

地下岩塩中の微生物

亀 倉 正 博*

Microorganisms in Halite

Masahiro KAMEKURA *

Abstract

Extreme halophiles (halobacteria) are microorganisms that require a high concentration of NaCl for their optimal growth. They belong to the domain Archaea, together with methanogens and some thermophiles. It has been shown that halobacterial cells are entrapped within the fluid inclusions when NaCl crystallizes, and viable cells could be recovered after many months. Many halobacteria have been isolated from Permian halite, however, few studies are generally accepted due to questions about sample quality and contamination.

A recent report that a halophilic bacterium was isolated from a fluid inclusion within a primary salt crystal of the Permian (250 Ma) suggested again that previously reported isolations of halobacteria from Permian halite might be true. The requirement for elevated salt concentration, the probable ability to survive within low water activity environments for long period, and the presence of concentrated KCl in the cells, which is shown to protect DNA and proteins from harmful irradiation, makes halobacteria likely candidates for life on early Mars.

Key words : extreme halophile, halobacteria, solar salt, rock salt, halite, longevity

キーワード : 高度好塩菌, ハロバクテリア, 天日塩, 岩塩, ハライト, 長期生存

I. はじめに

塩（しお，以下食塩 NaCl と同義で使う）は海水，内陸の塩水泉，鉱物堆積層など地球上あらゆる場所に存在している。アリストテレスは海水が塩辛いのは「地上の物質のある部分」「焼けた土」が海の水に混ざっているせいだと考えた（Multhauf, 1978, p.144）。現在の大洋海水のえん分（ Li^+ , Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Cl^- , Br^- , SO_4^{2-} , HCO_3^- などの総和）は場所により若干の違いはあ

るが 34-36 g/L であり，そのうち NaCl は 78% を占める。では過去の海水はもっと薄かったのかそれとも濃かったか。32 億年前の海水は今の 1.5-2 倍濃かった（Knauth, 1998）が，20 億年前の海水は現在と変わりなかったという説もある（Kendall and Harwood, 1996）。2 億 5-6 千万年前のペルム紀（二疊紀）の海水組成は現在と変わりなかった（Horita *et al.*, 1991）と考えてよいようである。なぜ海水の主成分が NaCl となったのか？ 地球が形成された初期の段階で，炭酸イ

*（財）野田産業科学研究所

* Noda Institute for Scientific Research

オンを大量に含んだ水により岩石の成分が溶かし出され、マグマから供給される塩素イオンとの高温高压条件下での化学反応の結果として、 Na^+ と Cl^- が残されていくという壮大なシナリオについては MacIntyre (1970) を参照されたい。

海水から形成された岩塩 (rock salt) の結晶 (halite) 中に、好塩菌 (halophile) という、生存のために塩を好む微生物がいるということは 40 年以上前から報告されていた。多くの岩塩層が形成された 2 億 5 千万年前という遙か昔にトラップされた現在の好塩菌の祖先なのか？ だとしたらこのような長期間生き延びていられたメカニズムは？ これらに関する研究はいま人類が火星や、木星の衛星エウロパに求めている地球外生命の探索にも大きな影響を及ぼすであろう (McGenity *et al.*, 2000)。本稿では好塩菌の生態や岩塩の起源についてレビューした上で、岩塩中での好塩菌の長期にわたる生存の可能性について考察する。

II. 塩の生産

塩は食品工業やソーダ工業をはじめいたるところで使われている。現在世界中で年間約 1 億 8 千万トンの塩が生産されている。大部分は世界中に存在する岩塩層や塩湖などからの塩資源から採られており、海水からつくる天日塩 (solar salt) は約 1/4 である (たばこと塩の博物館, 2002: ホームページ参照)。2000 年の塩生産量の国別統計によるとアメリカが最大で 4551 万トン、中国 3128 万トン、ドイツ 1570 万トン、ついでインド、カナダと続き、日本は 137 万トンである。日本での総供給量は 953 万トンで、外国から 816 万トンも輸入している。主な輸入先はメキシコ、オーストラリアで 96% を占め、中国、インドと続く (塩事業センターホームページ参照)。

オーストリアのザルツブルグ、ポーランドのヴィーリツカ等をはじめアメリカ、ドイツ、チベット・ヒマラヤ、モンゴル、ロシアなど世界各地に、なかには厚さ数百メートルにも及ぶ大規模な地下岩塩層が存在し (Kaufmann, 1960; たばこと塩の博物館, 2002)、これらの国々の岩塩は日本国内でも販売されている。岩塩層のおおかたが形

成されたのは、超大陸 Pangaea が存在したペルム紀の後半から三畳紀の前半 (245–280 Ma 前) の時代だとされている (Javor, 1989, p.8)。 ^{40}Ar – ^{39}Ar 法、 $\delta^{34}\text{S}$ 法などの放射性同位体での年代推定と、岩塩中に認められる植物孢子の化石からも年代が推定できる (Kunte *et al.*, 2002)。岩塩の成分は産地によって異なり、純粋な NaCl に近い岩塩 (halite)、 NaCl と KCl の混ざったもの (potash)、 KCl を主成分とするカリ岩塩 (sylvite) 等がある。

塩の生産にとってヨルダンの死海、アメリカ・ユタ州の大塩湖をはじめ、アフリカ各地、中国、オーストラリア等世界各地の塩湖も大切な存在である。“高いえん濃度”といってもその起源の違いにより組成が違う。大塩湖は過去の海水に由来する (thalassic, ギリシャ語の海を意味する thalass 由来) ため高 Na^+ (105 g/L)、高 Cl^- (181 g/L)、低 Mg^{2+} (11 g/L) であるが、死海のえん分はヨルダン川の流入水由来 (athalassic) であり Na^+ (39 g/L) より Mg^{2+} の濃度が高い (42 g/L) (Javor, 1989, p.7)。南極の Don Juan pond は、 Na^+ が 11 g/L であるのに対し Ca^{2+} 濃度が 114 g/L と高いことで有名である。アフリカ大地溝帯には炭酸ナトリウムの多いアルカリ性の塩湖が多い。

岩塩、塩湖と並んで塩の供給源の一端を担っている天日塩は、広大な塩田に海水を引き込み、約 2 年かけて水分を太陽熱と風力で蒸発させ、食塩を結晶化させてつくられる。岩塩同様、世界中の天日塩も販売されている (新野ほか, 1999)。

III. 塩と微生物

ヒトは、食物を塩漬けにしておけば腐らずに保存できるということを太古の昔から知っていた。塩の中では通常の微生物は死んでしまうか増殖できないからである。しかしヒトの長い歴史のなかで微生物と正面から向い合ったのは、たった 320 年前オランダのレーウエンフックが自作の顕微鏡で目には見えない微生物の世界を明らかにしてからである。微生物 (1 ないし 10 μm という大きさ) は、その増殖に最適な NaCl 濃度 (1 M (molar, mole/L) は 58.4 g/L) を基準にすると次のような四つの範疇に分けられる (Kushner and

Kamekura, 1988)。(1) 最適食塩濃度が 0 ないし 0.2 M の非好塩菌。我々が口にする納豆菌や乳酸菌はこれに入る。(2) 最適食塩濃度が 0.2–0.5 M の低度好塩菌。海洋にいる細菌の多くはこの範疇に入ると考えられている。(3) 中度好塩菌の最適食塩濃度は 0.5–2.5 M。様々な含塩試料中から多数分離される。(4) 高度好塩菌。増殖最適食塩濃度は海水より数倍濃い 2.5 M ないし飽和 (310 g/L) であり、少なくとも 1.5 M 以上の NaCl を要求する好気性菌である。大部分は後述の古細菌に属する。NaCl を KCl で代替することはできない (亀倉, 1991, 1998; Kamekura, 2002; Oren, 2002)。(1) から (4) の各種微生物のうち、高度好塩菌を分離するには、2.5 M ないし飽和濃度の食塩と適当な Mg^{2+} を含有する、カザミノ酸と酵母エキス、またはペプトン添加培地、あるいは海水と同じ組成に種々の塩を溶かした 25% の塩溶液に酵母エキスを添加した培地に試料を入れ 37–40 °C で培養すると、赤またはオレンジ色の菌が生えてくる。同組成の寒天培地に塗布すればコロニーができる。

天日塩田に入ってきた海水の水分が太陽熱と風力で蒸発し、濃縮された海水が順次濃い塩の池に流れていくと、そこに棲息する微生物の相も変化していく。海水に多数いる *Pseudomonas*, *Vibrio* 等の海洋細菌からはじまり、次に *Flavobacterium*, *Alcaligenes* 等に属する中度好塩菌にとって替われ、食塩が結晶する直前の池では *Halobacterium* に代表される高度好塩菌が主になる (亀倉, 1988) (写真 1)。こうしてできた天日塩には好塩菌、特に高度好塩菌が大量に含まれている。世界各地から集めた天日塩のマイクロフローラを調べた例があるがそれによると、5 % 食塩寒天培地ではコロニーは全くできず、25% の培地で赤または淡赤色の高度好塩菌のコロニーが多数 ($2 \times 10^4 - 3 \times 10^5$ /g 塩) 得られた。また Mg^{2+} 含量の多い塩ほど菌数が多いという結果が見られた (亀倉, 1988; Nakashizuka and Arita, 1993)。一言付け加えるとすると、天日塩を口にすれば高度好塩菌の菌体を体内に入れることになるが、マウスで試験したところ毒性は全く認められなかつ

た (亀倉, 未発表データ)。

製塩を生業とする立場から見ると、単に濃縮最終段階の天日塩田に高度好塩菌がいるという以上に、これらの菌が食塩の結晶化を早めたり、大きな結晶を多数つくることなどの利点も指摘されている (McGenity *et al.*, 2000)。最終段階の塩田では高度好塩菌が優勢となるが、最近オーレン等はこちらから、系統的には古細菌ではなく真正細菌に分類されるが高度好塩性でかつ赤いカロチノイド色素を持つ *Salinibacter ruber* という菌を見出している (Oren *et al.*, 2002)。天日塩田では高純度の NaCl 結晶をつくるのが求められているわけだが、そのペースを支配する *Dunaliella* と、塩えび *Artemia* (体長 10 mm 程) の重要性については総説 (Tackaert and Sorgeloos, 1993) を参照されたい。なお、*Dunaliella*, *Artemia* などの真核生物をも含めた生物全ての系統関係については山岸 (1998) を参照されたい。

日本の製塩の歴史には上で述べたような天日塩田は登場しなかったが、各地に入浜 (いりはま) 式、揚浜 (あげはま) 式塩田があり、海水からかん水をつくり煮詰めて塩を採っていた (日本海水学会, 1981)。1972 年以降イオン交換膜と電気エネルギーを利用してかん水を採り、真空式蒸発缶で煮詰める製塩法に代わっている。従ってこうした国内産の塩には好塩菌はいない。なお、能登半島の仁江などに現在でも残っている揚浜式塩田 (片平, 1979) で使っている砂粒 (海水を撒いて蒸発させるために使われる) からは高度好塩菌が分離される。

IV. 塩湖にいる好塩菌

死海に生き物がいるかどうかは長い間科学者の興味の的であった。気体反応の法則を見出したフランスのゲー・リュサックは、死海の水を貰い受け微小な動物がいるのかどうか調べたが否定的であったと報告した (Gay-Lussac, 1819; 三宅, 1979)。その後長い間死海に生命はないと考えられていたが、1910 年代、塩蔵した魚や牛皮に赤い斑点をつくる高度好塩菌の研究がはじまり塩湖からも分離されてくると、死海にも科学のメスが入

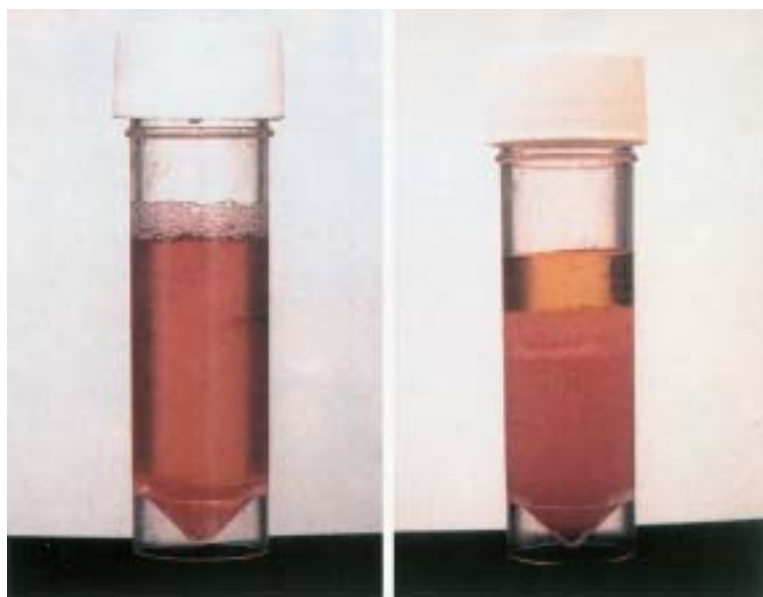


写真 1

左：食塩が析出する直前まで濃縮が進んだ天日塩田の液体。赤い高度好塩菌が増殖しているので赤く濁っている。

右：左の液体が更に濃縮され食塩が析出した後の様子。赤い高度好塩菌が食塩結晶内に取り込まれているのがわかる。

Photo 1

Left : Saltern liquor before the onset of halite precipitation.

Right : After halite precipitation. Halobacteria became entrapped within the halite.

(From Grant *et al.*, 1998; reproduced with permission)



写真 2 ヴリーランドらを選んだ岩塩結晶の一つ。3 × 3 × 1 cm 程の大きさ。結晶の内部に白い封入体 (i) が見える。

Photo 2 An example of rock salt selected for the isolation of halophile from the inclusion bodies (Vreeland, personal communication).



写真 3 新規高度好塩菌 *Halosimplex carlsbadense* の顕微鏡写真。左上のバーは5 μmを表す。

Photo 3 A micrograph of a novel extremely halophilic archaeon *Halosimplex carlsbadense*.

れられ、1936年には藻類やかん菌がいることが初めて報告された (Wilkansky, 1936)。そのすぐ後にヴォルカニは詳細な微生物学的調査を行い、塩蔵の魚や牛皮から分離され性質が明確にされていた *Halobacterium halobium*, *H. marismortui* という高度好塩菌や、好塩性の緑藻 *Dunaliella viridis* などが棲息していることを認めた (Volcani, 1944; 亀倉, 1998)。

上で述べた高度好塩菌のうち殆どの株は古細菌 (Archaea) に属し、Halobacteriales 目、Halobacteriaceae 科の 17 属に分類されている (Grant *et al.*, 2001; 亀倉, 2003)。このうち *Natrialba* 属のいくつかの株を除く全てが赤、ピンクまたはオレンジ色の色素を持っている。死海から分離された上記高度好塩菌 *H. marismortui* の菌体内イオン濃度を詳細に調べた論文があるが、それによると定常期の値として $0.5 \text{ mol Na}^+/\text{kg cell water}$, $3.8 \text{ mol K}^+/\text{kg cell water}$, $2.3 \text{ mol Cl}^-/\text{kg cell water}$ である。培地の K^+ 濃度は 10 mmol/kg water 程度であるので、菌体の内外で数 100 倍の K^+ イオンの濃度差があることになる。他の菌株についても測定が行われれば同様な値が得られている (亀倉, 1998; Oren, 2002, p.211)。多くの塩湖の微生物学的研究の成果は Javor (1989) にまとめられている。ではなぜ塩湖には必ず好塩性微生物がいるのかという疑問がわくが、好塩菌が繁茂している塩湖の湖畔で生じた好塩菌を付着あるいは封入した塩の微粒子が、風により、あるいは鳥類などの生き物により遠距離を運ばれて来る可能性が指摘されている (McGenity *et al.*, 2000)。

V. 岩塩層形成メカニズムの解明の歴史

デカルトは「哲学の原理」第 65 章で、大地のいろいろな部分に裂け目があって塩を含んでいる海水を通過させるのでそれが塩水泉の源になり、地上まで届かずに泉源になれないで裂け目の中に塩が取り残されたのが岩塩だと考えた (Multhauf, 1978, 144-145)。では近代科学は岩塩層形成のメカニズムをどのように解明したのかを振り返ってみることにする。

19 世紀に入ったヨーロッパ、アメリカでは、塩を求める科学的計画的探索が盛んに行われるようになり (Madsen, 1989; Litchfield *et al.*, 1995), かつ化学と地質学の発展が岩塩層の形成メカニズムの解明に大きな力となった。イタリアの化学者 ユジリオは次のような分析を行った。地中海の海水を静置して自然に水分を蒸発させると、全塩濃度が 7% になった時に炭酸カルシウムと少量の酸化鉄が沈殿し始める。17% になると炭酸マグネシウムと硫酸カルシウム (石膏) が現れ始め、25% では溶液の体積が 10 分の 1 強に減り、海水えん分の 78% を占める塩化ナトリウムが沈殿し始める。体積が 100 分の 1 近くになると、暖めてももはや蒸発しない母液となる。母液を冷やすと混合した塩の塊が沈積してくる。その組成は温度や湿度の違いによって変動するが、共通するのは硫酸マグネシウムと複塩の硫酸マグネシウム・カリウム $\text{K}_2\text{Mg}(\text{SO}_4)_2$ であった (Usiglio, 1849; Multhauf, 1978, p.161)。

その後 1870 年代にドイツのオクセニウスが岩塩層形成の問題に取り組んだ。彼は岩塩の起源を明らかにする際説明しなければならぬ三つの現象を列挙した。(1) 岩塩中には隣接する岩石と違って化石が見つからない点、(2) 岩塩には海水に比べマグネシウム塩とカリウム塩の少ないこと、(3) 無水石膏の「帽子 (cap rock)」が岩塩層を覆っていることが多いこと、である。計算上深さ 1000 m の海から厚さ 13-14 m 程の岩塩層しかできない (Handford, 1991; McGenity *et al.*, 2000)。とするならばアルプスにある数百メートルの岩塩層の形成には単純計算で 30000 m を超える海を干上げさせなければならないことになる。オクセニウスはユジリオの研究のなかに、この分厚い岩塩層形成の説明のための基礎があることを見てとり、湾が水平な砂州 (spit) により外海から部分的に遮断され、湾内の海水が蒸発して減った分だけ外海から海水が入ってくるとする場合の次のようなシナリオを書いた。「水分が蒸発、塩分が濃縮されると生物は砂州を越えて外に逃げる、だから生物の化石は存在しない。海水から炭酸マグネシウム、硫酸カルシウムと沈殿した後、塩分

の78%を占める食塩が結晶化して塩の層が出来上がる。その上には母液（硫酸マグネシウムと硫酸マグネシウム・カリウム）が残るが、食塩の結晶が湾の底と水面の高さを上昇させ母液は砂州を越えて外へ流出するであろう。その後しばらくは海水が湾内に流れ込み母液が流れ出ることが続くであろうが、最後には母液が水分の蒸発を抑え海面の高さが下がらず海水が流入しなくなり砂州は閉ざされ、最後の段階で蓄積した硫酸カルシウムが石膏として残る」(Ochsenius, 1888; Multhauf, 1978, 165-166)。

その後更に世界各地の岩塩層の地質学的化学的研究が積み重ねられ、オクセニウスの理論に修正が加えられた。ドイツの岩塩産地シュタッスフルトで行われたボーリング調査で260 mの深さまで掘ったところで、古くからあった塩水源(NaClが94%)からとは全く異なった組成のえん水(NaClは25%でKClとMgSO₄が多い)が湧出てきた。数年後に縦坑から固体サンプルが採られ分析の結果、KMgCl₃・6H₂Oという組成のサンプルはカーナライト(Carnallite), MgSO₄・H₂Oにはキーゼライト(Kieserite), 4KCl・4MgSO₄・11H₂Oという組成のサンプルにはカイナイト(Kainite)という名が付けられた(Kyle, 1991)。1905年には、最初のノーベル化学賞を受賞していたオランダの物理化学者ファント・ホッフが「海洋の塩沈積層の形成について」という本を出版した。この中で彼はいろいろな塩の混合液をつくり温度、時間、圧力を変えて沈殿してくる塩の組成を調べ、ある一定の条件でカーナライト、カイナイトが生成してくることを見出し、更にカイナイトを72°C以上に加熱するとキーゼライトとカリ岩塩シルヴァイト(KCl)が生成してくることを示した(Multhauf, 1978, p.197, 299)。こうして1907年ドイツの雑誌“Kali”の創刊号1ページでリーマンは、オクセニウス理論の最新版を以下のようにまとめている。「古生代の末、ドイツ全体は砂漠気候地帯に入っていたが、海面下にあり、その海はバーゼルからウイーンまで延びる砂州によって南の大洋から隔てられていた。この海が干し上がっていくにつれて塩類が、無水石膏

(anhydrite)、岩塩、ポリハライト(polyhalite)の順に沈積し、その後母液はオクセニウスが予言したような逆流を開始した。しかし母液がまだいくらか残っている間に砂州が閉じ、太陽熱がこのねばねばした液の温度を上げていくにつれキーゼライト、カーナライト、塩粘土が次々に沈積した。そのあとしばらくの間海洋の水が一時的に浸入したり、雨水が窪みにたまったりした結果として局地的な変化が生じたが、やがて大きな沈降が起こって、海洋の水が再び入り、もう一つの岩塩層、つまり「若い岩塩層」—ドイツ人はシュタッスフルトで見出される上部の層をこう呼んだ—を生み出した。このあと今度は隆起が起こり、新しい母液を外洋に流し出した。若い岩塩の地域にカリが乏しいわけはこのことから説明される。この隆起は数千メートルの高さに達するまでつづき、その間に塩の沈積層は水平なままではいられなくなり、山の背や谷を作り多くが逆転した。カリ塩の一部は変性作用を受けてキーゼライト、固い塩、その他の二次的生成物を作り出した。そして最終的に、この乾いた不毛の風景は、もっと魅力的な堆積物の下に埋められて、現代ドイツの風景を形成することになった。」(Multhauf, 1978, 200-201)(図1)。Haliteが結晶するためには相対湿度が昼夜を問わず常時70-80%以下、Sylvite形成には70%以下でなければならない(Kendall and Harwood, 1996)ことを考えるといかに乾燥した条件が必要かが理解できる。

ちなみに、岩塩層が地殻変動や火山活動などにより更に地下深く閉じ込められ高い圧力を受けると、温度が上昇し、200°C以上になると流動性を帯び、圧力の低いところを通して上に伸び、岩塩ドーム(salt dome)と呼ばれる塩の柱が形成される(Kyle and Posey, 1991)。その存在は、アメリカのメキシコ湾の海面下から南部のテキサス、ルイジアナ、ミシシッピ州にかけた地域、アフリカのチュニジア、アルジェリアにかけての地域などで知られている。

以上のようなシナリオで岩塩層が形成されたと考えられている(Handford, 1991; Warren, 1991)。この説を証明するかのような事例として

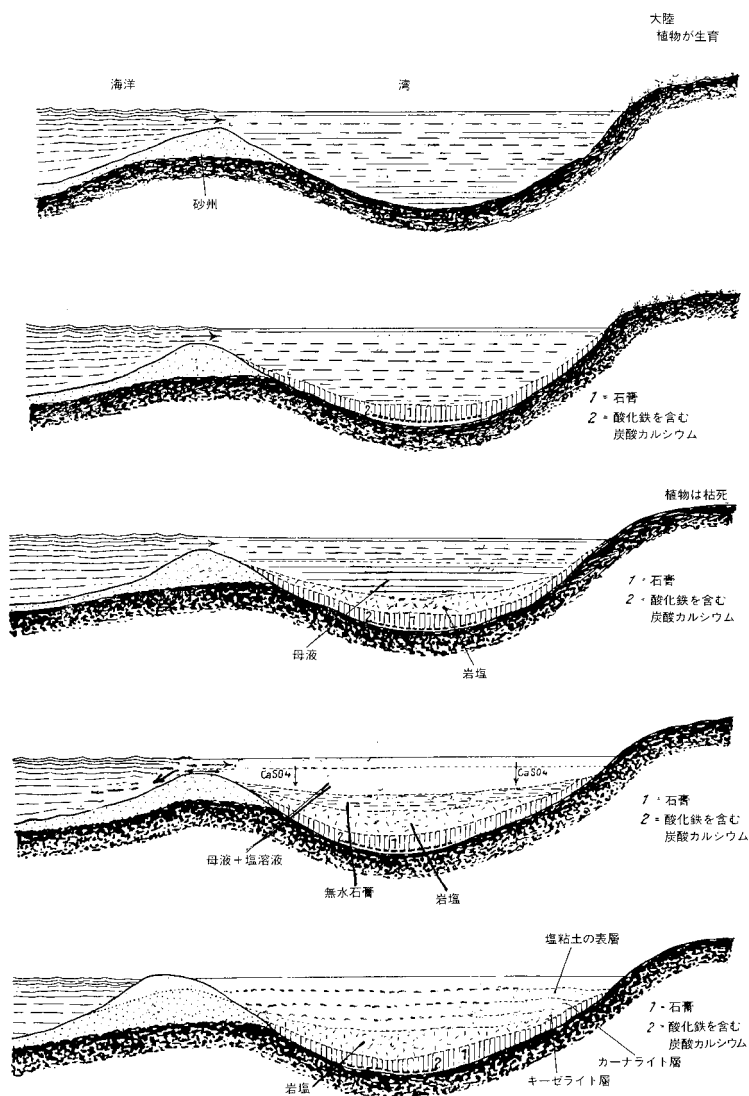


図 1 岩塩形成過程を説明するオクセニウス理論の図解。
上から順に各段階を示す。

- 1) 海洋の水が砂州を乗り越えて絶えず湾に流れ込み、水が蒸発して塩分が濃くなる。
- 2) 塩濃度が高くなると炭酸カルシウムと酸化鉄が沈殿。比重が 1.129 になると石膏が沈殿する。
- 3) 比重が 1.218 あたりで岩塩（石膏を含んだ塩化ナトリウム）が沈殿を始める。
- 4) 海水の流入が続く一方、母液の一部が流出するようになり、岩塩の上に無水石膏が沈殿する。
- 5) 砂州が閉じ、母液からカリ塩が沈殿し始める。

Fig. 1 Ochsensus' theory of rock salt formation. (Modified from Fig.75 of Multhauf, 1978)

有名なのが塩湖カスピ海の中央部東岸に位置する Kara-Bogaz-Gol 湾である。海拔下 28 m のカスピ海と砂州で隔てられたこの湾は、カスピ海よりも更に 3 m も低く、砂州に開いている狭い海峡で結ばれている (Kara-Bogaz-Gol 湾についてのホームページ参照)。縦 160 km、幅 137 km という広大な湾だが、深さは数メートルで塩濃度は 350 g/L で、底には塩が堆積している。1980 年に海峡にダムが建設され、湾内に入るカスピ海の水の量をコントロールするようになったのでオクセニウス理論通りにことは進行しないだろうが、人の手が入らなければいずれ岩塩層を形成するのかもしれない。なお、過去の内陸性塩湖が干上がって塩の層が形成された場所は世界中に無数に存在している (Smoot and Lowenstein, 1991)。アフリカ・マリ共和国のサハラ砂漠中の集落タウデニにある岩塩鉱床では、地下数十センチに厚さ 20 cm の岩塩層が 3 層水平に産出する (片平, 2002) が、これは太古の塩湖が単純に干上がったものと理解しているのかもしれない。

VI. 岩塩から分離されてきた好塩菌

ここまで塩湖に高度好塩菌が棲んでいること、海水が濃縮されて食塩の結晶が析出する直前の天日塩田池は赤い色をした高度好塩菌の「天然培養液」だということを見てきた。では海水から形成された岩塩には好塩菌はいるのだろうか。1960 年代初めから、岩塩の結晶中から中度好塩菌 *Bacillus circulans* や高度好塩菌を単離したとの報告が続いている (Dombrowski, 1963; Tasche, 1963; Vreeland and Huval, 1991)。筆者も市販の岩塩や、ネパールで入手した岩塩から高度好塩菌が分離されることを確認している。

岩塩結晶 (halite) の水分含量は 0.1 ないし 1.0% だとされており (Roedder, 1984)、石英結晶等と同じように多数の液体封入体 (fluid inclusion) が認められる。上記の結果は、この封入体の中で生き長らえている好塩菌を分離しようという試みの成果である。英国のチェシャーの岩塩 (ハライト) とクリーブランドのカリ岩塩 (potash) から *Haloarcula*, *Halococcus* や *Halo-*

rubrum 属の幾種類もの高度好塩菌を分離したという報告 (Norton et al., 1993) や、オーストラリアのペルム紀の地下 650 m にある岩塩から *Halococcus* spp. を単離したという報告 (Stan-Lotter et al., 2002) などもある。カリ岩塩には多かれ少なかれ岩塩が混在しており、純粋な KCl の結晶中から高度好塩菌を分離したという報告はまだ無い。これらの“分離”報告に対しては、岩塩層のある地帯の地上にある塩湖から、高度好塩菌を含んだ塩水が比較的最近になって岩塩層の裂け目にしみ込んで結晶化し、その際トラップされた好塩菌を拾ってきたのではないか、あるいは掘り出した結晶の表面の殺菌が十分でなかったのでは、表面に付着していた好塩菌が増殖してきたのではという疑問が呈されている。一個のバクテリア細胞の年代を推定する技術はないという問題もあり、決定的な証拠はなかなか出せないというのが本当のところであろう。

英国・レスター大学のグラント等のグループは食塩が結晶する時に何が起るのか観察し次のような報告をした (Norton and Grant, 1988)。いろいろな種類の高度好塩菌 (*Halobacterium*, *Haloarcula*, *Halococcus*, *Haloferax*, *Halorubrum*, *Natrialba*, *Natronobacterium*, *Natronococcus* 等) 40 株の飽和食塩水懸濁液 20 ml をペトリ皿に入れ 37°C で乾燥させると 12-18 時間後に NaCl が結晶してきた。顕微鏡で観察すると、*Halococcus* の 6 株のうち 2 株を除いて、結晶中にできる幅 1 ないし 40 μm の液体封入体に菌がトラップされることがわかった。この結晶を取り出し試験管中室温暗所で 6 か月放置後、エタノールで 24 時間処理後、培地に戻してやると元の高度好塩菌が増殖してきた。菌は生きていた。III 章でも述べたが、高度好塩菌を混ぜていない飽和食塩水と比べると、菌がいるほうが 24-28 時間早く結晶が形成された。*Halobacterium salinarum* CCM 2090 の菌体濃度 4×10^6 から 4×10^8 の範囲では、死菌 (1% formaldehyde 処理)・生菌にかかわらず結晶開始時間、結晶の数などに差は認められなかった。

株によって差はあるが、好塩菌の多くが乾燥状

態で数十年以上生き長らえることは菌株保存機関などで通常確認されることである。筆者も採取後何年も経た天日塩から中度、高度を問わず好塩菌が容易に分離されることを経験している。前出ヴォルカニが採取しガラスびん中で密封、室温に57年間保存した死海の水から、何属にもわたる多種類の高度好塩菌を分離できたという報告がある(Arahal *et al.*, 1996)。しかし、液体状で、しかも数 μm という微小空間でこの先何千何万年もの時間生きていけるのかはまだ答えの出ない問題である。なお、実際の岩塩の封入体えん溶液の組成を調べてみると、当然のことながら K^+ と SO_4^{2-} が多いというデータがある(山中, 2001)。

VII. アメリカ WIPP の岩塩から見つかった 2 億 5 千万年前の好塩菌

発電、工業生産、自然科学研究、医療など人類の様々な活動に伴い放射性廃棄物が搬出されている。ウラン鉱石を精錬濃縮しウラン燃料とし核分裂反応でエネルギーを取り出すと、元の燃料の1億倍もの放射能を持つ生成物が生じ高レベル放射性廃棄物となる。これらの放射性廃棄物の放射能レベルが元のウラン鉱石のレベルまで戻るのは10万年後、ウラン燃料のレベルまで戻るのは300万年後になる。人類が作ってしまったこの高レベル放射性廃棄物を今後数十万年にわたって人間環境から隔離しなければならない。しかし人類がこれまでに考え出した最高品質の容器でもせいぜい数百年の保証しかできないとされている。こうして現在、放射性廃棄物をいかに長期間にわたって安全に隔離するかが大問題となっている(中島, 1973; 村上ほか, 2003)。

その対策の一つとして考え出されたのが地下岩塩層への隔離である。1955年国連が開催した「原子力発電と核燃料サイクルに関する国際会議」で、アメリカ科学アカデミーが高レベル放射性廃棄物の岩塩層への処分を提案したのが事の始まりである。1970年アメリカ原子力委員会(現エネルギー省)がカンサス州のライオンズ岩塩層を選択したが、地質学者から岩塩層にも水分がありいずれは環境に放射能が出てきて安全ではないという指摘

があり、また近くに石油、天然ガスなどが埋蔵していることも明らかになったために、この計画は挫折した(中島, 1973; 田城, 1999)。これにかわって、1975年にエネルギー省はニューメキシコ州カールスバッドの東40 kmの地を調査し、1981年にボーリングを開始、1989年には地下650 mの岩塩層に放射性廃棄物を搬入し長期にわたって貯蔵する地下埋蔵施設「廃棄物隔離パイロットプラント」(Waste Isolation Pilot Plant, WIPP)の建設を完了した(田城, 1999)。

このペルム紀 Salado 層中の岩塩層は周囲の地層に含まれていた微小な化石や鉱物から、約2億5千万年前の塩から成ることが知られていた。ペンシルヴァニア州ウェストチェスター大学のヴァリーランドのグループはこの間、岩塩層にいる高度好塩菌がどの程度の生物活性を持っているかの調査に携わった。上述のように容器はいずれは壊れて内容物が出てきて岩塩中の好塩菌と接触することになる。廃棄物の85%を占める汚染紙類のセルロースを岩塩中の好塩菌が分解するのかどうかを調べるため、まず岩塩サンプルを多数集め好塩菌の数を測定した。その結果、削岩後の時間やヒトの出入りの多少とは相関がなく、全く菌が検出されないサンプルもあれば、1グラムの岩塩あたり10000個の好塩菌が検出されたサンプルもあった。場所によっては大部分が赤色の高度好塩菌であったり、別の個所では無色の好塩性の真正細菌が優勢であったりしたが、多くの分離株がセルロース繊維に付着してシュウ酸、ピルビン酸などの有機酸に分解する活性を持っていることが判明した(Vreeland and Huval, 1991; Vreeland *et al.*, 1998)。好塩菌の持っている酵素は高濃度の塩存在下で安定で、かつ高い活性を示す(Kamekura, 1986; Kushner and Kamekura, 1988; 亀倉・山岸, 1998)ことは、廃棄物中の固形有機物といえども一旦好塩菌に触れると水溶性低分子に分解される可能性があることを示唆している。

その後ヴァリーランド等は結晶の内部から好塩菌を分離することに挑戦した(Vreeland and Powers, 1999)。彼らは、 ^{40}Ar - ^{39}Ar 法による年代

測定で2億5千万年前に形成されたことが確認されている Salado 層 (Renne *et al.*, 2001) から、きめ細かい結晶構造と沈殿物の特徴から判断して、一旦結晶が形成された後に何らかの原因で溶けた塩水が再結晶したものではないと判断できる結晶を選び出した (写真 2)。表面を 10N 塩酸と苛性ソーダで洗って滅菌した後、微小な封入体から塩水を無菌的に抽出、培養したところ、53 個の結晶から得た封入体塩水のうち 2 つから増殖を認めた。菌体から DNA を抽出して 16S リボソーム RNA 遺伝子の塩基配列を調べた結果、高度好塩菌ではなかったが真正細菌の中度好塩菌 *Bacillus marismortui* や *Virgibacillus pantothenticus* に近縁な株であったと報告した (Vreeland *et al.*, 2000)。これは日本の新聞報道などで話題になった。それまで最長寿記録は 2500-3000 万年前のこはくに閉じ込められていた絶滅種のはな蜂から分離された胞子を形成する真正細菌 *Bacillus sphaericus* であったから (Cano and Borucki, 1995) 一挙に記録を 10 倍に伸ばしたことになる、不死身のバクテリアということができない (Parkes, 2000)。岩塩層形成理論によれば海水が濃縮され食塩が結晶化して塩の層ができたわけだが、前出“Kali”創刊号でリーマンがまとめたオクセニウス理論 (Multhaus, 1978, 200-201) に次のパラグラフを追加すると更に完成度の高い理論になるともいえる。「濃縮海水中で好塩菌が増殖し、塩が結晶化する時封入体中に好塩菌が閉じ込められ、その後岩塩層の中で長い眠りについた」。

しかし、この発表に対して批判的な評価をする論文も出されている (Grauer and Pupko, 2001; Hazen *et al.*, 2001; Nickle *et al.*, 2002)。結晶の生成年代に対する疑問、2 億 5000 万年前の菌にしては DNA の塩基配列が現世の *Bacillus marismortui* (現在は *Salibacillus* 属に変更された) とあまりにも似過ぎている点、などである。高度好塩菌には胞子の存在は知られていない。ある高度好塩菌は代謝活動が休止状態にあるシスト (嚢子) 様の構造をとるとする報告もあるが、その好塩菌がどの程度長く生きられるのかのデータは

無い。

筆者とヴリーランド等のグループは最近、同じ WIPP の岩塩から、通常微生物の培養に使う有機物、アミノ酸、糖類、酵母エキス等から成る培地では全く増殖せず、窒素源としてアンモニアだけ、炭素源として酢酸とグリセリン、ピルビン酸とグリセリン、あるいはピルビン酸単独でのみ増殖する高度好塩菌を分離した。系統分類の結果、既知の高度好塩菌とは異なる新属の株だと判明し、*Halosimplex carlsbadense* と命名した (Vreeland *et al.*, 2002) (写真 3)。このような奇妙な性質が何を意味するのか、どのようにして生きているのか、岩塩ができた時に封じ込められたのかどうか、などはこれからの研究課題である。

VIII. 日本国内に地下岩塩層はあるのか？ そこに好塩菌は？

日本国内に地下岩塩層はないとされている。しかしその存在を示唆するような現象はいくつかある。長野県下伊那郡大鹿村、南アルプス塩見岳の麓にある鹿塩 (かしお) 温泉の源泉はえん分 4% と海水より濃く、鹿が塩を舐めに来る塩泉がいくつもある。温泉の北 1 km には日本列島を東西に走る大断層である中央構造線が通っている。1875 年、黒部銑次郎はドイツ人科学者ワグネルゴットフリートの助言を受け岩塩の掘削に乗り出した。塩井の水をくみ出して釜で煮詰め「山塩」を作る製塩業を営みながら岩塩発見に執念をみせたが、1909 年の文部省・大蔵省・農商務省の合同調査で岩塩の存在は認められないという報告書が提出されて、黒部の夢は終わったという歴史がある (田中, 2001)。

では鹿塩温泉の源泉はどこから来るのか。塩泉は地下にある原水と通常の真水地下水が混ざり合い湧出してくるため原水は海水よりかなり濃いはずである。鹿塩温泉源泉水は海水と比べてカリウム、マグネシウム、硫酸イオンが少ないという、岩塩と似た組成を示す (大鹿村中央構造線博物館ホームページ参照)。一方、兵庫県の有馬温泉では更に高濃度の塩泉が知られている。酒井等によると (酒井・松久, 1996, p.106) 酸素・水素同位

体比の測定から有馬温泉水は塩濃度の高い特異な深部熱水と天水起源の地下水との混合によりつくられたということもできる。しかし大阪府河内長野の石仏や、中央構造線に沿った鹿塩の温泉水の化学組成と酸素同位体比が有馬温泉水と同じことから、必ずしも高温のマグマ活動に結びつかず、むしろ油田やガス田を形成する堆積盆の厚い地層中に見られる高塩濃度の深層地下水が、断層線にそって上昇してきたものではないかという考え方もあるそうである。しかしこの高濃度塩水の起源は未解明である（益田ほか, 1988）。この地下水には好塩菌はいるのか？ 今後の研究課題である。

さて日本国内にも静岡県 の相良、新潟県の頸城、新津、南阿賀、南長岡、山形県の酒田、秋田県の八橋、申川など、小規模ながら油田がいくつか知られている。少なくともある種の石油源（Type IIS ケロジェン）の生成と岩塩層とのかかわりが指摘されている（Hite and Anders, 1991; Aizenshtat *et al.*, 1999）。また、NEDO（新エネルギー・産業技術総合開発機構）のプロジェクト、Deep-Seated Geothermal Resource Survey の調査報告（ホームページ参照）によると、岩手県・葛根田（かっこんだ）地熱発電所の岩盤を 3727 m まで掘り下げた時に出てくる液体は高濃度の塩素イオンを含有しており、サンプリング中に NaCl が析出してくるとのことである。

北アメリカ大陸に埋蔵されている膨大な岩塩層の中で最初に発見されたのは、ルイジアナ州の沖合いに浮かぶアベリー島のものである。140 年以上にわたって採掘が続けられているこの岩塩層も元々はアメリカ先住民が使っていた塩泉としてしか知られていなかった（Litchfield *et al.*, 1995）。ヨーロッパの多くの岩塩も鹿塩のように塩泉を起源とし、削岩により発見されたものが多い。現在の日本列島には 6 億年前までさかのぼる地質記録があるが、日本列島の起源、進化についての最新の解説（磯, 2000）に接すると、日本のどこかに規模は小さいにしても地下岩塩層が埋蔵されている可能性はあるのではないかと考える。そしてそのどこかに高度好塩菌が眠っているのではないだろうか。しかし、アメリカには地下塩水が最も

近い岩塩から数十マイルも離れて存在しているという例もあるので、採掘は困難かもしれない（Kaufmann, 1960, p.35）。また、上記葛根田坑底の温度は 500°C を超えている（産業技術総合研究所・アジア地熱研究グループ佐脇貴幸氏からの私信）ので好塩菌はいないであろう。

IX. 岩塩層、火星での高度好塩菌長期生存の可能性

高度好塩菌は岩塩中で何千万年間も生き長らえることができるのであろうか。核酸やタンパク質の分解が修復を上回れば細胞は死ぬ。DNA の加水分解、酸化、メチル化を修復するエネルギー源をどこに求めるかは重大な問題だが fluid inclusion が岩塩結晶中で徐々に移動して、塩に取り込まれている有機物を摂取し続けることができるのかもしれない。

多くの研究者の考察（Sneath, 1962; Dean *et al.*, 1993; Lindahl, 1993; Tahei *et al.*, 2002）をまとめると以下のように結論できる。IV 章で述べたように細胞内に 4 molar を超える KCl を蓄積するが、0.0118% 含まれる放射性同位体 ^{40}K からベータ崩壊と電子捕獲崩壊で放出される放射線が致死量になるには 10^9 年かかるという計算になる。高度好塩菌 *Halobacterium salinarum* に放射線耐性があることは以前から知られている（Shahmohammadi *et al.*, 1998）。4 molar という高濃度の KCl 存在下では、DNA の脱プリン化が起こりづらい。高濃度食塩中では酵素タンパク質（ここでは malate dehydrogenase を使った）や transfer RNA の安定性が増す。このように考察してみると岩塩層での高度好塩菌の長期生存の可能性は十分あるといつてよいのではないだろうか（Grant *et al.*, 1998）。

一方、火星に生命の痕跡を求める研究が進んでいる（Brack and Pillinger, 1998; Kunte *et al.*, 2002）。太陽系の星の中で水が存在する可能性があるのは火星と木星の衛星エウロパだといわれ、火星表面には大量の水が流れた後があるとされている。火星は塩類に富んだ環境で、現在の火星に水があるとすれば高濃度塩水として存在し、少な

くとも日中の太陽光線が射す間は溶液状の水として存在するであろう (Landis, 2001)。火星の Vastitas Borealis (Widespread lowlands) の Noachian Ocean という但地に塩が堆積しているという説が唱えられている (Wynn-Williams *et al.*, 2001)。1998 年にアメリカ・テキサスに落下した 47 億年前のコンドライト隕石 “Monahans (1998)” の内部に径 3 mm 程のハライトの結晶が見出された。これほど大きいハライトが隕石から見つかったのは初めてだそうである。このハライト内部に液体封入体が多数確認され、 Na^+ 、 K^+ のほか Fe^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 等のイオンが高濃度で存在している可能性が指摘されている (Zolensky *et al.*, 1999) が、このハライトと太古の高度好塩菌を結びつけることは無理であろうか。Dundas (1998) は生命の初期進化が高濃度塩環境で進んだのではと考察している。

火星の生命痕跡探索のモデル地として、南極大陸にある低温の高濃度塩水環境が注目されている。Vestfold Hills の Deep Lake は、高塩濃度 (28% salinity) のため -28.3°C まで凍らないことが知られているが、この湖から耐塩性のシアノバクテリア *Oscillatoria*, *Nostoc*, 緑藻 *Dunaliella*, そして高度好塩菌 *Halorubrum lacusprofundi* が分離されている (Javor, 1989, p.252; Wynn-Williams *et al.*, 2001)。火星という低温・真空・高放射線という宇宙空間で高度好塩菌が生き延びていけるのであろうか。NASA-Ames Research Center の Macinelli *et al.* (1998) によると、高度好塩菌の *Haloarcula* 属と好塩性の *Synechococcus* sp. の分離株をロシアのスペースカプセルに乗せ、15 日間宇宙空間にさらした後で生存率を測定したところ、*Bacillus* の孢子に次ぐ高い値を示した。1984 年に南極大陸で発見された火星からの隕石 ALH84001 に、過去の火星に生命体が存在した可能性が見出されたことを引用し、彼等は大胆にも、太古の昔火星で生まれた好塩性の生命が地球に飛来した、あるいは逆に太古の地球で生まれた好塩性の生命が火星に飛んで行った可能性に言及している。こうして火星にいた (いる?) 生物は好塩菌であろうと見る人は多いのである

(Litchfield, 1998; Landis, 2001)。

X. おわりに

ここまで岩塩中の微生物について考察してきた。今後、かなうならば以下のような実験をやってみたい。海水を無菌ろ過し、高度好塩菌が生き続ける濃度まで濃縮したところで、Norton 等が行ったようにいろいろな高度好塩菌を懸濁、更に濃縮を進めて塩を結晶化させ菌体を inclusion body にトラップさせる。ここでできた結晶を取り出し、いくつかの結晶中の菌数を測定する。残りは密封し室温に保存、10 年、20 年後に再度菌数を測定、残りはそのまま保存、30 年、50 年には後を託した子供と孫が、100 年後には玄孫が再度測定。こうしてどういう種類の高度好塩菌がどのくらい生き長らえることができるのか、確かな確度で推定できると思われる。研究費は少しでいい。必要なのは数世代にも渡る飽く事なき好奇心である。

本特集号の他の解説にも見られるように、極限環境生命についての研究は日本の研究者の貢献が大きい分野だが、今後一層の発展のためには異なる分野の研究者の協力が欠かせないと痛感する。

謝 辞

本論中、岩塩層の形成に関する記述は R.P. Multhauf 氏の著書 “*Neptune's Gift*” (1978) に負うところが大きい。引用にあたって市場泰男氏による翻訳書『塩の世界史』平凡社 (1989) の訳文を一部改変して使わせて頂いた。感謝致します。

文 献

- Aizenshtat, Z., Miloslavski, I., Ashengrau, D. and Oren, A. (1999): Hypersaline depositional environments and their relation to oil generation. In Oren, A. ed.: *Microbiology and Biogeochemistry of Hypersaline Environments*. CRC Press, 89-108.
- Arahal, D.R., Dewhirst, F.E., Paster, B.J., Volcani, B.E. and Ventosa, A. (1996): Phylogenetic analyses of some extremely halophilic Archaea isolated from Dead Seawater, determined on the basis of their 16S rRNA sequences. *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**, 3779-3786.
- Brack, A. and Pillinger, C.T. (1998): Life on Mars: Chemical arguments and clues from Martian meteorites. *Extremophiles*, **2**, 313-319.
- Cano, R.J. and Borucki, M.K. (1995): Revival and

- identification of bacterial spores in 25- to 40-million-year-old Dominican amber. *Science*, **268**, 1060-1064.
- Dean, R.T., Gieseg, S. and Davies, M.J. (1993): Reactive species and their accumulation on radical-damaged proteins. *Trends Biochem. Sci.*, **18**, 437-441.
- Dombrowski, H. (1963): Bacteria from paleozoic salt deposits. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **108**, 453-460.
- Dundas, I. (1998): Was the environment for primordial life hypersaline? *Extremophiles*, **2**, 375-377.
- Gay-Lussac, J.L. (1819): Analyse de l'eau de la mer Morte. *Annales Chim. Phys.*, **11**, 195-197.
- Grant, W.D., Gemmell, R.T. and McGenity, T.J. (1998): Halobacteria: The evidence for longevity. *Extremophiles*, **2**, 279-287.
- Grant, W.D., Kamekura, M., McGenity, T.J. and Ventosa, A. (2001): Class III. Halobacteria class nov. In Boone, D.R. and Castenholz, R.W. eds.: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Second ed. Vol. 1. 294-301.
- Graur, D. and Pupko, T. (2001): The Permian bacterium that isn't. *Mol. Biol. Evol.*, **18**, 1143-1146.
- Handford, C.R. (1991): Marginal marine halite: Sabkhas and salinas. In Melvin, J.L. ed.: *Evaporites, Petroleum and Mineral Resources*. Elsevier, 1-66.
- Hazen, R.M., Roedder, E., Powers, D.W., Vreeland, R.H. and Rosenzweig, W.D. (2001): How old are bacteria from the Permian age? / Reply. *Nature*, **411**, 155-156.
- Hite, R.J. and Anders, D.E. (1991): Petroleum and evaporites. In Melvin, J.L. ed.: *Evaporites, Petroleum and Mineral Resources*. Elsevier, 349-411.
- Horita, J., Friedman, T.J., Lazar, B. and Holland, H.D. (1991): The composition of Permian seawater. *Geochim. Cosmochim. Acta*, **55**, 417-432.
- 磯 行雄 (2000): 日本列島の起源, 進化, そして未来. *科学*, **70**, 133-145.
- Javor, B. (1989): *Hypersaline Environments. Microbiology and Biogeochemistry*. Springer-Verlag.
- 片平 孝 (1979): 塩 海からきた宝石. あかね書房.
- 片平 孝 (2002): タウデニ塩床. *日経サイエンス*, **11**, 20-21.
- Kamekura, M. (1986): Production and function of enzymes of eubacterial halophiles. *FEMS Microbiol. Rev.*, **39**, 145-150.
- 亀倉正博 (1988): 塩分による選択. *微生物*, **4**, 123-131.
- 亀倉正博 (1991): 好塩菌の分離と培養. 大島泰郎監修: 極限環境微生物ハンドブック. サイエンスフォーラム, 331-342.
- 亀倉正博 (1998): 高度好塩菌. 古賀洋介・亀倉正博編: 古細菌の生物学. 東京大学出版会, 61-76.
- Kamekura, M. (2002): Halophiles: Aerobic halophilic microorganisms. In Bitton, G. ed.: *Encyclopedia of Environmental Microbiology*. Wiley, 1501-1512.
- 亀倉正博 (2003): 古細菌の系統分類. 鈴木昭憲・荒井綜一編: 農芸化学の事典. 朝倉書店, 22-25.
- 亀倉正博・山岸明彦 (1998): 酵素. 古賀洋介・亀倉正博編: 古細菌の生物学. 東京大学出版会, 239-257.
- Kaufmann, D.W. (1960): *Sodium Chloride. The Production and Properties of Salt and Brine*. Reinhold Publishing Co. ソルトサイエンス研究財団監訳 (1993): 塩化ナトリウム.
- Kendall, A.C. and Harwood, G.M. (1996): Marine evaporites: Arid shorelines and basins. In Reading, H.G. ed.: *Sedimentary Environments: Processes, Facies and Stratigraphy. Third ed.* Blackwell Science Ltd., 281-324.
- Knauth, L.P. (1998): Salinity history of the Earth's early ocean. *Nature*, **395**, 554-555.
- Kunte, H.J., Trueper, H.G. and Stan-Lotter, H. (2002): Halophilic microorganisms. In Horneck, G. and Baumstark-Khan, C. eds.: *Astrobiology - The Quest for the Conditions of Life*. Springer, 185-200.
- Kushner, D.J. and Kamekura, M. (1988): Physiology of halophilic eubacteria. In Rodriguez-Valera, F. ed.: *Halophilic Bacteria*. CRC Press, 109-138.
- Kyle, J.R. (1991): Evaporites, evaporitic processes and mineral resources. In Melvin, J.L. ed.: *Evaporites, Petroleum and Mineral Resources*. Elsevier, 477-533.
- Kyle, J.R. and Posey, H.H. (1991): Halokinesis, cap rock development, and salt dome mineral resources. In Melvin, J.L. ed.: *Evaporites, Petroleum and Mineral Resources*. Elsevier, 413-474.
- Landis, G.A. (2001): Martian Water: Are there extant halobacteria on Mars? *Astrobiology*, **1**, 161-164.
- Lindahl, T. (1993): Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature*, **362**, 709-715.
- Litchfield, C.D. (1998): Survival strategies for microorganisms in hypersaline environments and their relevance to life on early Mars. *Meteoritics Planet. Sci.*, **33**, 813-819.
- Litchfield, C.D., Bertram, B. and Kupfer, R.L. (1995): Avery Island, Louisiana: The first rock salt mine in the United States. *J. Salt-History*, **3**, 101-119.
- MacIntyre, F. (1970): Why the sea is salt. *Scient. Amer.*, **223**(5), 104-115.
- Madsen, B.D. (1989): *Exploring the Great Salt Lake - The Stansbury Expedition of 1849-50*. University of Utah Press.
- Mancinelli, R.L., White, M.R. and Rothschild, L.J. (1998): Biopan-survival I: Exposure of the osmophiles *Synechococcus* sp. (Nageli) and *Halorcula* sp. to the space environment. *Adv. Space*

- Res., **22**, 327-334.
- 益田晴恵・橋爪 伝・酒井 均 (1988): 鹿塩地域に湧出する塩水の季節変動とその要因について. 地球化学, **22**, 149-156.
- McGenity, T.J., Gemmell, R.T., Grant, W.D. and Stan-Lotter, H. (2000): Origins of halophilic microorganisms in ancient salt deposits. *Environ. Microbiol.*, **2**, 243-250.
- 三宅泰雄 (1979): 死海の水を探る. 自然, **11**, 50-58.
- Multhauf, R.P. (1978): *Neptune's Gift. A History of Common Salt*. The Johns Hopkins University Press.
- 村上由記・岩月輝希・長沼 毅: 東濃地域における地下水化学と地下微生物の相互作用. 地学雑誌, **112**, 277-287.
- 中島篤之助 (1973): 放射性廃棄物処理処分の現状 I, II. 科学, **43**, 501-507; 703-712.
- Nakashizuka, M. and Arita, M. (1993): Characteristics of halophilic bacteria in solar salts. In Kakihana, H., Hardy, H.R. Jr., Hoshi, T. and Toyokura, K. eds.: *Seventh Symposium on Salt*. Elsevier Science Publ. B.V., Vol.1, 665-669.
- Nickle, D.C., Learn, G.H., Rain, M.W., Mullins, J.I. and Mittler, J.E. (2002): Curiously modern DNA for a "250 million-year-old" bacterium. *J. Mol. Evol.*, **54**, 134-137.
- 新野 靖・西村ひとみ・古賀明洋・篠原富男・伊藤浩士 (1999): 市販食塩の品質. 日本調理科学会誌, **32**, 133-144.
- 日本海水学会編 (1981): 海水資源の利用. 日本海水学会.
- Norton, C.F. and Grant, W.D. (1988): Survival of halobacteria within fluid inclusions in salt crystals. *J. Gen. Microbiol.*, **134**, 1365-1373.
- Norton, C.F., McGenity, T.J. and Grant, W.D. (1993): Archaeal halophiles (halobacteria) from two British salt mines. *J. Gen. Microbiol.*, **139**, 1077-1081.
- Ochsenius, C. (1888): On the formation of rock-salt beds and mother-liquor salts. *Proc. Acad. Natl. Sci., Philadelphia*, **40**, 181-187.
- Oren, A. (2002): *Halophilic microorganisms and their environments*. Kluwer Academic Publishers.
- Oren, A., Heldal, M., Norland, S. and Galinski, E.A. (2002): Intracellular ion and organic solute concentrations of the extremely halophilic bacterium *Halobacterium ruber*. *Extremophiles*, **6**, 491-498.
- Parkes, R.J. (2000): A case of bacterial immortality? *Nature*, **407**, 844-845.
- Renne, P.R., Sharp, W.D., Montanez, I.P., Becker, T.A. and Zierenberg, R.A. (2001): $^{40}\text{Ar}/^{39}\text{Ar}$ dating of Late Permian evaporites, southeastern New Mexico, USA. *Earth Planet. Sci. Lett.*, **193**, 539-547.
- Roedder, E. (1984): The fluid in salt. *Amer. Mineralogist*, **69**, 413-439.
- 酒井 均・松久幸敬 (1996): 安定同位体地球化学. 東京大学出版会.
- Shahmohammadi, H.R., Asgarani, E., Terato, H., Saito, T., Ohyama, Y., Gekko, K., Yamamoto, O. and Ide, H. (1998): Protective roles of bacterioruberin and intracellular KCl in the resistance of *Halobacterium salinarum* against DNA-damaging agents. *J. Radiat. Res. (Tokyo)*, **39**, 251-262.
- Smoot, J.P. and Lowenstein, T.K. (1991): Depositional environments of non-marine evaporites. In Melvin, J.L. ed.: *Evaporites, Petroleum and Mineral Resources*. Elsevier, 189-347.
- Sneath, P.H.A. (1962): Longevity of micro-organisms. *Nature*, **195**, 643-646.
- Stan-Lotter, H., Pfaffenhuemer, M., Legat, A., Buss, H.-J., Radax, C. and Gruber, C. (2002): *Halococcus dombrowskii* sp. nov., an archaeal isolate from a Permian alpine salt deposit. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **52**, 1807-1814.
- たばこと塩の博物館 (2002): たばこと塩の博物館 冊子. たばこと塩の博物館.
- Tackaert, W. and Sorgeloos, P. (1993): The use of brine shrimp *Artemia* in biological management of solar saltworks. In Kakihana, H., Hardy, H.R. Jr., Hoshi, T. and Toyokura, K. eds.: *Seventh Symposium on Salt*. Elsevier Science Publ. B.V., Vol.1, 617-622.
- 田中奈津子 (2001): 鹿塩温泉, 塩事業センター広報誌 Salt 21, No.7, 20-23.
- Tasche, P. (1963): Dead and viable fossil bacteria. *Univ. Wichita Bull.*, **56**, 3-7.
- 田城 明 (1999): ルポ 米の放射性廃棄物隔離プラント. 中国新聞 5月25日記事 (中国新聞ホームページより).
- Tehei, M., Franzetti, B., Maurel, M.-C., Vergne, J., Hountondji, C. and Zaccai, G. (2002): The search for traces of life: The protective effect of salt on biological macromolecules. *Extremophiles*, **6**, 427-430.
- Usiglio, M.J. (1849): Études sur la composition de l'eau de la Méditerranée et sur l'exploitation des sels qu'elle contient. *Annales Chim. Phys.*, Ser 3, **27**, 172-191.
- Volcani, B. (1944): *Studies on the Microflora of the Dead Sea*. Ph.D. Thesis in Hebrew.
- Vreeland, R.H. and Huval, J.H. (1991): Phenotypic characterization of halophilic bacteria from ground water sources in the United States. In Rodriguez-Valera, F. ed.: *General and Applied Aspects of Halophilic Microorganisms*. Plenum Press, 53-60.
- Vreeland, R.H. and Powers, D.W. (1999): Considerations for microbiological sampling of crystals from ancient salt formations. In Oren, A. ed.: *Microbiology and Biogeochemistry of Hypersaline Environments*. CRC Press, 53-73.
- Vreeland, R.H., Piselli Jr, A.F., McDonnough, S.

- and Meyers, S.S. (1998): Distribution and diversity of halophilic bacteria in a subsurface salt formation. *Extremophiles*, **2**, 321-331.
- Vreeland, R.H., Rosenzweig, W.D. and Powers, D.W. (2000): Isolation of a 250 million-year-old halotolerant bacterium from a primary salt crystal. *Nature*, **407**, 897-900.
- Vreeland, R.H., Straight, S., Krammes, J., Dougherty, K., Rosenzweig, W.D. and Kamekura, M. (2002): *Halosimplex carlsbadense* gen. nov., sp. nov., a unique halophilic archaeon, with three 16S rRNA genes, that grows only in defined medium with glycerol and acetate or pyruvate. *Extremophiles*, **6**, 445-452.
- Warren, J.K. (1991): Sulfate dominated sea-marginal and platform evaporative settings. In Melvin, J.L. ed.: *Evaporites, Petroleum and Mineral Resources*. Elsevier, 69-187.
- Wilkensky, B. (1936): Life in the Dead Sea. *Nature*, **138**, 467.
- Wynn-Williams, D.D., Cabrol, N.A., Grin, E.A., Haberle, R.M. and Stoker, C.R. (2001): Brines in seepage channels as eluants for subsurface relict biomolecules on Mars? *Astrobiology*, **1**, 165-184.
- 山岸明彦 (1998): 生物の系統関係と共通の祖先. 古賀洋介・亀倉正博編: 古細菌の生物学. 東京大学出版会, 16-39.
- 山中弘久 (2001): 塩の純度と夾雑物 結晶に閉じ込められた母液. (財)塩事業センター編: 塩なんでも Q&A. 271-275.
- Zolensky, M.E., Bodnar, R.J., Gibson Jr., E.K., Nyquist, L.E., Reese, Y., Shih, C.-Y. and Wiesmann, H. (1999): Asteroidal water within fluid inclusion-bearing halite in an H5 chondrite, Monahans (1998). *Science*, **285**, 1377-1379.

参照 URL

- 中国新聞記事: <http://www.chugoku-np.co.jp/abom/99abom/rufo/toku.html>
- Deep-Seated Geothermal Resource Survey: <http://www.ieageo.or.jp/nepro.htm>
- Kara-Bogaz-Gol 湾: <http://edcwww.cr.usgs.gov/earthshots/slow/KBG/KBG>
- 大鹿村中央構造線博物館: <http://www.iidanet.or.jp/~kozosen/>
- 塩事業センター: <http://www.shiojigyo.com/data/index.html>
- たばこと塩の博物館: <http://www.jtnet.ad.jp/WWW/JT/museum/WelcomeJ.html>

(2003 年 1 月 27 日受付, 2003 年 3 月 24 日受理)