

水産生物遺伝資源保存事業海洋微生物部門ベースコレクションの生物性状^{*1}

内田基晴^{*2}, 佐藤洋子^{*3}, 村田昌一^{*3}, 松嶋良次^{*3}

Characterization of the base collection strains preserved in the Marine Microorganism Division, a sub-bank of the Microbial Culture Collections, Fish Research Agency.^{*1}

Motoharu UCHIDA^{*2}, Yoko SATO^{*3}, Masakazu MURATA^{*3} and Ryoji MATSUSHIMA^{*3}

Abstract The Applied Microbiology Section in the National Research Institute of Fisheries Science is nominated as a Microbial Culture Collections Sub-Bank of the Gene Bank in the Fisheries Research Agency (FRA) and keeps a collection of fifty strains of bacteria and yeast as of May 2002, that are in preparation to be utilized as open cultures. Microbiological characterization was carried out with these collections to assist future culture utilization. The study was conducted using several commercial kits including NF-18 test (for gram negative microorganisms), NF-20 test (for gram positive microorganisms), API50CH test, and API zym20 test in addition to conventional phenotypic characterization. The partial nucleotide sequences of 16S rRNA gene (for bacteria) and 18S rRNA gene (for yeast) were also determined and submitted to DDBJ. Based on all the obtained results, tentative identification was conducted for the current fifty FRA collections.

Key Words: characterization, FRA culture collection, marine microorganism, microorganism Sub-Bank of FRA

独立行政法人水産総合研究センター (Fisheries Research Agency, FRA) が実施する水産生物遺伝資源保存事業は、藻類・微細藻類サブバンク、微生物サブバンク、およびDNAサブバンクから構成される。中央水産研究所利用化学部応用微生物研究室は、本事業において微生物サブバンクに所属し、海洋微生物の収集・保存を担当している。2002年5月から約1年間かけて応用微生物研究室に保存されている菌株を整理し、産業利用の観点から重要と考えられる50菌株を選択し、2003年3月にベースコレクションとして登録した。本事業におけるベースコレクションとは、保存に値する

菌株として位置づけられた菌株のことであり、今回登録された菌株には、マコンブ葉体分解細菌、海藻発酵菌 (乳酸菌および酵母)、および中国淡水魚醤油から分離された魚醤油乳酸菌等が含まれている。これらのベースコレクションを外部機関への分譲株として利用していくことについては、現在水産総合研究センターにおいて制度的検討が行われている段階であるが、将来菌株の分譲制度が開始した場合を想定して、菌株に関する性状分析データを充実させておくことがサブバンクに求められている。このような背景から上記50菌株のベースコレクションについて分類学的性状試験を実施

2004年1月19日受理 (Received on January 19, 2004)

水産総合研究センター業績 A 第47号 (Contribution No. A 47 from the Fisheries Research Agency)

^{*1} 本研究は、平成14年度中央水産研究所内プロジェクト研究の予算により実施された。

^{*2} 瀬戸内海区水産研究所 〒739-0452 広島県佐伯郡市大野町丸石2-17-5 (National Research Institute of Fisheries and Environment of Inland Sea, Maruishi, Ohno, Saeki, Hiroshima 739-0452, Japan)

^{*3} 中央水産研究所 〒236-8648 神奈川県横浜市金沢区福浦2-12-4 (National Research Institute of Fisheries Science, Fukuura, Kanazawa, Yokohama 236-8648, Japan)

した。性状試験の実施にあたっては、水産遺伝資源保存事業の担当者にかかわらず、データの品質基準が変わらずに継承性をもって試験が実施できること、また必要な場合には簡便に追試が実施できることが重要となる。このことから、できるだけ市販の同定キットを使用し、簡便なスキームで性状試験を実施することをこころがけた。具体的な試験項目としては、全菌株について基本性状試験を実施した後、グラム陰性の菌株には NF-18（日水製薬）試験を、グラム陽性の菌株（酵母、乳酸菌、*Bacillus* 属細菌）については、EB-20（日水製薬）試験を実施した。また同じく市販キットにより API 50CH（ビオメリュー）試験および API zym 20（ビオメリュー）試験を実施した。さらに細菌株については、16S rRNA 遺伝子（16S rDNA）、酵母株については、18S rRNA 遺伝子（18S rDNA）の部分塩基配列をそれぞれ決定し、これらの結果に基づいて暫定的な分類同定を行った。キット試験は、元来非好塩性微生物を対象にして開発されているため、好塩性を特徴とする海洋微生物の試験に適用する場合には試験方法を一部変更すべきと考えられるが、その実施方法についての情報は乏しい。そこでキット試験を実際に行って気のついた点を結果と考察の部分に記載した。

材料と方法

対象とした水産微生物遺伝資源

2002年5月時点で中央水産研究所利用化学部応用微生物研究室（水産生物遺伝資源保存事業微生物サブバンク海洋微生物部門）に収集保存されてある全微生物410菌株のうち、生存及び純粋性の確認された菌株の中から、これまで明らかにされている性状を参考に産業利用の観点から重要と考えられる50菌株を選定し、試験の対象とした（Table 1）。Table 1には推奨される培養条件も合わせて示した。

基礎性状試験

グラム染色試験は、市販染色試薬（日水製薬、フェイバーGセット）を使用した。細胞の形態、運動性、および胞子の形成の有無は、菌体を光学顕微鏡で観察して記載した。鞭毛は、常法に従って酢酸ウラニウムでネガティブ染色し（門田, 多賀, 1985）、透過型電子顕微鏡（日本電子株式会社, JEM-1200EX II）で観察した。OF試験、カタラーゼ、オキシダーゼ試験の実施は、常法に従った（長谷川, 1990; 門田, 多賀, 1985; 河合ら, 1988）。試験の実施にあたり菌体の培養は、特に記載がなければ20°Cで実施した。

増殖温度試験は、菌体番号FRA000001~FRA000032についてはMarine Broth培地(Difco)を、FRA000033~FRA000036についてはMRS培地(Merck)を、FRA000037~FRA000040については7%(w/v) NaCl添加MRS培地(pH7.8に改変)を、FRA000041~FRA000044については標準培地(ペプトン5.0g, 酵母エキス2.5g, グルコース1.0g/L, pH7.0)を、FRA000045~FRA000050についてはサブロー培地(ペプトン10g, グルコース40g/L, pH5.9)を使用した。Marine Broth培地(Difco)の調製にあたっては、加熱融解後、GF/Cでろ過して、濁りをとった後、オートクレーブ処理することにより沈殿物のない培地として使用した。菌体1白金耳を培地に接種し、5日間培養する過程で経時的に濁度を目視観察して増殖の有無を判断した。

増殖塩濃度試験は、FRA000001~FRA000032については改変標準培地(pH7.6に改変)を基本にNaClを各濃度で添加した培地を、FRA000033~FRA000036についてはMRS培地を、FRA000037~FRA000040については改変MRS培地(pH7.8に改変)を、FRA000041~FRA000044については標準培地を、FRA000045~FRA000050についてはサブロー培地を基本として、NaClを各濃度で添加した液体培地を使用した。菌体1白金耳を培地に接種し、5日間培養する過程で経時的に濁度を目視観察して増殖の有無を判断した。

市販キットによる性状分析

キット試験の方法は、添付資料に従い、必要な場合は一部改変して実施した。また菌体は、特に記載がなければ20°Cで培養した。グラム陰性の菌株には NF-18（日水製薬）試験を、グラム陽性の菌株（酵母、乳酸菌、*Bacillus* 属細菌）については、EB-20（日水製薬）試験を実施した。一部の株を除いてAPI 50CH（ビオメリュー）試験を、また全ての菌株についてAPI zym 20（ビオメリュー）試験を実施した。

NF-18及びEB-20試験に使用する菌体試料は、酵母、乳酸菌、*Bacillus* 属細菌、グラム陰性菌について、それぞれサブロー寒天培地（SBR, 日水製薬）、MRS寒天培地（1.5%寒天添加MRS培地）、標準寒天培地（SMA, 日水製薬）、Marine Broth寒天培地（MA）で培養して得た新鮮な菌体を、平板上より白金耳で掻き採り、キットに添付された菌体調製液に懸濁して使用した。グラム陰性菌については、塩要求性を考慮して、添付されたNF-18ブイヨン2 mLに滅菌4%（w/v）濃度NaCl水溶液1 mLを加えた改変菌体調製液に菌体を懸濁させた後、これを100 μ Lずつ接種した。魚醬油乳酸菌については同4%濃度NaCl水溶液の代わりに滅菌30%濃度NaCl水溶液1 mLを使用した。NF-18及びEB-20

Table 1. List of 50 strains tested in the present study

Strain No.	Strain symbol	Characteristics	Isolation source	Recommended culture media	Culture temp.(°C)	Ref.* ¹
FRA000001	AR03	Able to decompose <i>Laminaria</i> thallus	Seawater, at Yokosuka	Marine Agar	20	1
FRA000002	AR06	Able to decompose <i>Laminaria</i> thallus	Seawater, at Yokosuka	Marine Agar	20	1,2,3,4,5,6,7,8
FRA000003	EN02	Able to decompose <i>Laminaria</i> thallus	Seawater, at Shimizu	Marine Agar	20	1
FRA000004	EN06	Able to decompose <i>Laminaria</i> thallus	Seawater, at Shimizu	Marine Agar	20	1
FRA000005	EN09	Able to decompose <i>Laminaria</i> thallus	Seawater, at Shimizu	Marine Agar	20	1
FRA000006	EN10	Able to decompose <i>Laminaria</i> thallus	Seawater, at Shimizu	Marine Agar	20	1
FRA000007	HA02	Able to decompose <i>Laminaria</i> thallus	Seawater, at Hakodate	Marine Agar	20	1, 8
FRA000008	HA03	Able to decompose <i>Laminaria</i> thallus	Seawater, at Hakodate	Marine Agar	20	1
FRA000009	HA04	Able to decompose <i>Laminaria</i> thallus	Seawater, at Hakodate	Marine Agar	20	1
FRA000010	HA5a	Able to decompose <i>Laminaria</i> thallus	Seawater, at Hakodate	Marine Agar	20	1
FRA000011	HA5b	Able to decompose <i>Laminaria</i> thallus	Seawater, at Hakodate	Marine Agar	20	1
FRA000012	HA06	Able to decompose <i>Laminaria</i> thallus	Seawater, at Hakodate	Marine Agar	20	1
FRA000013	HA07	Able to decompose <i>Laminaria</i> thallus	Seawater, at Hakodate	Marine Agar	20	1
FRA000014	HA08	Able to decompose <i>Laminaria</i> thallus	Seawater, at Hakodate	Marine Agar	20	1
FRA000015	HA09	Able to decompose <i>Laminaria</i> thallus	Seawater, at Hakodate	Marine Agar	20	1
FRA000016	HA10	Able to decompose <i>Laminaria</i> thallus	Seawater, at Hakodate	Marine Agar	20	1
FRA000017	HO02	Able to decompose <i>Laminaria</i> thallus	Seawater, at Kushiro	Marine Agar	20	1
FRA000018	HO08	Able to decompose <i>Laminaria</i> thallus	Seawater, at Kushiro	Marine Agar	20	1
FRA000019	KY01	Able to decompose <i>Laminaria</i> thallus	Seawater, at Yosa	Marine Agar	20	1
FRA000020	KY09	Able to decompose <i>Laminaria</i> thallus	Seawater, at Yosa	Marine Agar	20	1
FRA000021	NA08	Able to decompose <i>Laminaria</i> thallus	Seawater, at Saeki	Marine Agar	20	1
FRA000022	SE02	Able to decompose <i>Laminaria</i> thallus	Seawater, at Hirado	Marine Agar	20	1
FRA000023	SE04	Able to decompose <i>Laminaria</i> thallus	Seawater, at Hirado	Marine Agar	20	1
FRA000024	SU01	Able to decompose <i>Laminaria</i> thallus	Seawater, at Shimonoseki	Marine Agar	20	1
FRA000025	YO02	Able to decompose <i>Laminaria</i> thallus	Seawater, at Watarai	Marine Agar	20	1
FRA000026	YO04	Able to decompose <i>Laminaria</i> thallus	Seawater, at Watarai	Marine Agar	20	1
FRA000027	HA-22	Able to decompose <i>Laminaria</i> thallus	Seawater, Hakodate	Marine Agar	20	9
FRA000028	HA-23	Able to decompose <i>Laminaria</i> thallus	Seawater, Hakodate	Marine Agar	20	9
FRA000029	HA-91	Able to decompose <i>Laminaria</i> thallus	Seawater, Hakodate	Marine Agar	20	9
FRA000030	KU-5	Able to decompose <i>Laminaria</i> thallus	Seawater, Kushiro	Marine Agar	20	9
FRA000031	KU-42	Able to decompose <i>Laminaria</i> thallus	Seawater, Kushiro	Marine Agar	20	9
FRA000032	KU-71	Able to decompose <i>Laminaria</i> thallus	Seawater, Kushiro	Marine Agar	20	9
FRA000033	B5201	Able to ferment seaweed	Fermented <i>Ulva</i> spp.	MRS, BCP Plate Count Agar	20	10
FRA000034	B5202	Able to ferment seaweed	Fermented <i>Ulva</i> spp.	MRS, BCP Plate Count Agar	20	
FRA000035	B5406	Able to ferment seaweed	Fermented <i>Ulva</i> spp.	MRS, BCP Plate Count Agar	20	
FRA000036	B5409	Able to ferment seaweed	Fermented <i>Ulva</i> spp.	MRS, BCP Plate Count Agar	20	
FRA000037	FSB101	Dominant in Silver carp-fish source	Silver carp-fish sauce	Modified MRS(7%NaCl, pH7.8)	20	11
FRA000038	FSB105	Dominant in Silver carp-fish source	Silver carp-fish sauce	Modified MRS(7%NaCl, pH7.8)	20	11
FRA000039	FSB401	Dominant in Silver carp-fish source	Silver carp-fish sauce	Modified MRS(7%NaCl, pH7.8)	20	11
FRA000040	FSB404	Dominant in Silver carp-fish source	Silver carp-fish sauce	Modified MRS(7%NaCl, pH7.8)	20	11
FRA000041	A0201	Dominant in fermented <i>Undaria</i>	Fermented <i>Undaria</i>	Standard Method Agar	20	
FRA000042	A1102	Dominant in fermented <i>Undaria</i>	Fermented <i>Undaria</i>	Standard Method Agar	20	
FRA000043	A1501	Dominant in dried <i>Undaria</i> products	<i>Undaria</i> pinnatifida (Commercial product)	Standard Method Agar	20	
FRA000044	A1513	Dominant in dried <i>Undaria</i> products	<i>Undaria</i> pinnatifida (Commercial product)	Standard Method Agar	20	
FRA000045	Y4101	Able to ferment seaweed	Fermented <i>Ulva</i>	Sabouraud Agar	20	
FRA000046	Y5201	Able to ferment seaweed	Fermented <i>Ulva</i>	Sabouraud Agar	20	10
FRA000047	Y5206	Able to ferment seaweed	Fermented <i>Ulva</i>	Sabouraud Agar	20	10
FRA000048	Y5207	Able to ferment seaweed	Fermented <i>Ulva</i>	Sabouraud Agar	20	
FRA000049	Y5317	Able to ferment seaweed	Fermented <i>Ulva</i>	Sabouraud Agar	20	
FRA000050	Y5318	Able to ferment seaweed	Fermented <i>Ulva</i>	Sabouraud Agar	20	

*¹ 1, Uchida and Nakayama (1993); 2, Uchida (1995); 3, Uchida; (1996); 4, Uchida and Kawamura (1995); 5, Uchida and Numaguchi (1996); 6, Uchida et al. (1997a); 7, Uchida et al. (1997b); 8, Uchida et al. (2002); 9, Uchida et al. (1995); 10, Uchida and Murata (2002); 11, Uchida et al. (2001).

は、20°Cで5日間培養する間毎日1回観察して判定した。

API 50CH試験に使用する菌体試料は、菌体番号 FRA000001, FRA000003, FRA000005~FRA000007, FRA000017~FRA000022, FRA000024については培養液API 50CH E/B (ビオメリュー) 5 mLに、滅菌30%濃度NaCl水溶液0.5mLを添加して調製した改変培養液に、FRA000033~FRA000036については、API 50CHL (ビオメリュー) に、FRA000037~FRA000040については、API 50CHL 5 mLに滅菌30%濃度NaCl水溶液 2 mLを添加して調製した改変培養液に、FRA000041~FRA000050についてはAPI 50CH E/B (ビオメリュー) に、それぞれ菌体をマクファーランド濁度 2 の濃度で懸濁させたものを120 μ Lずつ接種し、滅菌流動パラフィン を 2 滴添加した。API 50CHは、20°Cで5日間培養後判定した。

API zym 20に使用する菌体試料は、上記寒天平板で培養して得た新鮮な菌体を白金耳で掻き採り、滅菌液1.5mLに105~107cells/mLの濃度 (肉眼観察でやや濁りを感じる濃度) で懸濁後、遠心 (10,000rpm, 10min) 洗浄後、同滅菌液に再懸濁したものを65 μ Lずつ接種した。滅菌液は、酵母、乳酸菌、*Bacillus* 属細菌については、0.85%濃度NaCl水溶液を、グラム陰性細菌については 2.5%濃度NaCl水溶液を、魚醤油乳酸菌については 7%濃度NaCl水溶液を使用した。API zym 20は、20°Cで24時間培養後、判定した。一部の菌株については、35°Cで4時間培養して判定結果を比較した。また、一部の菌株については、マコンブ液体培地 (0.1g マコンブ粉末, 9 mL自然海水, 1 mL蒸留水, オートクレーブ滅菌) 入り試験管に菌体を1白金耳接種し、20°C, 5rpmで3日間回転培養 (タイテック, RT-550) して得た菌体画分および培養液上清画分についてもAPI zym 20試験を実施した。菌体画分および培養液上清画分の調製は、培養液を最初に軽く遠心処理 (1,000rpm, 10秒) してマコンブ粒子を取り除いた上清について、遠心処理 (10,000rpm, 10分) して行い、得た菌体を滅菌液に懸濁したものを菌体画分、このときの上清を培養液上清画分とした。

細菌の16S rDNAおよび酵母の18S rDNAの部分配列の決定

寒天平板上のコロニーを採取し、20 μ LのTEバッファに懸濁した後、94°C15分加熱して得た上清1 μ Lを鋳型DNAとし、ユニバーサルプライマーセット27F (5'-AGAGTTTGTATCCTGGCTCAG-3') および 1492R (5'-TACGGTTCCTTGTACGACTT-3') (Weisburg *et al.*, 1991) を使用してPCR増幅を行い、約1.5kbの

16S rDNA断片を得た。27Fプライマーを使用してダイレクトシーケンシング法によりV1-V3領域を含む先頭の約300bpの塩基配列を決定し、DDBJに登録した。一部の菌株についてはほぼ全長域の塩基配列を決定して、DDBJに登録した。また既に塩基配列が決定されている菌株については、アクセッション番号を引用して記載した。決定された塩基配列をもとにBLASTにより統合データベース (DDBJ/EMBL/GenBank) から最近縁種を検索し、この検索結果と一般性状試験及びキット試験の結果をもとに総合的に判断して、供試菌株の分類同定を行った。酵母の場合には、ユニバーサルプライマーセットP1 (5'-ATCTGGTTGATCCTGCCAGT-3') および NS8 (5'-TCCGCAGGTTACCTACGGA-3') (Suzuki and Nakase, 1999) を使用してPCR増幅を行い、約1.8kbの18S rDNA断片を得たのと同様にプライマーNS8を使用して、末端の約300bpの塩基配列を決定し、DDBJへ登録した。酵母についてもBLASTによる最近縁種の検索の結果および既知の性状データを基に分類同定を行った。

結果と考察

基礎性状試験

Table 2 に基礎性状試験の結果を示す。

NF-18試験およびEB-20試験

Table 3 にNF-18試験の結果を、Table 4 にEB-20試験の結果を示す。

API 50CH試験

Table 5 にAPI 50CH試験の結果を示す。

海洋微生物の試験の実施に際しては、通常20°C 2~3日程度の培養で陽性反応が観察できるが、徐々に陽性反応を示す場合もあったため、5日間以上経時的に観察して結果を判定した。FRA 000037株~FRA 000040株は、いずれも1年間室温下で発酵させた白蓮魚醤油試料から分離され、16S rRNA遺伝子の部分塩基配列からいずれも *Tetragenococcus halophilus* と同定された。FRA000037株とFRA000038株およびFRA000039株とFRA000040株は、それぞれ同じ発酵タンクから優占種として分離された経緯があるが、2菌株間の糖質資化性は、それぞれの場合ともいくつかの基質に対して異なっていた。FRA000008株~FRA000013株, FRA000015株~FRA000016株については、本試験を実施しなかったが、これらの菌株は他の性状がFRA000007株とほぼ一致することから、FRA000007株のAPI 50CH試験結果を参照データとして利用できるものと推察される。

Table 2. Phenotypic characteristics of the tested strains

Strain No.	Gram stain	Cell shape	Motility	Flagellar	Spore	OF	Oxidase	Catalase	Pigment	Growth temp. (°C)						NaCl conc. (%)				
										4	20	30	35	40	45	50	0	2.5	5	10
FRA000001	-	Short rod	+	Polar	-	O	+	+	-	+	+	+	+	NT	NT	NT	-	+	-	NT
FRA000002	-	Rod	+	Polar	-	O	+	+	-	+	+	+	+	-	NT	NT	-	+	-	NT
FRA000003	-	Short rod	+	Polar	-	O	+	+	-	+	+	+	+	NT	NT	NT	-	+	-	NT
FRA000004	-	Short rod	+	Polar	-	O	+	+	-	+	+	+	-	NT	NT	NT	-	+	-	NT
FRA000005	-	Rod	+	Polar	-	O	+	+	-	+	+	+	+	NT	NT	NT	-	+	-	NT
FRA000006	-	Short rod	+	Polar	-	O	+	+	-	+	+	+	+	NT	NT	NT	-	+	+	NT
FRA000007	-	Short rod	+	Polar	-	O	+	+	-	+	+	+	-	NT	NT	NT	-	+	-	NT
FRA000008	-	Short rod	+	Polar	-	O	+	+	-	+	+	+	-	NT	NT	NT	-	+	-	NT
FRA000009	-	Short rod	+	Polar	-	O	+	+	-	+	+	+	+	NT	NT	NT	-	+	-	NT
FRA000010	-	Short rod	+	Polar	-	O	+	+	-	+	+	+	-	NT	NT	NT	-	+	-	NT
FRA000011	-	Short rod	+	Polar	-	O	+	+	-	+	+	+	-	NT	NT	NT	-	+	-	NT
FRA000012	-	Short rod	+	Polar	-	O	+	+	-	+	+	+	-	NT	NT	NT	-	+	-	NT
FRA000013	-	Short rod	+	Polar	-	O	+	+	-	+	+	+	+	NT	NT	NT	-	+	-	NT
FRA000014	-	Rod	+	Polar	-	O	+	+	-	+	+	+	+	NT	NT	NT	-	+	-	NT
FRA000015	-	Short rod	+	Polar	-	O	+	+	-	+	+	+	+	NT	NT	NT	-	+	-	NT
FRA000016	-	Short rod	+	Polar	-	O	+	+	-	+	+	+	+	NT	NT	NT	-	+	-	NT
FRA000017	-	Rod	+	Polar	-	O	+	+	-	+	+	+	+	NT	NT	NT	-	+	-	NT
FRA000018	-	Short rod	+	Polar	-	O	+	+	-	-	+	-	-	NT	NT	NT	-	+	-	NT
FRA000019	-	Short rod	+	Polar	-	O	+	+	-	+	+	+	+	NT	NT	NT	-	+	-	NT
FRA000020	-	Short rod	+	NT	-	-	-	+	-	+	+	+	+	NT	NT	NT	-	+	-	NT
FRA000021	-	Rod	+	Polar	-	O	+	+	-	+	+	+	+	NT	NT	NT	-	+	-	NT
FRA000022	-	Short rod	+	Polar	-	O	+	+	-	+	+	+	+	NT	NT	NT	-	+	-	NT
FRA000023	-	Short rod	+	Polar	-	O	+	+	-	+	+	+	+	NT	NT	NT	-	+	-	NT
FRA000024	-	Short rod	+	Polar	-	O	+	+	-	+	+	+	+	NT	NT	NT	-	+	-	NT
FRA000025	-	Rod	+	Polar	-	O	+	+	-	+	+	+	+	NT	NT	NT	-	+	+	NT
FRA000026	-	Short rod	+	Polar	-	O	+	+	-	+	+	+	+	NT	NT	NT	-	+	+	NT
FRA000027	-	Rod	+	Polar	-	O	+	+	-	+	+	+	+	NT	NT	NT	-	+	-	NT
FRA000028	-	Rod	+	Polar	-	O	+	+	-	+	+	+	+	NT	NT	NT	-	+	-	NT
FRA000029	-	Rod	+	Polar	-	O	+	+	-	-	+	+	+	NT	NT	NT	-	+	-	NT
FRA000030	-	Rod	+	Polar	-	O	+	+	-	+	+	+	+	NT	NT	NT	-	+	-	NT
FRA000031	-	Rod	+	Polar	-	O	+	+	-	+	+	+	+	NT	NT	NT	-	+	-	NT
FRA000032	-	Rod	-	-	-	O	+	+	Yellow	-	+	+	+	NT	NT	NT	-	+	-	NT
FRA000033	+	Rod	-	-	-	F	-	-	-	NT	+	+	+	+	NT	NT	-	+	+	NT
FRA000034	+	Rod	-	-	-	F	-	-	-	NT	+	+	+	+	NT	NT	-	+	+	NT
FRA000035	+	Rod	-	-	-	F	-	-	-	NT	+	+	+	+	NT	NT	-	+	+	NT
FRA000036	+	Rod	-	-	-	F	-	-	-	NT	+	+	+	+	NT	NT	-	+	+	NT
FRA000037	+	Short Rod, Tetrads or pairs	-	-	-	F	-	-	-	NT	+	+	+	+	NT	NT	-	+	+	+
FRA000038	+	Short Rod, Tetrads or pairs	-	-	-	F	-	-	-	NT	+	+	+	+	NT	NT	-	+	+	+
FRA000039	+	Short Rod, Tetrads or pairs	-	-	-	F	-	-	-	NT	+	+	+	+	NT	NT	-	+	+	+
FRA000040	+	Short Rod, Tetrads or pairs	-	-	-	F	-	-	-	NT	+	+	+	+	NT	NT	-	+	+	+
FRA000041	+	Rod	+	NT	+	-	-	+	-	NT	+	+	+	+	+	-	+	+	+	NT
FRA000042	+	Rod	+	NT	+	-	-	+	-	NT	+	+	+	+	+	-	+	+	+	NT
FRA000043	+	Rod	+	NT	+	-	-	+	-	NT	+	+	+	+	+	-	+	+	+	NT
FRA000044	+	Rod	+	NT	+	-	-	+	-	NT	+	+	+	+	+	-	+	+	+	NT
FRA000045	+	Spherical~slightly oval	-	-	+	F	-	+	-	NT	+	+	+	+	NT	NT	+	+	+	-
FRA000046	+	Spherical~slightly oval	-	-	+	F	-	+	-	NT	+	+	+	+	NT	NT	+	+	+	-
FRA000047	+	Oval	-	-	-	F	-	+	-	NT	+	+	+	-	NT	NT	+	+	+	-
FRA000048	+	Oval	-	-	-	F	-	+	-	NT	+	+	+	-	NT	NT	+	+	+	-
FRA000049	+	Spherical~slightly oval	-	-	NT	F	-	+	-	NT	+	+	+	+	NT	NT	+	+	+	-
FRA000050	+	Spherical~slightly oval	-	-	NT	F	-	+	-	NT	+	+	+	+	NT	NT	+	+	+	-

NT: Not tested

Table 3. Results of the NF-18 tests

Strain No.	GLU	FRU	MLT	GAL	XYL	MAN	SUC	LAC	ESC	URE	CIT	ONPG	LDC	ADH	ODC	IND	NIT	GEL
FRA000001	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
FRA000002	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	±	+	-	-	+
FRA000003	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
FRA000004	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+
FRA000005	+	+	+	+	-	+	+	+	+	±	-	+	-	-	+	-	+	-
FRA000006	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+
FRA000007	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-
FRA000008	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	±	±	+	-	-	-
FRA000009	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	±	+	-	+	-
FRA000010	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	±	±	±	-	+	-
FRA000011	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	±	±	+	-	+	-
FRA000012	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	±	±	±	-	+	-
FRA000013	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	±	±	+	-	+	-
FRA000014	+	+	+	+	±	-	+	+	+	+	-	-	±	±	+	-	-	+
FRA000015	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	±	±	±	-	+	-
FRA000016	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-
FRA000017	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	±	±	+	-	+	+
FRA000018	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+
FRA000019	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	±	-	+	-	+	+
FRA000020	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	±	+	+	-	-	-
FRA000021	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-
FRA000022	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
FRA000023	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	±	±	+	-	+	+
FRA000024	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	±	+	-	+	-
FRA000025	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+
FRA000026	+	±	+	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+
FRA000027	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+
FRA000028	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	±	±	+	-	+	+
FRA000029	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+
FRA000030	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	±	±	±	-	+	+
FRA000031	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+
FRA000032	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	±	±	±	-	-	-

+, positive, ±; not clear, -; negative. GLU; glucose test, FRU; fructose test, MLT; maltose test, GAL; galactose test, XYL; xylose test, MAN; mannitol test, SUC; sucrose test, LAC; lactose test, ESC; esculin test, URE; urease test, CIT; citrate test, ONPG; ortho-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside test, LDC; lysine decarboxylase test, ADH; arginine dehydrolase test, ODC; ornithine decarboxylase test, IND; Indole test, NIT; nitrase test, GEL; gelatin test. Test plates were cultured for 5 days at 20°C.

Table 4. Results of the EB-20 tests

Strain No.	H2S	ESC	PPA	IND	VP	CIT	LDC	ADH	ODC	ONPG	URE	MALO	ADO	INO	RAFF	RHA	SOR	SUC	MAN	ARA	
FRA000033	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	±	±	+
FRA000034	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	±	±	±	+
FRA000035	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	±	+	+	+	+	-
FRA000036	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	±	+	+	+	+	-
FRA000037	-	-	-	±	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
FRA000038	-	±	-	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FRA000039	-	-	-	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FRA000040	-	+	-	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	±	+	+
FRA000041	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FRA000042	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FRA000043	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FRA000044	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FRA000045	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
FRA000046	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
FRA000047	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
FRA000048	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
FRA000049	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
FRA000050	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+

+, positive, ±; not clear, -; negative. H2S; Hydrogen sulfide test, ESC; esculin test, PPA; phenylalanine test, IND; Indole test, VP; Voges Proskauer test, CIT; citrate test, LDC; lysine decarboxylase test, ADH; arginine dehydrolase test, ODC; ornithine decarboxylase test, ONPG; ortho-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside test, URE; urease test, MALO; malonic acid test, ADO; adonite test; INO; inositol test, RAFF; raffinose test, RHA; rhamnose test, SOR; sorbitol test, SUC; sucrose test, MAN; mannite test, ARA; levo-arabinose test. Test plates were cultured for 5 days at 20°C.

API zym20試験

Table 6 にAPI zym20試験の結果を示す。

データを収集するにあたり、測定条件について、FRA000001株、FRA000005株およびFRA000045株を対象として、若干の検討を加えた。まず、細菌の調製法について、前者2株を被験株としてMarine Broth寒天培地で培養後菌体を掻きとって細胞懸濁液を調製した場合とマコンブ液体培地で培養後遠心処理により集菌して細胞懸濁液を調製した場合とで比較した。その結果、2株の場合とも前者の方が酵素活性の陽性項目が多い傾向が認められた。またマコンブ液体培地で培養後遠心処理により集菌して得た細胞懸濁液と培養上清液とを被験試料として比較した。その結果、ほぼ同じ結果か、幾分前者の方が陽性項目が多くなる傾向があった。反応温度条件については、20℃24時間と35℃4時間とで比較した。その結果、試料により若干陽性項目に違いがみられたが、細胞懸濁液を被験試料とする場合に限って言えば、20℃24時間反応の方が若干優れる傾向があった。以上の検討結果を踏まえ、寒天平板培地で培養した菌体を掻きとって調製した菌体懸濁液を被験試料とし、反応条件は20℃24時間として分析することを基本とした。なおFRA000037株～FRA000040株は、増殖速度が遅いことを考慮して反応条件は20℃43時間とした。

16S rDNAおよび18S rDNAの部分配列に基づいた近縁種の検索と同定結果

各菌株について16S rDNAおよび18S rDNAの部分配列を決定し、DDBJに登録して得たアクセッション番号をTable 7 に記載した。さらに決定された塩基配列をBLAST検索にかけ最近縁種を示すとともに、最近縁種の塩基配列と相違する塩基数を示した。同定は、rDNAの部分塩基配列の情報と性状試験の結果から総合的に判断して行った。FRA000003株、FRA000004株、FRA000023株、FRA000024株は、酸産生により判断した炭素源資化性試験において、マンノース陽性、フルクトース陽性であることから*Pseudoalteromonas haloplanctis*と同定された (Ivanova *et al.*, 2001)。FRA000005株は、16S rDNAの後半861塩基の配列 (AB106188) に基づいてデータベース上で検索した最近縁種は*Pseudoalteromonas citrea*であったが、マンノース陰性、ガラクトース陰性、トレハロース陰性であることから*Pseudoalteromonas carraginosora*と暫定的に同定した (Sawabe *et al.*, 2000)。FRA000017株～FRA000019株、FRA000022株、FRA000027株は、マンノース陽性、ガラクトース陽性、スクロース陽性、マルトース陽性、グルコネート陰性、トレハロース陰

性であることから*Pseudoalteromonas elyakovii*と同定された (Sawabe *et al.*, 2000)。FRA000025株、FRA000026株は、マンノース陰性、ガラクトース陽性、フルクトース陰性、スクロース陽性、マルトース陽性であることから*Pseudoalteromonas tetraodonis*と同定された (Sawabe *et al.*, 2000)。FRA000028株、FRA000030株、FRA000031株は、Bergey's Manual (Baumann *et al.*, 1984) に記載された性状と比較して*Alteromonas macleodii*と同定された。乳酸菌については、Bergey's Manual (Kandler and Weiss, 1984) およびCollins *et al.* (1990) により記載された性状と比較してTable 7 のとおり同定された。FRA000041株、FRA000043株は、Claus and Berkeley (1984) により記載された性状と比較して*Bacillus cereus*と同定された。FRA000046株、FRA000047株は、The Yeast (Kurtzman and Fell, 1998) に記載された性状と比較して*Debaryomyces hansenii* var. *hansenii*と同定された。残りの22株については、今回の試験データだけでは種までの特定ができなかった。これらの株の種の同定については、より変異の大きい遺伝子の塩基配列の決定が必要と考えられた。

Table 6 Results of the API zym20 tests

Strain No.	Enzymes																	Test method			
	Alkali-phosphatase	Esterase (C4)	Esterase (C8)	Lipase (C14)	Leucine-allylamidase	Varine-Allylamidase	Cystein-allylamidase	Trypsin	Chymotrypsin	Acidic phosphatase	Naphthol-AS-BI-phosphohydrolase	α -Galactosidase	β -Galactosidase	β -Glucuronidase	α -Glucosidase	β -Glucosidase	N-Acetyl- β -Glucosaminidase	α -Mannosidase	α -Fucosidase	Sample preparation	Reacted conditions
FRA000001	+	+	+	±	+	+w	±	-	-	+w	+w	-	±	-	+w	-	-	-	-	Cells	20°C 24h
	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	Cells (L) ^{*1}	20°C 24h
	±	-	±	-	±	-	-	-	-	±	+	-	-	-	-	-	-	-	-	Cells (L) ^{*1}	35°C 4h
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Culture sup.(L) ^{*2}	20°C 24h
	±	-	±	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	Culture sup.(L) ^{*2}	35°C 4h
FRA000002	+	+w	+w	+w	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	±	Cells	20°C 24h
FRA000003	+	+w	+w	+w	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	Cells	20°C 24h
FRA000004	+	+w	+	+w	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	Cells	20°C 24h
FRA000005	+	+w	+	+w	+	+	+	+	+	+	+	+w	+	-	+	-	-	-	-	Cells	20°C 24h
	+	±	-	-	+	-	-	-	-	+w	+	-	-	-	-	-	-	-	-	Cells (L) ^{*1}	20°C 24h
	+	±	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Cells (L) ^{*1}	35°C 4h
	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	Culture sup.(L) ^{*2}	20°C 24h
	+	-	±	-	+	-	-	-	-	±	+	-	-	-	-	-	-	-	-	Culture sup.(L) ^{*2}	35°C 4h
FRA000006	+	+w	+	+w	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	Cells	20°C 24h
FRA000007	+	+	+	+	+	+	+	+w	+	+	+	+	-	+w	+w	-	-	-	-	Cells	20°C 24h
FRA000008	+	+	+	±	+	+	+	+w	+	+	+	+	±	+	+	-	-	-	-	Cells	20°C 24h
FRA000009	+	+	+	-	+	+	+	+w	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	Cells	20°C 24h
FRA000010	+	+	+	±	+	+	+	+w	+	+	+	+	-	+	+w	-	-	-	-	Cells	20°C 24h
FRA000011	+	+	+	-	+	+	+	+w	+w	-	+	+w	-	+w	+w	-	-	-	-	Cells	20°C 24h
FRA000012	+	+	+	±	+	+	+w	+w	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	Cells	20°C 24h
FRA000013	+	+w	+	-	+	+	+w	+w	+	+	+	+	-	+w	+w	-	-	-	-	Cells	20°C 24h
FRA000014	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	Cells	20°C 24h
FRA000015	+	+	+	±	+	+	+	+w	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	Cells	20°C 24h
FRA000016	+	+	+	-	+	+	+	+w	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	Cells	20°C 24h
FRA000017	+	+	+	±	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	Cells	20°C 24h
FRA000018	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	Cells	20°C 24h
FRA000019	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+w	-	+	-	-	-	-	-	Cells	20°C 24h
FRA000020	+	+	+	-	±	±	-	-	+	+w	+w	+w	±	+	±	±	±	±	±	Cells	20°C 24h
FRA000021	+	+	+	±	+	+	+w	±	±	+w	+w	-	+	±	+w	-	-	-	-	Cells	20°C 24h
FRA000022	+	+	+	±	+	+	+	+	+	+	±	±	-	+	-	-	-	-	-	Cells	20°C 24h
FRA000023	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	Cells	20°C 24h
FRA000024	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	±	-	-	-	-	-	Cells	20°C 24h
FRA000025	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	Cells	20°C 24h
FRA000026	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+w	-	-	-	-	-	Cells	20°C 24h
FRA000027	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	Cells	20°C 24h
FRA000028	+	+	+	+w	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+w	-	-	-	-	Cells	20°C 24h
FRA000029	+	+	+	-	+	+	+	+w	±	±	+	+	-	-	-	-	-	-	-	Cells	20°C 24h
FRA000030	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+w	±	-	-	-	-	Cells	20°C 24h
FRA000031	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	±	±	-	-	+	-	-	-	Cells	20°C 24h
FRA000032	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	±	±	Cells	20°C 24h
FRA000033	+w	+	+	±	+	+	±	±	±	±	+	+	+	+	+	-	-	-	-	Cells	20°C 24h
FRA000034	+w	+	+w	+w	+	+	+	±	±	±	±	±	+	+	+	-	-	-	-	Cells	20°C 24h
FRA000035	+	+	+	+w	+	+	±	±	±	±	±	±	+	±	+w	+w	-	+	-	Cells	20°C 24h
FRA000036	+	+w	±	±	+	+w	±	±	±	±	±	-	+	-	+	+w	-	+	-	Cells	20°C 24h
FRA000037	+	+	±	±	-	-	-	±	±	±	±	-	-	-	-	-	-	-	-	Cells	20°C 43h
FRA000038	-	+w	+w	+w	+	+	+w	-	-	+w	+	-	-	+w	+	-	-	-	-	Cells	20°C 43h
FRA000039	-	-	-	-	+	+w	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	Cells	20°C 43h
FRA000040	-	-	-	-	+w	+w	-	-	-	+w	+w	-	-	-	+w	-	-	-	-	Cells	20°C 43h
FRA000041	-	+w	+w	-	±	-	-	±	+w	+w	-	-	-	+	-	-	-	-	-	Cells	20°C 24h
FRA000042	+	+	+	-	+	+	+	+w	+w	+	+w	+w	-	+w	+w	+w	+w	+w	-	Cells	20°C 24h
FRA000043	+w	+	+	-	±	±	-	-	+	+w	-	-	-	+	-	-	-	-	-	Cells	20°C 24h
FRA000044	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+w	+w	-	+w	+w	+w	+w	+w	-	Cells	20°C 24h
FRA000045	+w	+	+	±	+	+	+w	-	-	+	+w	+w	-	-	+	-	-	-	-	Cells	20°C 24h
	+	+	+	±	+	+w	+w	±	±	±	±	-	-	-	-	-	-	-	-	Cells	35°C 4h
FRA000046	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	Cells	20°C 24h
FRA000047	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	Cells	20°C 24h
FRA000048	+	+	+	+w	+	+	+w	±	±	±	±	-	-	-	-	-	+	-	-	Cells	20°C 24h
FRA000049	+	+	+	±	+	+	+	+w	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	Cells	20°C 24h
FRA000050	+	+	+	±	+	+	+	±	±	±	±	+	-	-	+	+	-	-	-	Cells	20°C 24h

*1 The bacterial cells were prepared by being cultured on a medium containing 0.1g *Laminaria japonica*, 9ml seawater, and 1ml distilled water, collected by centrifuge, and suspended in 2.5% NaCl solution.

*2 Supernatant was collected by centrifuge after culturing bacterial cells on a medium containing 0.1g *L. japonica*, 9ml seawater, and 1ml distilled water.

+, positive, +w; positive but weak activity, ±; not clear, -; negative.

Table 7. (1/2) Identification of the 50 strains tested in the present study

Strain No.	16S/18S rDNA Accession No.	Most neighbor species	No. of different seq./determined seq. (bp)	Key characteristics (Utilization)	Concluded species	References
FRA000001	AB106185 AB106186	<i>Roseobacter</i> sp.	5/271		Alpha proteobacteria	
FRA000002	AB049728	<i>Pseudoalteromonas atlantica</i>	1/1424		<i>Pseudoalteromonas atlantica</i>	Uchida <i>et al.</i> 2002
FRA000003	AB105549	<i>Pseudoalteromonas haloplanktis</i> , <i>Pseudoalteromonas tetraodonis</i>	0/320	Mannose+ Galactose+ Fructose+ Trehalose-	<i>Pseudoalteromonas haloplanktis</i>	Ivanova <i>et al.</i> , 2001
FRA000004	AB105550	<i>Pseudoalteromonas haloplanktis</i> , <i>Pseudoalteromonas tetraodonis</i>	0/320	Mannose+ Galactose+ Fructose+ Trehalose-	<i>Pseudoalteromonas haloplanktis</i>	Ivanova <i>et al.</i> , 2001
FRA000005	AB106187	<i>Pseudoalteromonas atlantica</i> , <i>Pseudoalteromonas carrageenovora</i>	0/262	Mannose- Galactose- Trehalose-	<i>Pseudoalteromonas carraginovora</i>	Sawabe <i>et al.</i> , 2000
	AB106188	<i>Pseudoalteromonas citrea</i>	1/861			
FRA000006	AB106189	<i>Pseudoalteromonas elyakovii</i> , <i>Pseudoalteromonas agarovorans</i>	11/1463		<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	
FRA000007	AB049729	<i>Glaciecola punicea</i>	37/1367		<i>Glaciecola</i> sp.	Uchida <i>et al.</i> 2002
FRA000008	AB106190	<i>Glaciecola pallidula</i>	21/320		<i>Glaciecola</i> sp.	
FRA000009	AB106191	<i>Glaciecola pallidula</i>	21/298		<i>Glaciecola</i> sp.	
FRA000010	AB106192	<i>Glaciecola pallidula</i>	21/313		<i>Glaciecola</i> sp.	
FRA000011	AB106193	<i>Glaciecola pallidula</i>	21/320		<i>Glaciecola</i> sp.	
FRA000012	AB106194	<i>Glaciecola pallidula</i>	21/312		<i>Glaciecola</i> sp.	
FRA000013	AB106195	<i>Glaciecola pallidula</i>	21/317		<i>Glaciecola</i> sp.	
FRA000014	AB106196	<i>Pseudoalteromonas agarovorans</i> , <i>Pseudoalteromonas elyakovii</i>	0/317			
	AB106197	<i>Pseudoalteromonas distincta</i> , <i>Pseudoalteromonas elyakovii</i> , <i>Pseudoalteromonas tetraodonis</i>	0/558	Mannose- Lactose+	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	Sawabe <i>et al.</i> , 2000
FRA000015	AB106198	<i>Glaciecola punicea</i>	13/231		<i>Glaciecola</i> sp.	
FRA000016	AB106199	<i>Glaciecola pallidula</i>	21/320		<i>Glaciecola</i> sp.	
FRA000017	AB106200	<i>Pseudoalteromonas citrea</i> , <i>Pseudoalteromonas distincta</i> , <i>Pseudoalteromonas elyakovii</i> , <i>Pseudoalteromonas nigrifaciens</i>	0/319	Mannose+ Galactose+ Sucrose+ Maltose+ Gluconate- Citrate- Trehalose-	<i>Pseudoalteromonas elyakovii</i>	Sawabe <i>et al.</i> , 2000
	AB106201	<i>Pseudoalteromonas agarovorans</i> , <i>Pseudoalteromonas distincta</i> , <i>Pseudoalteromonas elyakovii</i> , <i>Pseudoalteromonas tetraodonis</i>	0/561			
FRA000018	AB106202	<i>Pseudoalteromonas agarovorans</i> , <i>Pseudoalteromonas citrea</i> , <i>Pseudoalteromonas elyakovii</i>	0/319			
	AB106203	<i>Pseudoalteromonas agarovorans</i> , <i>Pseudoalteromonas atlantica</i> , <i>Pseudoalteromonas citrea</i> , <i>Pseudoalteromonas distincta</i> , <i>Pseudoalteromonas elyakovii</i> , <i>Pseudoalteromonas nigrifaciens</i> , <i>Pseudoalteromonas tetraodonis</i>	0/316	Mannose+ Galactose+ Sucrose+ Maltose+ Gluconate- Citrate- Trehalose-	<i>Pseudoalteromonas elyakovii</i>	Sawabe <i>et al.</i> , 2000
FRA000019	AB106204	<i>Pseudoalteromonas atlantica</i> , <i>Pseudoalteromonas citrea</i> , <i>Pseudoalteromonas distincta</i> , <i>Pseudoalteromonas elyakovii</i> , <i>Pseudoalteromonas nigrifaciens</i>	0/319	Mannose+ Galactose+ Sucrose+ Maltose+ Gluconate- Citrate- Trehalose-	<i>Pseudoalteromonas elyakovii</i>	Sawabe <i>et al.</i> , 2000
	AB106205	<i>Pseudoalteromonas agarovorans</i> , <i>Pseudoalteromonas distincta</i> , <i>Pseudoalteromonas elyakovii</i> , <i>Pseudoalteromonas tetraodonis</i>	0/558			
FRA000020	AB106206	<i>Halomonas marina</i>	1/296		<i>Halomonas</i> sp.	
FRA000021	AB106207	<i>Marinomonas protea</i>	10/305		<i>Gamma proteobacteria</i>	
FRA000022	AB106208	<i>Pseudoalteromonas agarovorans</i> , <i>Pseudoalteromonas atlantica</i> , <i>Pseudoalteromonas citrea</i> , <i>Pseudoalteromonas distincta</i> , <i>Pseudoalteromonas elyakovii</i> , <i>Pseudoalteromonas nigrifaciens</i> , <i>Pseudoalteromonas tetraodonis</i>	0/220	Mannose+ Galactose+ Sucrose+ Maltose+ Gluconate- Citrate+ Trehalose-	<i>Pseudoalteromonas elyakovii</i>	Sawabe <i>et al.</i> , 2000
FRA000023	AB106209	<i>Pseudoalteromonas haloplanktis</i> , <i>Pseudoalteromonas tetraodonis</i>	0/296	Mannose+ Fructose+	<i>Pseudoalteromonas haloplanktis</i>	Ivanova <i>et al.</i> , 2001
FRA000024	AB106210	<i>Pseudoalteromonas haloplanktis</i> , <i>Pseudoalteromonas tetraodonis</i>	0/315	Mannose+ Fructose+	<i>Pseudoalteromonas haloplanktis</i>	Ivanova <i>et al.</i> , 2001

Table 7. (2/2)

Strain No.	16S/18S rDNA Accession No.	Most neighbor species	No. of different seq./determined seq. (bp)	Key characteristics (Utilization)	Concluded species	References
FRA000025	AB106211	<i>Pseudoalteromonas agarovorans</i> , <i>Pseudoalteromonas citrea</i> , <i>Pseudoalteromonas distincta</i> , <i>Pseudoalteromonas elyakovii</i> , <i>Pseudoalteromonas haloplanktis</i> , <i>Pseudoalteromonas nigrifaciens</i> , <i>Pseudoalteromonas tetraodonis</i>	0/223	Mannose- Galactose+ Fructose- Sucrose+ Maltose+	<i>Pseudoalteromonas tetraodonis</i>	Ivanova <i>et al.</i> , 2001
FRA000026	AB106212	<i>Pseudoalteromonas agarovorans</i> , <i>Pseudoalteromonas citrea</i> , <i>Pseudoalteromonas distincta</i> , <i>Pseudoalteromonas elyakovii</i> , <i>Pseudoalteromonas haloplanktis</i> , <i>Pseudoalteromonas tetraodonis</i>	0/227	Mannose- Galactose+ Fructose- Sucrose+ Maltose+	<i>Pseudoalteromonas tetraodonis</i>	Ivanova <i>et al.</i> , 2001
FRA000027	AB106213	<i>Pseudoalteromonas agarovorans</i> , <i>Pseudoalteromonas citrea</i> , <i>Pseudoalteromonas distincta</i> , <i>Pseudoalteromonas elyakovii</i> , <i>Pseudoalteromonas nigrifaciens</i>	0/277	Mannose+ Galactose+ Sucrose+ Maltose+ Citrate-	<i>Pseudoalteromonas elyakovii</i>	Sawabe <i>et al.</i> , 2000
FRA000028	AB106215	<i>Alteromonas macleodii</i>	0/298		<i>Alteromonas macleodii</i>	Baumann <i>et al.</i> , 1984
FRA000029	AB106216	<i>Glaciecola pallidula</i>	22/307		<i>Glaciecola</i> sp.	
FRA000030	AB106217	<i>Alteromonas macleodii</i>	0/303		<i>Alteromonas macleodii</i>	Baumann <i>et al.</i> , 1984
FRA000031	AB106218	<i>Alteromonas macleodii</i>	0/305		<i>Alteromonas macleodii</i>	Baumann <i>et al.</i> , 1984
FRA000032	AB106219	<i>Cytophaga fucicola</i>	0/105		<i>Cytophaga</i> sp.	
FRA000033	AB070607	<i>Lactobacillus brevis</i>	0/1475		<i>Lactobacillus brevis</i>	Kandler and Weiss, 1984
FRA000034	AB106341	<i>Lactobacillus brevis</i>	0/326		<i>Lactobacillus brevis</i>	Kandler and Weiss, 1984
FRA000035	AB070609	<i>Lactobacillus casei</i>	0/1488		<i>Lactobacillus casei</i>	Kandler and Weiss, 1984
FRA000036	AB106342	<i>Lactobacillus casei</i>	0/328		<i>Lactobacillus casei</i>	Kandler and Weiss, 1984
FRA000037	AB041347	<i>Tetragenococcus halophilus</i>	6/1491		<i>Tetragenococcus halophilus</i>	Collins <i>et al.</i> , 1990
FRA000038	AB106343	<i>Tetragenococcus halophilus</i>	0/316		<i>Tetragenococcus halophilus</i>	Collins <i>et al.</i> , 1990
FRA000039	AB041349	<i>Tetragenococcus halophilus</i>	5/1495		<i>Tetragenococcus halophilus</i>	Collins <i>et al.</i> , 1990
FRA000040	AB106344	<i>Tetragenococcus halophilus</i>	1/320		<i>Tetragenococcus halophilus</i>	Collins <i>et al.</i> , 1990
FRA000041	AB106345	<i>Bacillus cereus</i>	0/1470		<i>Bacillus cereus</i>	Claus and Berkeley., 1984
FRA000042	AB106346	<i>Bacillus sphaericus</i>	12/1413		<i>Bacillus</i> sp.	
FRA000043	AB106347	<i>Bacillus cereus</i>	0/258		<i>Bacillus cereus</i>	Claus and Berkeley., 1984
FRA000044	AB106348	<i>Bacillus sphaericus</i>	9/329		<i>Bacillus</i> sp.	
FRA000045	AB106349	<i>Debaryomyces hansenii</i> var. <i>hansenii</i>	2/1752		<i>Debaryomyces hansenii</i> var. <i>hansenii</i>	Kurtzman and Fell, 1998
FRA000046	AB070854	<i>Debaryomyces hansenii</i> var. <i>hansenii</i>	2/1752		<i>Debaryomyces hansenii</i> var. <i>hansenii</i>	Kurtzman and Fell, 1998
FRA000047	AB070855	<i>Candida zeylanoides</i>	8/1750		<i>Candida</i> sp.	
FRA000048	AB106350	<i>Candida zeylanoides</i>	8/1750		<i>Candida</i> sp.	
FRA000049	AB106351	<i>Debaryomyces hansenii</i> var. <i>fabryi</i>	6/1752		<i>Debaryomyces</i> sp.	
FRA000050	AB070856	<i>Debaryomyces hansenii</i> var. <i>fabryi</i>	6/1752		<i>Debaryomyces</i> sp.	

文 献

Baumann P., Gauthier M. J., and Baumann L., 1984:

Genus *Alteromonas*, in "Bergey's manual of systematic bacteriology" (ed. by Holt, J. G.), Vol. 1, The William & Wilkins, Baltimore, pp. 342-352.

Claus D. and Berkeley R. C. W., 1984: Genus

Bacillus, in "Bergey's manual of systematic bacteriology" (ed. by Holt, J. G.), Vol. 2, The William & Wilkins, Baltimore, pp. 1105-1139.

Collins M. D., Williams A. M., and Wallbanks S., 1990: The phylogeny of *Aerococcus* and *Pediococcus* as determined by 16S rRNA sequence analysis: description of *Tetragenococcus* gen. nov. *FEMS Microbiol. Lett.*, **70**, 255-262.

- 長谷川武治, 1990: 微生物の分類と同定, 第2版, 学会出版センター, 東京, 454pp.
- Ivanova E. P., Romanenko L. A., Matte M. H., Matte G. R., Lysenko A. M., Simidu U., Kita-Tsakamoto K., Sawabe T., Vysotskii M. V., Frolova G. M., Mikhailov V., Christen R., and Colwell R. R., 2001: Retrieval of the species *Alteromonas tetraodonis* Shimidu *et al.* 1990 as *Pseudoalteromonas tetraodonis* comb. Nov. and emendation of description. *Int. J. Sys. Evol. Microbiol.*, **51**, 1071-1078.
- 門田 元, 多賀信夫, 1985: 海洋微生物研究法, 第1版, 学会出版センター, 東京, 307pp.
- Kandler O. and Weiss N., 1984: Genus *Lactobacillus*, in "Bergey's manual of systematic bacteriology" (ed. by Holt, J. G.), Vol. 2, The William & Wilkins, Baltimore, pp. 1209-1234.
- 河合 章, 杉田治男, 出口吉昭, 1988: 水族環境学実験, 恒星社厚生閣, 東京, pp. 47-104.
- Kurtzman C. P. and Fell J. W., 1998: The Yeasts, A Taxonomic Study 4th edition, Elsevier Science, New York, 1055pp.
- Sawabe T., Tanaka R., Iqbal M. M., Tajima K., Ezura Y., Ivanova E. P., and Christen R., 2000: Assignment of *Alteromonas elyakovii* KMM162^T and five strains isolated from spot-wounded fronds of *Laminaria japonica* to *Pseudoalteromonas elyakovii* comb. Nov. and the extended description of the species. *Int. J. Sys. Evol. Microbiol.*, **50**, 265-271.
- Suzuki M. and Nakase T., 1999: A phylogenetic study of ubiquinone Q-8 species of the genera *Candida*, *Pichia*, and *Citeromyces* based on 18S ribosomal DNA sequence divergence. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **45**, 239-246.
- Uchida M. and Nakayama A., 1993: Isolation of *Laminaria*-frond decomposing bacteria from Japanese coastal waters. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **59**, 1865-1871.
- Uchida M., 1995: Enzyme activities of marine bacteria involved in *Laminaria*-thallus decomposition and the resulting sugar release. *Mar. Biol.*, **123**, 639-644.
- Uchida M. and Kawamura T., 1995: Production of growth-promoting materials for marine benthic diatoms, *Cylindrotheca closterium* and *Navicula ramosissima*, during microbial decomposition of *Laminaria* thallus. *J. Mar. Biotechnol.*, **2**, 73-77.
- Uchida M., Nakayama A., and Abe S., 1995: Distribution and characterization of bacteria capable of decomposing brown algae fronds in waters associated with *Laminaria* vegetation. *Fish. Sci.*, **61**, 117-120.
- Uchida M., 1996: Formation of single cell detritus densely covered with bacteria during experimental degradation of *Laminaria japonica* thalli. *Fish. Sci.*, **62**, 731-736.
- Uchida M. and Numaguchi K., 1996: Formation of protoplasmic detritus with characteristics favorable as food for secondary animals during microbial decomposition of *Ulva pertusa* (Chlorophyta) frond. *J. Mar. Biotechnol.*, **4**, 200-206.
- Uchida M., Nakata K., and Maeda M., 1997a: Introduction of detrital food webs into an aquaculture system by supplying single cell algal detritus produced from *Laminaria japonica* as a hatchery diet for *Artemia* nauplii. *Aquaculture*, **154**, 125-137.
- Uchida M., Nakata K., and Maeda M., 1997b: Conversion of *Ulva* fronds to a hatchery diet for *Artemia* nauplii utilizing degrading and attaching abilities of *Pseudoalteromonas espejiana*. *J. Appl. Phycol.*, **9**, 541-549.
- Uchida M., Ou J., Chen B., Satomi M., and Fukuda Y., 2001: Development of a gravy product from Chinese freshwater fish. *JIRCAS Working Report*, **20**, 49-54.
- Uchida M., Maeda T., Shiba T., 2002: Phylogenetic analysis of three marine bacteria able to decompose *Laminaria japonica* frond. *Fish. Sci.*, **68**, 703-705.
- Uchida M. and Murata M., 2002: Fermentative preparation of single cell detritus from seaweed, *Undaria pinnatifida*, suitable as a replacement hatchery diet for unicellular algae. *Aquaculture*, **207**, 345-357.
- Weisburg W. G., Barns S. M., Pelletier D. A., and Lane D. J., 1991: 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.*, **173**, 697-703.