

沖縄の発酵食品とマングローブ等の微生物

常盤豊*1、世嘉良宏斗

人々の生活と海の微生物との関わりを知るため、沖縄の発酵食品とマングローブ等の微生物について調べた。高塩分のスクの塩辛（スクガラス）からは、数は少ないが *Bacillus* 属の細菌を分離した。カツオ塩辛の微生物数は多く、*Tetragenococcus* 属の好塩性乳酸菌が優占していた。ミキからは、*Enterococcus* 属のアルカリ耐性乳酸菌を多く分離した。一方、沖縄のマングローブからは比較的多くの微生物が分離できた。宮古島のマングローブからは、*Bacillus* 属の細菌が多く、また、*Exiguobacterium* 属や *Oceanobacillus* 属の好アルカリ性乳酸菌も分離できた。しかし、マングローブやサンゴ礁海域から分離されたビブリオ科の細菌は、スクガラスやカツオ塩辛、ミキからは分離されなかった。

1 はじめに

海洋環境に生きている微生物の中で、培養できるものは、一般に1%以下であると言われている。その理由の一つとして、海洋の微生物は、栄養源の非常に少ない貧栄養環境に進化、適応しており、一般的な栄養培地では生育できないために、分離や培養ができないと考えられている。

我々は人々の生活と海の微生物との関わりを理解するため、一般的な栄養培地に生育してくる海の微生物に注目し、研究を行っている。すでに、国の重要無形文化財に指定されている沖縄県大宜味村塩屋湾のウンガミ（海神祭）に使われるミキ（神酒）や伝統染織に広く使われている藍染め液には、一般的な栄養培地に生育する海洋由来の微生物が関与していることを示した^{1,2)}。

また、亜熱帯のサンゴ礁海域には、一般的な栄養培地で増殖が速い好アルカリ性乳酸菌群が広く分布していることも報告した^{3,4)}。

ここでは、沖縄の発酵食品である南城市奥武島産の塩辛「スクガラス」、宮古島市伊良部島産のカツオ塩辛と粟を原料としたミキに関わる微生物について検討を行った。

また、宮古島市の島尻マングローブやウブカマングローブ、沖縄本島のマングローブの微生物についても検討し、発酵食品の微生物との比較を行った。

2 実験方法

2-1 培地組成および分析機器

本研究で用いた「一般的な栄養培地」の組成は、蒸留水 1L に対して、ペプトン 5g、酵母エキス 10g、酢酸ナトリウム 1.5g、リン酸水素二カリウム 1.5g、リン酸二水素カリウム 1.5g、硫酸マグネシウム 0.2g、モリブデン(VI)酸二ナトリウム二水和物 0.5mg、タングステン(VI)酸ナトリウム二水和物 0.5mg、硫酸マンガン(II)五水和物 0.5mg、グルコース 20g とした。pH は水酸化ナトリウ

ムと炭酸-重炭酸緩衝液を用いて調整した。平板培地は上述の培地に寒天 15g を加えて固めたものを用いた。

HPLC 分析は、送液システム (Waters 600 controller)、オートサンプラー (Waters 717 plus Autosampler)、カラムオープン (Waters CHM)、脱気システム (Waters SDM)、RI 検出器 (Waters 410 Differential Refractometer)、UV 検出器 (Shimadzu SPD-6AV)、イオン交換カラム (Bio-Rad Aminex HPX-87H, 7.8×300mm) を用いて行った。

分光光度計は、UV/VIS Spectrophotometer V-550 (日本分光) を使用した。

2-2 塩辛およびミキの採取

スクガラス（アイゴの塩辛）は、沖縄県南城市の奥武島で 2010 年 8 月 10 日、9 月 8 日および 2012 年 7 月 19 日に漁獲したスク（アイゴの稚魚）を塩もみして、その重量の半分の塩を加えて漬け込んでいたものを港の鮮魚店で入手した。

市販のスクガラスとしては、スクと食塩ととうがらしを原料とした大城海産物加工所（沖縄県豊見城市）製の 2011 年産「沖縄県産あみあいご」（賞味期限 2013 年 7 月 5 日）を 2012 年 8 月 16 日に使用した。

宮古市伊良部島の「かつおの塩辛」（山口商店）は、かつおの腹の皮を泡盛と塩で漬け込んだものであり、2013 年 10 月 21 日に宮古島空港で購入したものをを用いた。

スズキ目ヒメジ科のカタカシは、2013 年 2 月 17 日に本部港で釣り上げ、同日中に腸を採取して 5°C で保存し、翌朝に分離作業を行った。

宮古市伊良部島産のミキは、2013 年 11 月 7 日に粟を粥状にして自家用に発酵させて作られたものを 5 日後に使用した。

2-3 マングローブの水および底泥の採取

宮古島市の島尻マングローブ域の試料は、2013 年 10

*1 元任期付研究員

月3日17時のほぼ満潮時に採取して、5日間低温保存した後使用した。

宮古島市のウピカマングローブ域の試料は、2013年10月4日10時のほぼ干潮時に採取して、4日間低温保存した後使用した。

沖縄本島うるま市州崎のマングローブ域の水(水深1.5m、pH8.0)および底泥(水分50.9%)試料は、2014年1月24日午前に採取し、直ちに使用した。また、沖縄本島の億首川河口、大浦湾および慶佐次湾のマングローブ試料は、2013年5月11日に採取して2日間低温保存した後、使用した。

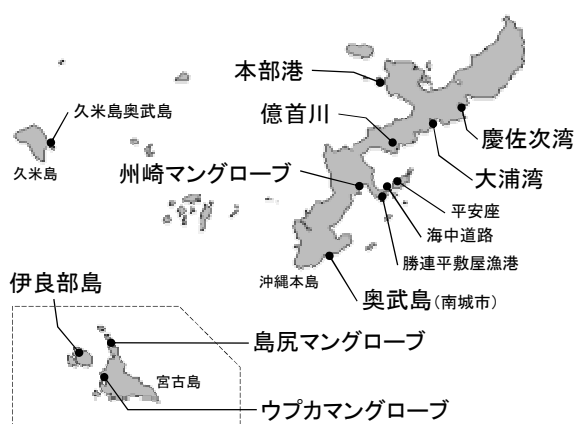


図1 試料の採取場所

2-4 微生物の特性の検討

奥武島産スクガラス、伊良部島産のカツオ塩辛やミキ、マングローブ域やサンゴ海域の微生物の特性は、「一般的な栄養培地」として、グルコース2%、酵母エキス1%、ペプトン0.5%および無機塩類(あるいは海水)を含む基本培地からなる寒天平板を用いて、好氣的、微好氣的あるいは嫌氣的に30℃で数日間培養して検討した。さらに具体的には、採取した発酵食品やマングローブ域、サンゴ海域の試料を滅菌した0.85%塩化ナトリウム水で希釈し、pH7とpH10に調製した寒天平板培地にそれぞれ0.1mlずつ塗布して30℃で数日間培養した後、形成された微生物のコロニー(集落)を計数することにより検討した。なお、マングローブ域の底泥や魚の腸の試料については、湿重量1gを滅菌した0.85%塩化ナトリウム水10mlで懸濁したものを10倍希釈試料として便宜的に扱い、微生物の数を計数した。

微好気および嫌氣性微生物については、寒天平板を酸素吸収・炭酸ガス発生剤とともにそれぞれアネロパック・微好気(三菱ガス化学製)、アネロパウチ・ケンキ(三菱ガス化学製)に入れて、密封して30℃で数日間培養してから、コロニーを計数した。コロニー数は、試料1ml

当たりのコロニー形成単位(c.f.u./ml)で表した。

2-5 分離菌株の16S rRNA系統解析

寒天培地または液体培地で培養した分離株の菌体をprepGEM bacteria (ZyGEM)で処理してから遠心分離し、上清を分け取ってDNA粗抽出液とした。これをBacterial 16S rDNA PCR Kit (タカラバイオ)のPCR用反応試薬およびプライマーミックス試薬と混合してサーマルサイクラー(BIO-RAD, MyCycler)でPCR処理することにより、16S rRNA遺伝子領域を増幅した。得られたPCR産物はNucleoSpin Extract II (MACHEREY-NAGEL)で精製し、チップ型電気泳動装置(Agilent, Bioanalyzer 2100)で純度および収量を確認した。16S rRNA遺伝子のうち解析した上流側約500bpの塩基配列について、BLASTプログラムを用いてデータベース(DDBJ/EMBL/GenBank)上の配列と相同性検索を行い、細菌の種類を推定した。

2-6 酢酸、乳酸などの有機酸の測定

発酵食品の有機酸や微生物の代謝産物はHPLCにより分析した。

3 実験結果および考察

3-1 奥武島産塩辛(スクガラス)の微生物の特性

沖縄には、500年以上の歴史を持つとも言われる特産品として、亜熱帯サンゴ礁海域に生息するスク(アイゴの稚魚)の塩辛(スクガラス)がある。スクは外洋でプランクトンを食べて成長し、夏季の大潮の前後に限って満ち潮に乗ってサンゴ礁にやってくる。サンゴ礁内で海藻を食べ始める前のスクを、1カ月から1年ほど塩漬けたのがスクガラスである。スクガラスの漬け汁は、秋田県の「しょつる」やタイの「ナムプラー」などの伝統的魚醤と同じようにしても使われる。

そこで、図2に示した、沖縄県南城市の亜熱帯サンゴ礁に囲まれた奥武島のスクガラスの漬け汁の微生物相の特性について検討した。

奥武島産スクガラスの漬け汁の微生物の特性を表1に示した。約2~3ヶ月間、塩漬けたスクの漬け汁は、乳酸やコハク酸などの有機酸を含み、やや酸性(pH5.3)であった。スクガラスの呈味成分は、スクの自己消化により生成してくるグルタミン酸などの遊離アミノ酸と思われるが、有機酸や香りなどには微生物の関与も考えられる。

寒天平板上にコロニーを形成した漬け汁の微生物の数(c.f.u./ml)は、高い塩濃度のためになかなか少なかった。スクを79日間漬けた場合の微生物の数は、寒天平板培地をpH7およびpH10に調整して好気培養するとそれぞれ



図2 沖縄県南城市の奥武島産のスクガラス

5.5 × 10³、2.0 × 10¹、また、嫌気培養すると pH 7 および pH10 でそれぞれ 1.0 × 10¹、4.7 × 10²であった。さらに、108 日間漬けた場合、pH 7 および pH10 の平板培地で好気培養するとそれぞれ 1.2 × 10⁴、3.0 × 10¹、また、pH 7 および pH10 の平板培地で嫌気培養するとそれぞれ 9.0 × 10¹、1.1 × 10²であった。

表1 スクガラス等の発酵食品の微生物の特性

製造年月日	保存期間(日)	pH	酢酸(g/l)	乳酸(g/l)	コハク酸(g/l)	培養(好気・嫌気)	微生物の数 /ml	
							pH 7	pH 10
2010.8.10 スクガラス	108	5.3	2.7	3.0	4.0	好気	1.2 × 10 ⁴	3.0 × 10 ¹
						好気* ¹	3.0 × 10 ⁴	
						嫌気	9.0 × 10 ¹	1.1 × 10 ²
						嫌気* ¹	<10 ¹	
2010.9.8 スクガラス	79	5.3	2.0	3.7	4.9	好気	5.5 × 10 ³	2.0 × 10 ¹
						好気* ¹	1.2 × 10 ⁴	
						嫌気	1.0 × 10 ¹	4.7 × 10 ²
						嫌気* ¹	<10 ¹	
2012.7.19 スクガラス	32	5.5	0.5	3.1	0.8	好気	<10 ¹	4.0 × 10 ¹
						嫌気	1.0 × 10 ¹	1.0 × 10 ¹
						好気	6.0 × 10 ¹	8.0 × 10 ¹
						嫌気	<10 ¹	<10 ¹
2011* ² スクガラス	約360	5.3	0.6	10.5	4.1	好気	6.0 × 10 ¹	8.0 × 10 ¹
						嫌気	<10 ¹	<10 ¹
2013 カツオ塩辛	<90					好気	3.9 × 10 ⁷	3.9 × 10 ³
						嫌気	5.0 × 10 ⁷	3.1 × 10 ⁶
2013.11.7 粟のミキ	5	4.6				好気	2.8 × 10 ⁷	3.0 × 10 ⁶
						嫌気	4.1 × 10 ⁷	5.1 × 10 ⁶
2013.2.17 カタカシ腸						好気	1.3 × 10 ⁵	<10 ⁴
						嫌気	2.8 × 10 ⁴	3.0 × 10 ⁴

*¹ 数カ月保存した海水を使用、*² 大城海産物加工所製

このことから、スクガラスの漬け汁には、pH10 に比べて pH7 で好氣的に生育する微生物が多く存在することがわかった。また、蒸留水の代わりに数カ月間保存した海水を用いた培地では、pH 7 で好氣的に生育するコロニーがやや多く計数できたが、嫌気条件ではコロニー数は逆に減少した。

さらに、好氣的にコロニー形成できる漬け汁の微生物の数は、表1に示したように、漬ける期間が長くなるにしたがって菌数がわずかに増える傾向にあった。これは、熟成にともなって生成してきたグルタミン酸などの遊離

アミノ酸を栄養源として微生物が増えたのではないかと考えられる。

一方、市販品として購入したスクガラスの漬け汁の微生物の数は、表1に示したように、360 日間ほど漬けた場合、pH 7 および pH10 の好気条件でそれぞれ 6.0 × 10¹、8.0 × 10¹ と少なかった。

2010 年産のスクガラスから 3~4 ヶ月後に分離した微生物は、糖の資化能が弱く、乳酸をわずかに生成した。

また、分離した微生物の 16S rRNA 遺伝子解析による簡易同定を行った結果を表2に示した。*Bacillus subtilis*、*B. megaterium*、*B. gibsonii*、*B. cereus* など *Bacillus* 属の細菌が多かった。*B. megaterium* や *B. gibsonii* を含む多くの *Bacillus* 属の細菌が島尻マングローブ(表7)やウブカマングローブ(表8)からも分離された。スクガラスと同様に塩分濃度が高い(24~30%)魚醤油からは、*Vibrio* 属、*Pseudomonas* 属、*Bacillus* 属、*Tetragenococcus* 属⁵⁾などの細菌が見出されているが、今回は *Bacillus* 属以外検出されなかった。

表2 奥武島の2010年産スクガラスから分離した微生物

菌株番号	微生物名 (pH7で分離)	相同性 (%)	菌株番号	微生物名 (pH10で分離)	相同性 (%)
177	<i>Bacillus megaterium</i>	100	173	<i>Bacillus gibsonii</i>	100
176	<i>Bacillus subtilis</i>	100	174	未分類	
179	未分類				
175	未分類				
178	未分類				
181	<i>Bacillus cereus</i>	100	180	<i>Bacillus cereus</i>	100

黒字：好気培養 赤字：嫌気培養

3-2 宮古市伊良部島のカツオ塩辛に関わる微生物

カツオ塩辛の漬け汁に存在する微生物の数は、表1に示したように、好気培養の場合、pH 7 および pH10 でそれぞれ 3.9 × 10⁷、3.9 × 10³、嫌気培養の場合、pH 7 および pH10 でそれぞれ 5.0 × 10⁷、3.1 × 10⁶であり、pH 7 において、たいへん多くの微生物数が計数された。これは、奥武島産のスクガラスに比べて、塩の量が少なかったためではないかと考えられた(例えば、イカの塩辛の場合、イカの重量に対して十数%程度の塩が使われている)。また、嫌気条件において、アルカリ耐性の微生物も多く存在することが分かった。

表3には、カツオ塩辛から分離した微生物について、16S rRNA 遺伝子の解析に基づく簡易同定の結果を示した。醤油製造に使われている好塩性乳酸菌の *Tetragenococcus halophilus*⁶⁾が好気 (pH10) および嫌気条件 (pH 7 と pH10) で多く分離された。また、耐塩性乳酸菌の *Enterococcus lactis* も嫌気条件 (pH7 と pH10) で

表3 伊良部島のカツオ塩辛から分離した微生物

菌株番号	微生物名 (pH7で分離)	相同性 (%)	菌株番号	微生物名 (pH10で分離)	相同性 (%)
			N67	<i>Tetragenococcus halophilus</i> subsp. <i>flandriensis</i>	97.5
			N68	<i>Tetragenococcus halophilus</i> subsp. <i>flandriensis</i>	97.9
			N69	<i>Staphylococcus saprophyticus</i> subsp. <i>saprophyticus</i>	97.9
			N70	<i>Gemicrobium sediminis</i>	98.0
N81	<i>Enterococcus lactis</i>	99.5	N75	<i>Enterococcus lactis</i>	99.5
N79	<i>Tetragenococcus halophilus</i> subsp. <i>flandriensis</i>	98.2	K77	<i>Tetragenococcus halophilus</i> subsp. <i>flandriensis</i>	97.7
N80	<i>Tetragenococcus halophilus</i> subsp. <i>flandriensis</i>	98.3	K78	<i>Tetragenococcus halophilus</i> subsp. <i>flandriensis</i>	97.7
N82	<i>Tetragenococcus halophilus</i> subsp. <i>flandriensis</i>	97.7			

黒字：好気培養 赤字：嫌気培養

分離された。*E. lactis* は、イカの塩辛から多く分離され、酢酸や乳酸などの有機酸の生成に関与していることが報告されている⁷⁾。*Staphylococcus saprophyticus* も好気条件 (pH10) から分離された。カツオ塩辛の呈味成分も、自己消化により生成してくる遊離アミノ酸と思われるが、*E. lactis* や *S. saprophyticus* などの細菌が生産する乳酸などの有機酸も寄与していると考えられた。その他、好気条件 (pH10) において、熱帯海域の底泥から分離されるアルカリ耐性の細菌 *Geomicrobium sediminis* も分離された。

ところで、亜熱帯海域で獲れる魚を使って塩辛を作る場合、魚に由来する微生物についても興味を持たれる。そこで、サンゴ礁海域の主要な魚種の一つとして知られているカタカシ (スズキ目ヒメジ科、通称オジサン、動物食性) の腸内の微生物の特性について調べた。

沖縄本部港のカタカシの腸内から寒天平板上にコロニー形成できる微生物の数 (c.f.u. / ml) を、表1の最下段に示した。好気培養の場合、pH7およびpH10でそれぞれ 1.3×10^5 、 10^4 未満、嫌気培養の場合、pH7およびpH10でそれぞれ 2.8×10^4 、 3.0×10^4 であり、pH7の好気条件で最も多くの微生物が計数された。

カタカシの腸から pH7 の好気条件で分離した微生物の 16S rRNA 遺伝子の解析に基づく簡易同定の結果は、表4に示したように、*Klebsiella* 属、*Stenotrophomonas* 属、*Microbacterium* 属、*Enterococcus* 属に属する細菌であった。

Klebsiella 属の細菌は、伊良部産の粟から作られたミキからも分離されている。また、*Enterococcus* 属の細菌は、伊良部産のカツオ塩辛やミキ、海洋環境³⁾からも分離されている。

表4 カタカシの腸から pH7、好氣的に分離した微生物

菌株番号	微生物名 (pH7、好気で分離)	相同性 (%)
F47	<i>Klebsiella michiganensis</i>	98.8
F44MIy3	<i>Stenotrophomonas pavanii</i>	99.5
F43MIy2	<i>Microbacterium paraoxydans</i>	99.4
F46Lw4	<i>Enterococcus asburiae</i>	99.1
F49	<i>Enterococcus cancerogenus</i>	99.2

3-3 宮古市伊良部島のミキの微生物の特性

宮古市伊良部島において、2013年11月に粟を原料にして自家用に作られたミキの微生物は、表1に示したように、製造してから5日後には、好気条件では、pH7およびpH10でそれぞれ 2.8×10^7 、 3.0×10^6 、嫌気条件では、pH7およびpH10でそれぞれ 4.1×10^7 、 5.1×10^6 とかなり多くの微生物が計数できた。また、好気および嫌気条件において、アルカリ耐性の微生物も多く存在することが分かった。同じようなことは、塩屋湾のウンガミ (海神祭) に使われるミキ (神酒) においても観察されている¹⁾。

さらに、粟のミキから分離した微生物について、16S rRNA 遺伝子の解析に基づく簡易同定の結果を表5に示した。カツオ塩辛からと同じ耐塩性乳酸菌 *Enterococcus lactis* が pH7 および pH10 の培養条件で分離された。また、*Klebsiella* 属、*Pantoea* 属、*Cedecea* 属などエンテロバクター科 (腸内細菌科) の細菌も分離された。

表5 粟を原料にした伊良部産ミキから分離した微生物

菌株番号	微生物名 (pH7で分離)	相同性 (%)	菌株番号	微生物名 (pH10で分離)	相同性 (%)
K26	<i>Klebsiella singaporensis</i>	99.3	K24	<i>Klebsiella singaporensis</i>	99.3
K27	<i>Pantoea septica</i>	98.5	K23	<i>Cedecea lapagei</i>	98.0
K25	<i>Enterococcus lactis</i>	99.7	K21	<i>Enterococcus lactis</i>	99.7
K28	<i>Enterococcus lactis</i>	98.7	K22	<i>Enterococcus lactis</i>	98.0
K33	<i>Pseudomonas littoralis</i>	96.7	K32	<i>Pantoea septica</i>	98.6
K34	<i>Acinetobacter indicus</i>	87.3	K29	<i>Cedecea lapagei</i>	98.2
K35	<i>Enterococcus lactis</i>	99.5	K30	<i>Enterococcus lactis</i>	99.4
K37	<i>Facklamia tabacinensis</i>	93.9			

黒字：好気培養 赤字：嫌気培養

3-4 沖縄県宮古島のマングローブの微生物の特性

マングローブは、波による海岸の浸食を防ぐとともに、陸から流れ込む泥や土、栄養分を多く含んだ水を受け止め、海の生態系を守る役割を果たしている。マングローブ域は、哺乳類や鳥類、爬虫類、両生類、エビ、カニ、貝など様々な生物を育んでいる (図3)。



図3 宮古島島尻のマングローブ林

宮古島の北部にある島尻マングローブ域は、河川の流入がない奥行き約1Kmの入江に、オヒルギ、メヒルギ、ヤエヤマヒルギ、ヒルギダマシの群落を発達させた宮古島諸島最大の貴重な生態系である。

宮古島の島尻マングローブおよびウプカマングローブの微生物の特性を表6に示した。

表6 島尻およびウプカマングローブの微生物の特性

分離源	pH	固形分 (%)	微生物の数 (c. f. u.) / ml	
			pH 7	pH 10
島尻マングローブ (満潮)				
地点Aの上層水	8.3		2 × 10 ⁵ 3 × 10 ⁵ < 10	2 × 10 ⁵ 3 × 10 ⁵ 8 × 10 ⁵
地点Bの上層水	8.3		3 × 10 ⁵	1 × 10 ⁵
地点Aの底泥		31.4	5.4 × 10 ⁵ 6.3 × 10 ⁴	1.2 × 10 ⁵ 4.7 × 10 ⁴
地点Bの底泥		47.1	5.5 × 10 ⁵	2.5 × 10 ⁵
ウプカマングローブ (干潮)				
地点Cの底泥		35.3	3.8 × 10 ⁵ 5.9 × 10 ⁴	1.9 × 10 ⁵ 1.4 × 10 ⁵
地点Dの底泥		57.8	4.1 × 10 ⁵	1.3 × 10 ⁵
黒字：好気培養 赤字：嫌気培養				

試料採取時、島尻マングローブ域はほぼ満潮であり、上層の水は濁っているように見えたが、A地点およびB地点の上層水の微生物数は、たいへん少なかった。しかし、底泥の微生物数は、好気条件ではA地点においてpH7およびpH10で、それぞれ5.4 × 10⁵、1.2 × 10⁵、嫌気条件ではpH7およびpH10でそれぞれ6.3 × 10⁴、4.7 × 10⁴の微生物が計数された。B地点においても、ほぼ同じ数の微生物が計数された。

一方、宮古島の西部与那原湾に近いウプカマングローブ域は、試料採取時、ほぼ干潮であったが、地点Cおよ

び地点Dの底泥の微生物数は、島尻マングローブ域とほぼ同様な傾向を示した。

これらのことから、宮古島のマングローブ域には、「一般の栄養培地」に生育できる微生物のうち、pH10のアルカリ環境で生育できる好アルカリ性（アルカリ耐性）の微生物が多く存在することが理解できる。

3-5 宮古島の島尻マングローブから分離した微生物

宮古島の島尻マングローブから分離した微生物の16S rRNA 遺伝子の解析に基づく簡易同定の結果を表7に示した。

島尻マングローブからは、グラム陽性菌（低GC）の*Bacillus*属、*Paenibacillus*属、*Staphylococcus*属、*Lactococcus*属、*Exiguobacterium*属などの細菌が分離されたが、特に*Bacillus*属の細菌が多いのが特徴である。*Lactococcus lactis*はチーズやヨーグルトの製造に重要なアルカリ耐性の乳酸菌である。*Exiguobacterium*属の細菌は、好アルカリ性の乳酸菌としても知られている。また、海洋環境に多く存在するビブリオ科の*Vibrio*属、*Catenococcus*属、*Photobacterium*属の細菌も分離された。さらに、藍染め液から高頻度で分離される好アルカリ性の*Halomonas*属の細菌も分離された。

表7 宮古島の島尻マングローブから分離した微生物

分離源	菌株番号	微生物名 (pH7で分離)	相同性 (%)	菌株番号	微生物名 (pH10で分離)	相同性 (%)	
島尻マングローブ	N87	<i>Halomonas mongoliensis</i>	98.9	N87	<i>Halomonas mongoliensis</i>	98.9	
	N90	<i>Halomonas mongoliensis</i>	98.9	N86	<i>Bacillus safensis</i>	100	
	N91	<i>Bacillus megaterium</i>	98.2	N89	<i>Bacillus safensis</i>	100	
	N94	<i>Bacillus methylotrophicus</i>	98.9	N84	<i>Bacillus oshimensis</i>	93.4	
	地点A	N92	<i>Bacillus safensis</i>	100	N83	<i>Bacillus plakortidis</i>	94.6
	底泥			N85	<i>Exiguobacterium profundum</i>	98.1	
				S62	<i>Vibrio neocaledonicus</i>	99.4	
		S67	<i>Bacillus drentensis</i>	99.8	S64	<i>Catenococcus thioacycli</i>	98.8
				S59	<i>Photobacterium rosenbergii</i>	98.0	
				S60	<i>Romboutsia lituseburensis</i>	96.9	
地点A	S78	<i>Bacillus bingmayongensis</i>	99.4	S77	<i>Vibrio owensii</i>	97.6	
上層水	S81	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	98.6	S79	<i>Staphylococcus gallinarum</i>	99.7	
地点B	S27	<i>Bacillus aryabhatai</i>	98.5	S26	<i>Vibrio neocaledonicus</i>	99.4	
底泥			S23	<i>Bacillus safensis</i>	100		
			S25	<i>Bacillus safensis</i>	100		
			S24	<i>Bacillus gibsonii</i>	97.8		
地点B	S85	<i>Vibrio owensii</i>	99.5				
上層水	S84	<i>Paenibacillus sabiniae</i>	97.5				

黒字：好気培養、赤字：嫌気培養

3-6 宮古島のウプカマングローブから分離した微生物

宮古島のウプカマングローブから分離した微生物の16S rRNA 遺伝子の解析に基づく簡易同定の結果を表8に示した。

ウプカマングローブからも、グラム陽性菌（低GC）

の *Bacillus* 属、*Paenibacillus* 属、*Oceanobacillus* 属、*Exiguobacterium* 属、*Clostridium* 属などの細菌が分離されたが、特に島尻マングローブと同様に、*Bacillus* 属の細菌が多く分離されるのが特徴である。*Oceanobacillus* 属の細菌は、*Exiguobacterium* 属と同様に、好アルカリ性の乳酸菌として知られ、海洋環境から分離されている。

表8 宮古島のウプカマングローブから分離した微生物

分離源	菌株番号	微生物名 (pH7で分離)	相同性 (%)	菌株番号	微生物名 (pH10で分離)	相同性 (%)
	S56	<i>Bacillus megaterium</i>	97.7	S34	<i>Isoptericola jiangsuensis</i>	98.2
	S37	<i>Bacillus aryabhatai</i>	98.3	S36	<i>Kocuria rosea</i>	98.5
				S53	<i>Oceanobacillus chironomi</i>	98.5
地点C 底泥				S31	<i>Bacillus safensis</i>	97.9
				S30	<i>Bacillus oceanisediminis</i>	98.2
				S52	<i>Bacillus oceanisediminis</i>	99.0
				S33	<i>Bacillus cohnii</i>	98.5
				S54	<i>Bhargavaea cecembensis</i>	98.3
				S69	<i>Vibrio ovensii</i>	99.5
				S70	<i>Catenococcus thioacyli</i>	98.8
				S71	<i>Exiguobacterium profundum</i>	98.6
				S72	<i>Clostridium ghonii</i>	96.6
				S43	<i>Oceanobacillus oncorhynchi</i>	99.5
地点D 底泥	S51	<i>Bacillus methylophilicus</i>	99.4		subsp. <i>oncorhynchi</i>	99.5
	S49	<i>Bacillus safensis</i>	99.4	S57	<i>Bacillus oceanisediminis</i>	99.0
	S50	<i>Bacillus tequilensis</i>	98.9	S41	<i>Bacillus horikoshii</i>	97.2
	S58	<i>Paenibacillus massiliensis</i>	98.0	S47	<i>Exiguobacterium profundum</i>	98.6

黒字：好気培養 赤字：嫌気培養

また、グラム陽性菌（高GC）として、*Isoptericola* 属や *Kocuria* 属の放線菌も分離されている。海洋環境に多く存在するビブリオ科では *Vibrio* 属や *Catenococcus* 属の細菌も分離されている。

マングローブ域からは、一般従属栄養細菌として、海洋環境であまり分離されない、グラム陽性細菌や腸内細菌科の細菌が分離されると報告されている⁸⁾が、宮古島のマングローブ域からは、腸内細菌科の細菌は分離されなかった。

3-7 沖縄本島のマングローブの微生物

次に、宮古島のマングローブ域の微生物の特性と比較するために、沖縄本島のマングローブ域の微生物についても検討し、その結果を表9に示した。

州崎マングローブ域の上層水と底泥、億首川河口マングローブ域の底泥、大浦湾マングローブ域の底泥および慶佐次湾マングローブ域の底泥の微生物数は、慶佐次湾マングローブ域でやや多かったが、宮古島のマングローブ域とほぼ同じような傾向を示した。

さらに、潮の干満によって変化する通気状態が微生物特性に与える影響を調べるため、州崎マングローブ域については好気条件（アネロパック・好気、三菱ガス化学製）での微生物の計数も行った。その結果は、表9に示したように、上層水と底泥ともに好気条件で生育する微生物数が、好気および嫌気条件よりも多く計数された。潮位により周期的に通気状態が変動するマングロ

ーブ域では、好気条件が微生物の計数に最適なのか、今後、さらに検討する必要がある。

表9 沖縄本島のマングローブの微生物の特性

分離源	培養方法	微生物の数 (c. f. u.) / ml	
		pH 7	pH 10
州崎マングローブ			
上層水	好気	8.0×10^1	8.0×10^1
	好気	1.3×10^2	2.2×10^2
	嫌気	1.0×10^1	< 10
底泥	好気	4.2×10^5	1.7×10^5
	好気	9.0×10^5	1.3×10^6
	嫌気	8.0×10^4	2.2×10^5
億首川河口マングローブ			
底泥	好気	1.2×10^5	1.0×10^5
	嫌気	1.7×10^5	1.9×10^5
大浦湾マングローブ			
底泥	好気	1.8×10^5	6.5×10^5
慶佐次湾マングローブ			
底泥	好気	2.6×10^6	2.2×10^6

以上のことから、亜熱帯のマングローブ域では、「一般的な栄養培地」に生育できる微生物のうち、pH10のアルカリ環境で生育できる好アルカリ性（アルカリ耐性）の微生物が多く存在することが明らかとなった。

3-8 サンゴ礁海域の微生物の特性

亜熱帯サンゴ礁海域に分布する微生物と人々との生活との関わりを調べるために、「一般的な栄養培地」といわれる比較的栄養源の多い基本培地を用いて、各地の亜熱帯サンゴ礁海域の微生物の分離を行った。

すでに、著者らはサンゴ礁海域の海水中に、pH7よりもpH10の基本培地ですばやく増殖してくる好アルカリ性微生物が存在することを報告した¹⁾。

表10には、pH10に調整した培地を用いて、嫌氣的に培養して分離した微生物の16S rRNA遺伝子の解析に基づく簡易同定の結果を示した。

Vibrio 属の細菌や腸内細菌科の *Enterobacter* 属の細菌が分離されたが、特に、*Vibrio* 属の細菌が多かった。また、好アルカリ性乳酸菌の *Exiguobacterium* 属の細菌も分離された。

先に、マングローブ域からは、*Bacillus* 属の細菌が多く分離されることを述べたが、ビブリオ科の細菌もマングローブ域から分離されていた。

しかし、スクガラスやカツオ塩辛、ミキからはビブリオ科の細菌は分離されなかった。

表10 沖縄のサンゴ礁海域から pH10 で分離した微生物

分離源	菌株番号	微生物名 (pH10、嫌気培養)	相同性 (%)
うるま市平安座海岸* ¹	191	<i>Enterococcus cowanii</i>	100
久米島奥武島豊石* ²	201	<i>Vibrio harveyi</i>	100
久米島深層水研前海水* ²	204	<i>Vibrio harveyi</i>	99
久米島博愛漁港* ²	198	<i>Vibrio harveyi</i>	99
久米島兼城港* ²	206	<i>Vibrio alginolyticus</i>	100
勝連平敷屋漁港* ¹	192	<i>Vibrio alginolyticus</i>	100
古宇利島浜* ¹	199	<i>Vibrio alginolyticus</i>	100
大宜味村塩屋浜* ¹	195	<i>Vibrio agarivorans</i>	98
大宜味村突堤* ¹	194	<i>Vibrio shilonii</i>	98
うるま市海中道路浜* ²	196	<i>Exiguobacterium profundum</i>	99
久高島沖海水* ³	197	<i>Exiguobacterium arabatum</i>	99

*¹ 2010. 12. 19採取、 *² 2011. 4. 24採取、 *³ 2011. 4. 30採取

3-9 まとめ

人々の生活と海の微生物の関わりを知るため、沖縄の発酵食品（スクガラス、カツオ塩辛、ミキ）とマングローブ域やサンゴ礁海域の微生物について調べた。

高濃度の食塩（30%程度）を含むスクガラスの漬け汁は、微生物の数が1 ml 当たり $10^1 \sim 10^4$ 個と非常に少なく、ほとんどがアルカリ耐性のない好気性の *Bacillus* 属の細菌であった。一方、宮古伊良部島のカツオ塩辛の漬け汁やミキには、1 ml 当たり 10^7 個レベルの通性嫌気性菌が存在しており、アルカリ耐性のもも多かった。カツオ塩辛からは、アルカリ耐性をもった好塩性乳酸菌 *T. halophilus* や耐塩性乳酸菌 *E. lactis* が分離された。また、ミキからも *E. lactis* が多く分離された。しかし、スクガラス、カツオ塩辛およびミキからは *Vibrio* 属の細菌は分離されなかった。

宮古島や沖縄本島のマングローブの底泥には、1 ml 当たり 10^5 個レベルの微生物が存在しており、アルカリ耐性や通性嫌気性の微生物の割合も高かった。特に、沖縄本島では、好アルカリの特性を示す微生物の割合が高くなる傾向が認められた。

宮古島の島尻マングローブおよびウブカマングローブからは、多くの *Bacillus* 属の細菌の他に、*Lactococcus* 属の乳酸菌、*Exiguobacterium* 属や *Oceanobacillus* 属の好アルカリ性乳酸菌、*Halomonas* 属の好アルカリ性の好気性細菌、海洋環境に多く存在する *Vibrio* 属の細菌などが分離された。しかし、宮古島のマングローブからは、腸内細菌科の細菌は分離されなかった。

サンゴ礁海域からは、*Exiguobacterium* 属の好アルカリ性乳酸菌の他に、多くの *Vibrio* 属の細菌が分離された。

今後、人々の生活と海の微生物との関わりについて理解を深めるためには、さらに、種々の発酵食品や藍染め液等とともに、多くの海域の微生物の解明が求められる。

4 おわりに

今回、栄養源の豊富な（富栄養）培地で生育できる海の微生物（富栄養微生物）に注目した。海洋環境に生息する微生物の中でも、その数は1%以下といわれているが、人々の生活と古くから深い関わりがある微生物と考えられる。

海に生息する大部分の微生物（海水 1ml 当たり $10^5 \sim 10^6$ 個）は、栄養源の非常に少ない（極貧栄養）環境に進化、適応した微生物（貧栄養微生物）であると考えられている。それらの生育の速度はたいへん遅い（1日当たり1回程度の増殖）が、海では一定数が保たれている。このことから、微生物の死滅と増殖の均衡が保たれていると推察される。

一方、海から富栄養培地で分離した微生物は、海洋の極貧栄養環境では増殖できないのではないかと考えられる。海の富栄養微生物は、栄養の豊富な環境（高等生物の表面や体内、老廃物、遺体、デトリタス等あるいは陸や河川などから流入した富栄養物）に遭遇するまで生き長らえなければならぬ。海の富栄養微生物は、主に海に生息する高等生物と共存しながら、進化、適応した微生物群と考えられるが、ヒトを含む陸上の動植物との関わりも否定するものではない。

海洋における富栄養微生物と極貧栄養微生物の関係は、陸上の土壌微生物においても同様なことが観察される。一般の栄養培地で生育できる土壌微生物（富栄養微生物）は、全体の1%程度で、大部分の土壌微生物は生育できない貧栄養微生物と考えられている。団粒構造を持つ土壌には、貧栄養と富栄養の両者の微生物が共存し、栄養源が豊富な時には富栄養微生物が急速に増殖して団粒間を埋め尽くすが、団粒内部にいる貧栄養微生物は増えない。一方、栄養源が少ない時には、富栄養微生物は孢子などの耐久状態で耐える、あるいは死滅するが、貧栄養微生物は一定の増殖を維持すると理解されている。

マングローブ域やサンゴ礁海域の底泥では、水の影響で団粒構造は発達しないと考えられる。

微生物はそれぞれの環境に進化、適応しており、栄養濃度についても、それぞれの微生物には最適（増殖速度が最大）の濃度がある。一般に、自然環境においては、より低い濃度の栄養源に適応した微生物の方がその数は多いと考えられている^{9,10}。

最近、貧栄養微生物など培養が困難な微生物群集が、新たな遺伝子資源として注目されている。ゲノム解析技術を使って、培養できない微生物群集のゲノムライブラリーから、遺伝子を見つけて遺伝子組み換え技術により大腸菌で発現させて、培養できない微生物の新たな機能を見つけ出すことが可能になってきた。今後、安全性に

十分注意を払いながら、培養できなかった微生物から多様な機能が発見されることが期待される。

本研究は「バイオマスからの高機能化学物質生産技術の実証（2012 技 002）」の一環として行ったものである。

参考文献

- 1) 常盤豊, 世嘉良宏斗, 市場俊雄, 琉球地域の伝統飲料「ミキ（神酒）」の発酵に関わる微生物の特性, 沖縄県工業技術センター平成24年度研究報告, **15**, 7-11 (2013)
- 2) 常盤豊, 世嘉良宏斗, 市場俊雄, 琉球地域の伝統産業「藍染め」に関わる微生物の特性－宮古島、久米島、沖縄本島の藍染め液について－, 沖縄県工業技術センター平成24年度研究報告書, **15**, 13-21 (2013)
- 3) H. Yokaryo, Y. Tokiwa, Isolation of alkaliphilic bacteria for production of high optically pure L-(+)-lactic acid, *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **60**, 270-275 (2014)
- 4) 世嘉良宏斗, 常盤豊, 越村匡博, 好アルカリ性乳酸生産微生物の探索 (II) 沖縄県工業技術センター平成26年度研究報告書, **17**, in press, (2015)
- 5) M. Satomi, B. Kimura, M. Mizoi, T. Sato, T. Fujii, *Tetragenococcus muriaticus* sp. nov., a new moderately halophilic lactic acid bacterium isolated from fermented squid liver sauce, *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **47**, 832-836 (1997)
- 6) 石川森夫, 好塩性・好アルカリ性乳酸菌の多様性と特性, *日本食品微生物学会雑誌*, **26**, 49-59 (2009)
- 7) T. Fujii, W. Yu-Ching, T. Suzuki, B. Kimura, Production of organic acids by bacteria during the fermentation of squid shiokara. *Fisheries Sci.*, **65**, 671-672 (1999)
- 8) 増地矢恵子, マングローブの微生物生態系とその役割, *Microbes and Environments*, **13**, 203-215 (1998)
- 9) 服部勉, 大地の微生物世界, 岩波新書, 390 (1987)
- 10) N. Kataoka, Y. Tokiwa, Y. Tanaka, K. Takeda, T. Suzuki, Enrichment culture and isolation of slow-growing bacteria, *App. Microbiol. Biotechnol.*, **45**, 771-777 (1996)

編 集 沖縄県工業技術センター

発 行 沖縄県工業技術センター

〒904-2234 沖縄県うるま市字州崎 12 番 2

T E L (098)929-0111

F A X (098)929-0115

U R L <https://www.pref.okinawa.lg.jp/site/shoko/kogyo/>

著作物の一部および全部を転載・翻訳される場合は、当センターにご連絡ください。