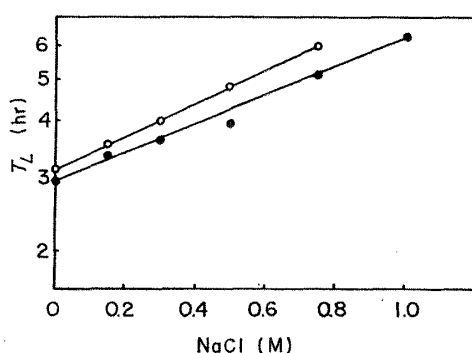


Fig. 2. Relationship between T_L and concentration of NaCl in the growth of Strain M-9 and *Escherichia coli*.

T_L is defined as culture time (hr) calculated from extrapolation of the straight line in culture time-logarithm of viable cell count (or OD₆₆₀) plot to logarithm of viable cell count (or OD₆₆₀) at time zero.

(○) *E. coli*, (●) *Bacillus* sp. M-9

と書き換えられる。すなわち、(3)式が成立するためには、 $\log \frac{H}{1-H}$ の値と $\log G$ との間に直線関係が存在する。そして、この直線の傾斜から n 値が、直線と $\log G$ 軸 ($\log \frac{H}{1-H} = 0$) との交点から ϕ 値が求められる。上に示したことを参考にして、*Tc. soyae* と M-9 菌の生育に及ぼす各種の塩の影響をしらべるため、上述の 2 菌株それぞれの耐塩度の測定法によって求めた

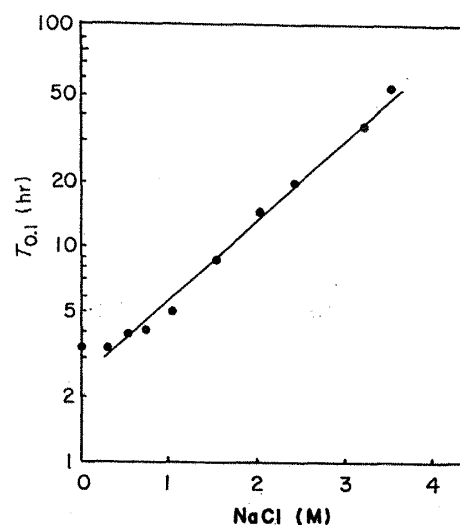


Fig. 3. Relationship between $T_{0.1}$ and NaCl concentration on the growth of *Tetracoccus soyae*.

$T_{0.1}$ is defined as culture time (hr) calculated from interpolation of straight line in culture time-log OD₆₆₀ plot to 0.1 OD unit.

値 $T_{0.1}$ および T_L 値を用いて、塩による生育阻害度を上式から求め、各種のカチオンやアニオンの作用について検討した (Fig. 4)。M-9 菌に対する NaCl, KCl, Na₂SO₄, NaBr, KI の阻害は、 $\log \frac{1-H}{H}$ と $\log G$ のプロットが直線になり (3) 式が成り立つことがわかった。

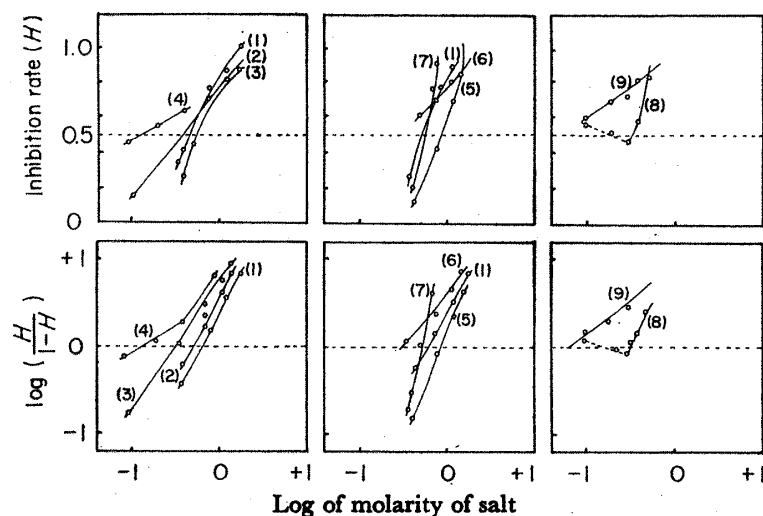


Fig. 4. Effect of various salts on the growth of Strain M-9.

Cultivation was carried out in YMPG-medium containing indicated amounts of salts at 30°C on a shaker. H is defined as follows: $H = 1 - \frac{1/T_G}{1/T} = 1 - \frac{T}{T_G}$, where T_G and T are T_L in the presence and in the absence, respectively, of salts: (1) NaCl, (2) KCl, (3) Na_2SO_4 , (4) LiCl, (5) NaBr, (6) KBr, (7) KI, (8) MgCl_2 , (9) CaCl_2 .

しかし、LiCl, KBr では、濃度によって阻害作用が異なっているかのようにプロットが屈曲し、 MgCl_2 では、低濃度では生育促進、高濃度で生育阻害を示すことが見出された。Table 6 に M-9 菌に対する種々の無機塩の生育阻害の指標となる値、 n と ϕ を示した。この表から、NaCl, KCl は M-9 菌に対し比較的弱い毒性を示すこと、塩の生育阻害が浸透圧と直接関係をもたないことがうかがわれた。また、 Na_2SO_4 は 1 分子中に 2 つの Na^+ イオンを含むが、 n および ϕ の値が NaCl のほぼ 1/2 であり、 Na_2SO_4 の阻害が主として Na^+ イオ

ンによるものであると考えれば理論的によく一致する。この Table 6 をさらに明確にするため、Table 7 にカチオンとアニオンの組み合わせの関係と、 n および ϕ の値を示した。この結果から Cl^- , Br^- , SO_4^{2-} と Na^+ の塩では、 n , ϕ の値がかなりよく合致する。しかし、 Cl^- の種々の塩ではカチオン部分が異なることによって、 n , ϕ の値は全く異なり、NaCl の毒作用が Na^+ イオンの影響を強く受けていることが考えられた。一方、*Tc. soyae* の生育に対して NaCl の及ぼす阻害は、M-9 菌と比較して ϕ の値が大きいことから、M-9 菌に比べ

Table 6. Inhibition parameters of various salts against Strain M-9.

Salt	Lethal concn. (M)	n^*	ϕ^{**}	
			Concn. (M)	Osmotic pressure (atm)
NaCl	2.5	2.11	0.66	32.8
KCl	2.5	0.89	0.25	12.4
LiCl	0.9	0.30	0.18	9.0
MgCl_2	0.7	1.90	0.32	23.9
CaCl_2	0.5	0.74	0.06	4.6
NaBr	2.0	2.50	0.86	41.7
KBr	2.0	0.99	0.36	17.8
KI	1.2	5.40	0.56	27.8
Na_2SO_4	1.7	1.10	0.36	26.8

* n : slope of inhibition curve.

** ϕ : concentration of salt at 50% inhibition of the growth.

Table 7. Inhibition parameters of various salts against Strain M-9 by cations and anions.

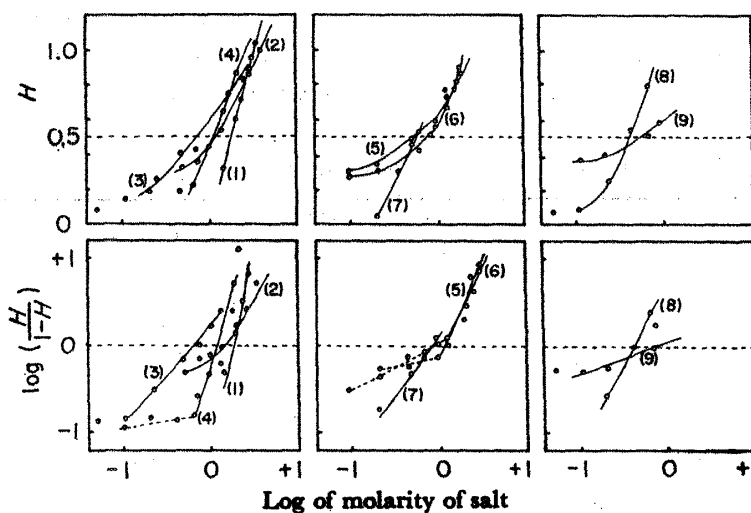
Cation	Anion							
	Cl ⁻		Br ⁻		I ⁻		SO ₄ ²⁻	
	<i>n</i>	ϕ	<i>n</i>	ϕ	<i>n</i>	ϕ	<i>n</i>	ϕ
Na ⁺	2.11	0.66	2.50	0.86	—	—	1.10	0.36
K ⁺	0.89	0.25	0.99	0.36	5.40	0.56	—	—
Li ⁺	0.30	0.25	—	—	—	—	—	—
Mg ²⁺	1.90	0.32	—	—	—	—	—	—
Ca ²⁺	0.74	0.06	—	—	—	—	—	—

Data described in Table 6 are rearranged so that inhibitory effect of salt is expressed as combination of effect of cations and anions.

て耐塩性が強く、また、*n* の値から食塩濃度 1 M 以上では生育に及ぼす食塩の影響が敏感に現われると考えられた (Fig. 5, Table 8). KCl, KBr, NaBr では、ある濃度でグラフが屈曲することが認められることより、低濃度域と高濃度域では阻害様式が異なることも考えられた。さらに、アニオン、カチオンの影響をしらべるため、Table 8 を Table 9 のように整理した。この表に示すように、Na⁺, Cl⁻ のどちらのイオンが生育に影響を及ぼしているのかは明らかではなく、塩による生育阻害が Na⁺, Cl⁻ の両方の影響を受けていることが推測された。

食塩存在下の生育に及ぼす物理的因子について

1. グルコースと食塩の共同影響：耐塩性と耐糖性（抗滲透圧性）の関係について検討した。M-9 菌は YMP-および GP-培地、*Tc. soyae* は CMM-培地を基本培地としてそれぞれに食塩とグルコースを共存させた場合の生育を検討した。M-9 菌ではグルコース濃度を一定にし食塩濃度を変化させた時、ある食塩濃度を越えると誘導期の長さ T_L が急激に伸びる (Fig. 6B)。この食塩濃度の変曲点におけるグルコース濃度（臨界濃度）を食塩濃度に対してプロットすると、ほぼ直線的となりグルコースと食塩の間に一定の関係が存在することが認められた (Fig. 6C)。また、*Tc. soyae* については Fig. 6A の結果を得た。すなわち、 $T_{0.1}$ が

Fig. 5. Effect of various salts on the growth of *Tc. soyae*.

Cultivation was carried out in CMG-medium containing indicated amount of salts at 30°C on a shaker. H is defined as shown in Fig. 4, except that $T_{0.1}$ replaces T_L . (1) NaCl, (2) KCl, (3) Na₂SO₄, (4) LiCl, (5) NaBr, (6) KBr, (7) KI, (8) MgCl₂, (9) CaCl₂.

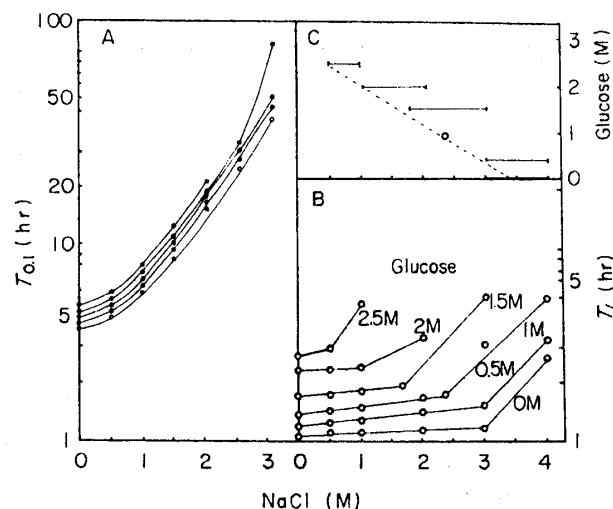


Fig. 6. Effect of NaCl and glucose on the halo-tolerance of *Tc. soyae* and Strain M-9.

Tc. soyae (A) and Strain M-9 (B) were respectively cultivated at 30°C on a shaker in CMM- and YMPG-media containing various concentrations of NaCl and glucose as indicated. $T_{0.1}$ and T_L , respectively, were plotted against NaCl concentration. NaCl concentration (C) at bending point of NaCl concentration- T_L curve in figure B was plotted against glucose concentration.

Glucose

○ 0 (M), ● 0.5, ◐ 1,
◑ 2, ⊗ 2.5

Table 8. Inhibition parameters of various salts against *Tc. soyae*.

	Lethal concn. (M)	n	ϕ	
			Concn. (M)	Osmotic pressure (atm)
NaCl	>4	3.5	1.78	88.5
KCl	>4	0.65	1.16	57.6
LiCl	>2	2.4	0.32	15.9
MgCl ₂	1.0	1.8	0.36	26.8
CaCl ₂	1.0	0.3	0.63	47.0
NaBr	>3	1.0	1.0	49.7
KBr	>3	0.5	1.16	57.1
KI	1.5	1.1	1.0	49.7
Na ₂ SO ₄	>2	1.1	0.63	47.0

食塩濃度の増大とともに長くなるが、グルコース添加による影響はほとんど認められなかった。

2. 初発 pH の影響: M-9 菌には YMP-培地, *Tc. soyae* には CMM-培地を用いて高濃度食塩存在下での生育に及ぼす初発 pH の影響について検討した。その結果, M-9 菌は Fig. 7A に示すように食塩の存在しない場合には pH 5~9 の広い範囲でよく生育し, T_L 値も小さかったが, 12%食塩存在下では pH 6 付近で最小の T_L 値を示した。一方, *Tc. soyae* では pH 4~9 の範囲でよく生育するが, 15%食塩存在下では pH 4~6 の間でのみ生育が認められ, 酸性側で $T_{0.1}$ 値がやや小さくなることが認められた (Fig. 7B)。従って, M-9 菌, *Tc. soyae* ともに高濃度食塩存在下での生育は無塩下での生育に比べかなり狭い pH 領域に限定されることが明らかとなった。

3. 培養温度の影響: Fig. 8Aに示すように, M-9 菌の T_L は培養温度によって影響され, 無塩下でも食塩 12%存在下でも 25~37°Cの間では温度が高い方が T_L

Table 9. Inhibition parameters of various salts against *Tc. soyae* by cations and anions.

Cation	Anion							
	Cl ⁻		Br ⁻		I ⁻		SO ₄ ²⁻	
	n	ϕ	n	ϕ	n	ϕ	n	ϕ
Na ⁺	3.5	1.78	1.0	1.0	—	—	1.1	0.63
K ⁺	0.65	1.16	0.5	1.16	1.1	1.0	—	—
Li ⁺	2.4	0.32	—	—	—	—	—	—
Mg ²⁺	1.8	0.36	—	—	—	—	—	—
Ca ²⁺	0.3	0.63	—	—	—	—	—	—

Data described in Table 8 are rearranged so that inhibitory effect of salt is expressed as combination of effect of cations and anions.

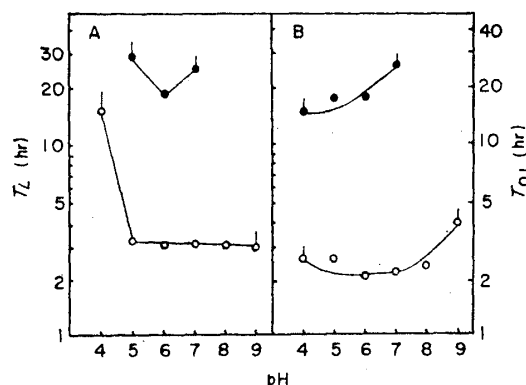


Fig. 7. Effect of initial pH on the halotolerance of Strain M-9 and *Tc. soyae*.

The bacteria were cultivated at the indicated initial pH in the presence or in the absence of 12% (Strain M-9) or 15% (*Tc. soyae*) NaCl, respectively, at 30°C, on a shaker.

(●) with NaCl, (○) without NaCl

A: Strain M-9, B: *Tc. soyae*

は小さくなり、また、各温度での T_L の比が一定であることから、培養温度は食塩存在下での生育に直接関与する因子とはならないことが明らかとなった。一方、*Tc. soyae* でも M-9 菌と同様の傾向を示すことが認められた (Fig. 8B)。

食塩による生育阻害を定量的に示す試みは少なく、一般に、生育度、生育速度、増殖曲線の追跡によって表されているが、松山^{7,8)}は *Escherichia coli* の食塩存在下での生育に及ぼす因子を誘導期の時間、最高生育度、生育速度などを指標にして検討している。先に示したように、食塩は細菌の対数期の増殖速度、あるいは誘導期の長さのいずれかに影響を与えと考えられ、使用する菌株によって対数増殖期の生育速度、あるいは誘導期の長さを指標として耐塩性の程度を示すことが適当と考えられる。

要 約

細菌の耐塩性に関して検討し次の結果を得た。

1. 一般の細菌は10%食塩存在下での生育によって (a) 食塩によって影響を受けない、(b) 増殖速度に影響を受ける、(c) 大部分の菌が死滅し、一部が適応的に耐塩性を獲得する、の少なくとも3つのタイプに分類し得ることが明らかとなった。

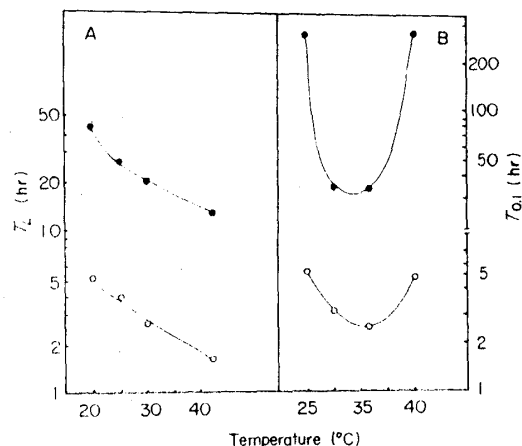


Fig. 8. Effect of temperature on the halotolerance of Strain M-9 and *Tc. soyae*.

The bacteria were cultivated at the indicated temperature in the presence or in the absence of 12% (Strain M-9) or 15% (*Tc. soyae*) NaCl.

(●) with NaCl, (○) without NaCl

A: Strain M-9, B: *Tc. soyae*

2. 細菌の耐塩性の程度を食塩に対する挙動をもとにして、増殖期の生育速度 (*Tetracoccus soyae*) あるいは誘導期の長さ (*Bacillus sp.* M-9) を指標にして定量的に示しうることを明らかにした。

3. *Bacillus sp.* M-9 では浸透圧、初発 pH, *Tetracoccus soyae* では初発 pH が耐塩性に影響を及ぼすことを認めた。

文 献

- 1) 大亦, 坂井, 笠井, 田島: 醸工, **54**, 1 (1976).
- 2) 大亦, 笠井, 坂井, 川崎: 醸工, **52**, 619 (1974).
- 3) 笠井, 坂井, 大亦: 醸工, **52**, 629 (1974).
- 4) Ingraham, M. A.: J. Bacteriol., **26**, 573 (1933).
- 5) Hoffman, C. E., Rahn, O.: J. Bacteriol., **47**, 177 (1940).
- 6) Tamiya, H., Yanagita, T., Suzuki, Y.: J. Penicillin, **1**, 257 (1947).
- 7) 松山: 農化, **28**, 299 (1952).
- 8) 松山: 農化, **28**, 305 (1952).

(昭51. 8. 6受付)