新島および大島におけるくさや汁の微生物相^{*1}

藤 井 建 夫

(1977 年 7 月 18 日受理)

Microbial Flora of "Kusaya" Brine of Niijima and Oshima Islands

Tateo FUJII^{*2}

The microbial flora of the *kusaya* brine was studied in samples obtained from manufacturers in Niijima and Oshima Islands. The classification of bacteria at the genus level was performed on 144 strains from Niijima Island and 107 strains from Oshima Island. No significant difference in the bacterial flora was observed between these brines, though molds were isolated only from Niijima samples. Bacteria of genus *Corynebacterium* (about 56% of total isolates) which formed minute colonies on nutrient agar plate were the most predominant in the brine followed by bacteria of genus *Pseudomonas* (about 22-37% of total isolates). As the characteristic organisms in the brine, bacteria of genus *Spirillum* were isolated from all samples in small numbers.

くさやの味や保存性のよさを究明するために、前報¹⁾ではまず、新島および大島のくさや加工場4カ所より採集したくさや汁についてその成分を調べた。本報では、これらのくさや汁に多数存在している微生物の役割について検討するため、両島のくさや汁の微生物相について検討を行なった。

実験材料および方法

用いたくさや汁は、新島の加工場M、N、および大島の加工場O、Pで採集した4種類で、前報¹⁾で用いたものと同一の試料である。

くさや汁の直接検鏡は、M、N、O、Pの4試料について、いずれも採集後3日以内に行なった。

微生物の分離は、MおよびOの2試料について、前報で生菌数測定に用いた0.8%食塩加BPG寒天培地(pH 7.5)、5%食塩加BPG寒天培地(pH 7.5)および5%食塩加サブロー寒天培地(pH 6.0)上の一定区画中の全コロニーを釣菌して行なった。糸状菌の分離は、M、N、O、Pの各試料を直接、5%食塩加サブロー培地(pH 6.0)に塗抹し、25°Cで培養することにより行なった。

分離株の検査には必要に応じ、2.5% NaCl および0.25% MgSO₄·7H₂Oを添加した培地を用い、常法²⁾に従って、形態、グラム染色、鞭毛の配列、糖の利用性、オキシダーゼ活性、カタラーゼ活性、ゼラチン分解能、硝酸塩還元能、アンモニア、硫化水素、トリメチルアミ

ン³⁾の生成能について行ない、清水の分類図式⁴⁾およびBergey's Manual 第8版⁵⁾を参考にして属レベルでの分類を行なった。

分離株の電子顕微鏡観察は、2.5%食塩加BPG寒天斜面(pH 7.5)で、20°C、48時間培養後、2.5%グルタルアルデヒド固定した菌体について、透過型電子顕微鏡JEM-50B(日本電子)により行なった。

結果および考察

新島および大島で採集した4種のくさや汁を直接検鏡したところ、いずれのくさや汁においても、多くの球菌

Plate 1. Micrograph of microorganisms in *kusaya* brine obtained at Niijima Island (flagellar stain preparation of the brine). Bar indicates 50 μ .

^{*1} くさやに関する研究—II (Studies on "Kusaya"—II)。東海区水産研究所業績B第638号。本稿の要旨は昭和51年度日本水産学会秋季大会(下関)において発表した。

^{*2} 東海区水産研究所(Tokai Regional Fisheries Research Laboratory, Kachidoki, Chuo-ku, Tokyo)。

Table 1. Morphological and biochemical properties of strains isolated from *kusaya* brines of Niijima and Oshima Islands*

Spore formation	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Gram stain	+	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—
Shape	R	R	C	C	C	R	R	R	R	R	H
Motility	—	—	—	—	—	+	+	—	+	—	+
Flagellation	—	—	—	—	—	P	P	—	P	—	B
Hugh & Leifson's test	—	—	F	F	—	—	—	—	—	—	—
Growth on nutrient agar	+	—	+	+	+	+	—	+	+	+	+
Oxidase	—	v	+	v	v	+	+	+	+	—	+
Catalase	+	—	+	—	+	+	+	+	+	+	+
Pigmentation	—	—	+	v	v	—	—	—	+	+	—
Reduction of NO ₃	—	—	—	v	+	+	+	v	+	v	+
Production of NH ₃	—	N	—	+	+	v	—	+	+	v	v
Production of H ₂ S	—	N	—	v	v	—	—	—	+	v	—
Production of TMA	—	N	+	v	—	+	—	—	+	+	—
Hydrolysis of gelatin	+	N	+	v	—	—	—	—	—	+	—
Group	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI
Number of strains	4	136	4	9	3	43	30	12	2	3	5

* +=positive, —=negative, v=variable among strains, R=rod, C=coccus, H=helical, P=polar flagellum, B=bipolar tufts of flagella, F=fermentative, N=not tested.

Table 2. Numbers of isolates from BPG agar plate (0.8% NaCl and 5% NaCl) and Sabouraud agar plate (5% NaCl)

Medium for isolation	Genus	Niijima		Oshima	
		Normal*	Small*	Normal*	Small*
BPG agar (0.8% NaCl)	<i>Corynebacterium</i>		22		22
	<i>Pseudomonas</i>	25	13	2	17
	<i>Moraxella</i>	3		7	
	<i>Micrococcus</i>	2		1	
	<i>Staphylococcus</i>	1		1	
	<i>Spirillum</i>	2			
BPG agar (5% NaCl)	<i>Corynebacterium</i>		57		35
	<i>Pseudomonas</i>	13		3	
	<i>Moraxella</i>			1	
	<i>Flavobacterium</i>			2	
	<i>Staphylococcus</i>			2	
	<i>Streptococcus</i>			6	
	<i>Spirillum</i>	1		2	
Sabouraud agar (5% NaCl)	<i>Corynebacterium</i>	3		1	
	<i>Moraxella</i>			1	
	<i>Flavobacterium</i>			3	
	<i>Streptococcus</i>	2		1	

* Normal: normal-sized colonies on the agar medium.
Small: small colonies on the agar medium.

や桿菌の他に活発に運動する螺旋菌が多数認められるのが特徴であつた。これらの螺旋菌は Plate 1 に示すように、菌体の両端に鞭毛を有し、大きさは幅 0.5 μ 、長さ 4~30 μ 程度であり、全菌数に占める割合はいずれの試

料においても 2~10% 程度と推定された。

新島くさや汁からの分離株 144 株、大島くさや汁からの分離株 107 株の内訳は、孢子非形成のグラム染色陽性桿菌が 140 株、グラム染色陰性の桿菌が 90 株、球菌が

Table 3. Bacterial flora of *kusaya* brine of Niijima and Oshima Islands

Genus	Niijima	Oshima
<i>Corynebacterium</i>	56.8%	56.4%
<i>Pseudomonas</i>	36.7	21.8
<i>Moraxella</i>	2.2	7.9
<i>Flavobacterium</i>	0	2.0
<i>Micrococcus</i>	1.4	1.0
<i>Staphylococcus</i>	0.7	3.0
<i>Streptococcus</i>	0	5.9
<i>Spirillum</i>	2.2	2.0

16 株、螺旋菌が 5 株であつた。これらは分類学的性質により、Table 1 に示すように I～XI の 11 群に大別された。これらを清水の図式および Bergey's Manual を参考にして同定した結果、I、II 群は *Corynebacterium*、III 群は *Staphylococcus*、IV 群は *Streptococcus*、V 群は *Micrococcus*、VI、VII 群は *Pseudomonas*、VIII 群は *Moraxella*、IX、X 群は *Flavobacterium*、XI 群は *Spirillum* 属に該当するものであつた。

Table 2 には各微生物群ごとの分離株数を分離培地の種類および同培地上での発育の程度に従つてまとめた。また、Table 3 にはこれら微生物群の出現率を、各培地上での生菌数¹⁾に基づいて算出して示した。新島および大島いずれのくさや汁においても、その中の微生物組成の約 56% が *Corynebacterium* であつたが、これらはすべて分離培地上では直径 1 mm 以下の微小なコロニーしか形成しないものであつた。また *Pseudomonas* の内の 25 (新島)～77% (大島) のものではコロニーの大きさが、*Corynebacterium* よりはやや大きく平板上ではそれと識別が可能であつたが、いずれにしてもこれらは微小なコロニーしか形成しないものであつた。両島のくさや汁から分離された螺旋菌は、鞭毛染色による観察では Plate 1 にみられるのと同様、両端に 1 本ずつの鞭毛を有していると思われた。しかし WILLIAMS ら⁶⁾は、両極束鞭毛を有する螺旋菌の中には鞭毛染色では多数の鞭毛が寄り集つて 1 本の鞭毛のように見えるものがあるため電顕観察の必要性を述べている。そこで、本報で分離された螺旋菌についても電顕を用いて観察した結果、その 1 例を Plate 2 に示すように、これらは両極に数本ずつの鞭毛を有する *Spirillum* 属のものであることが認められた。

なお、新島のくさや汁 (M, N) からは、Table 4 に示すように、*Penicillium*、*Aspergillus* および未同定の糸状菌が計 6 株分離されたが、大島のくさや汁からは分離されなかつた。新島の加工場の地下タンクに貯蔵されているくさや汁では、糸状菌の集落が“あく”様の浮上物と混在した状態で表層を覆っているのが認められたの

Plate 2. Electron micrograph of *Spirillum* (strain M 16) isolated from *kusaya* brine obtained at Niijima Island. Bar indicates 5 μ .**Table 4.** Molds isolated from *kusaya* brine

Sample	Genus	No. of strains
M	<i>Penicillium</i>	2
	<i>Aspergillus</i>	1
	Not identified	1
N	<i>Penicillium</i>	2
O		(Not isolated)
P		(Not isolated)

で、これらの糸状菌の現存量はかなり多いものと推察される。

くさや汁の微生物についてはこれまでに、町田⁷⁾、SIMIDU ら⁸⁾、加藤ら⁹⁾による報告がある。町田は 2 種のくさや汁より、10% 食塩肉汁を用いて耐塩細菌とみられる桿菌や球菌のほか、甲乙 2 種的好塩菌の存在を認めているが、その内の甲種は、5～15% 食塩存在下で最もよく発育し、その形態は特異であたかも混合培養の観があり、円形、橢円形、桿状、球状、酵母形、「トルラ」形等種々の形態を有し、活発に運動するものであつたと述べている。

SIMIDU らは新島で採集したくさや汁の微生物相について調べた結果、 10^7 cells/ml の総菌数の内、その 90% 以上が分離平板上で微小なコロニーしか形成しない好塩性の *Corynebacterium* であり、残りは通常の大きさのコロニーを形成する微生物群で、その内訳は *Pseudomonas* 10 株、*Achromobacter* 5 株、*Flavobacterium* 1 株、*Corynebacterium* 5 株、*Micrococcus* 3 株、未同定 1 株であつたと述べている。本報での結果はこの SIMIDU らの結果とよく似た傾向を示している。

これに反し、加藤らは新島と大島で採集したくさや汁

から 11 株の細菌を分離し, *Citrobacter* 2 株, *Micrococcus* 2 株, *Peptococcus* 1 株, *Bacillus* 4 株, *Clostridium* 1 株, *Sporosarcina* 1 株を報告しており, これらの細菌がくさや汁の中で優位的に微生物群集を構成していると推定しているが, 用いたくさや汁の pH が 8~8.5 と高く, また総菌数が $10^2 \sim 10^6$ cells/ml と低く, 菌株の分離方法などが不明であるなどの点で直接本報の結果と比較することはできなかつた。しかし, これらの細菌のほかに螺旋菌の存在を示唆している点は注目に値すると思われる。また, これとは別に大場ら* もくさや汁から数株の螺旋菌を分離しているが, いずれもまだ詳細には報告されていない。

従来, 食品との関連で螺旋菌が報告された例としては, 小崎ら¹⁰⁾, WATANABE¹¹⁾, TERASAKI¹²⁻¹⁴⁾ によるものがある程度で, 螺旋菌に関する最近の総説¹⁵⁾でも他に例は見当たらないようである。小崎らは, 塩度の高いしろりの表皮と肉質の間に発生した白斑点や古いべつたら漬の濃厚液から螺旋菌を得ているが, これは汚染菌であると述べている。WATANABE も海産二枚貝の内臓から好塩性の螺旋菌を分離している。また, TERASAKI も淡水産貝類や海産貝類の腐敗液から螺旋菌を分離しているが, これらは貝類固有のフローラではなく, それに付着した泥に由来するものであろうと述べている¹⁰⁾。これらに対し, 本報で分離された螺旋菌はくさや汁に常在のフローラと考えられる点で注目すべきと思われる。

上にも述べたように本報での結果から, くさや汁の微生物相について次のような特徴が明らかになった。すなわち, (1) 新島, 大島いずれのくさや汁においても優勢菌株は, *Corynebacterium* および *Pseudomonas* であり, 両者で全菌株の約 80~90% を占めていたこと, (2) これらの *Corynebacterium* の全菌株と *Pseudomonas* のかなりの菌株が, 分離培地上では微小なコロニーしか形成しないものであつたこと, (3) いずれのくさや汁にも螺旋菌が認められ, これらがくさや汁に常在の微生物群と考えられること, (4) 新島のくさや汁からは数株の糸状菌が分離されたが, 大島のくさや汁からは分離されなかつたこと, などである。これらの微生物の役割や在存の意味については今後検討するつもりである。

要 約

新島および大島のくさや加工場から採集したくさや汁の微生物相について調べ, つぎのことを明らかにした。

1. 両島の試料の細菌相の間には顕著な差異はみられず, 優勢菌株はいずれの場合も *Corynebacterium* (約 56%) および *Pseudomonas* (22~37%) であつた。
2. いずれの試料からも数株ずつ分離された *Spirillum* はくさや汁に特徴的な微生物群と考えられる。
3. 新島のくさや汁からは *Penicillium*, *Aspergillus* および未同定の糸状菌が分離されたが, 大島のくさや汁からは分離されなかつた。

終りに, 本稿のご校閲をいただいた京都大学農学部部門田元教授ならびに東海区水産研究所横関源延博士に感謝する。

文 献

- 1) 藤井建夫: 日水誌, **43**, 517-521 (1977).
- 2) W. F. HARRIGAN and M. E. McCANCE: Laboratory Methods in Food and Dairy Microbiology, Academic Press, London, New York and San Francisco, 1976, pp. 452.
- 3) R. A. LAYCOCK and L. W. REGIER: *J. Fish. Res. Bd. Canada*, **28**, 305-309 (1971).
- 4) 清水 潮: 食品微生物学(相磯和嘉ら編), 医歯薬出版, 東京, 1976, p. 12.
- 5) R. E. BUCHANAN and N. E. GIBBONS (ed.): Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8th ed., The Williams & Wilkins Company, Baltimore, 1974, pp. 1246.
- 6) M. A. WILLIAMS and G. B. CHAPMANN: *J. Bacteriol.*, **81**, 195-203 (1961).
- 7) 町田咲吉: 水産学会報, **1**, 111-127 (1915).
- 8) U. SIMIDU, K. AISO, W. SIMIDU, and A. MOCHIZUKI: *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **35**, 109-115 (1969).
- 9) 加藤英八郎・伊藤 寛・中野政弘: 明大農研究報告, **36**, 13-22 (1976).
- 10) 小崎道雄: モダンメディカ, **17**, 573-584 (1971).
- 11) N. WATANABE: *Bot. Mag. Tokyo*, **72**, 77-86 (1959).
- 12) Y. TERASAKI: *Bot. Mag. Tokyo*, **74**, 220-227 (1960).
- 13) Y. TERASAKI: *Bot. Mag. Tokyo*, **74**, 79-85 (1961).
- 14) Y. TERASAKI: *Bull. Suzugamine Women's Coll., Nat. Sci.*, **10**, 1-10 (1963).
- 15) N. R. KRIEG: *Bacteriol. Rev.*, **40**, 55-115 (1976).
- 16) Y. TERASAKI: *Bull. Suzugamine Women's Coll., Nat. Sci.*, **15**, 1-7 (1970).

* 大場 浩ら: 未発表。