

マコンブ穴あき症藻体からの *Pseudoalteromonas elyakovii* 菌株の分離

澤辺 智雄, 成田 幹夫, 田中 礼士  
生地 暢, 田島 研一, 絵面 良男

(1999年5月31日受付)

Isolation of *Pseudoalteromonas elyakovii* Strains from Spot-Wounded Fronds of *Laminaria japonica*

Tomoo Sawabe,\* Mikio Narita,\* Reiji Tanaka,\*  
Masashi Onji,\* Kenichi Tajima,\* and Yoshio Ezura\*

Spot-disease of *Laminaria* fronds has been occasionally observed in coastal areas of Hokkaido Japan. A huge outbreak of the disease occurred in *Laminaria japonica* near the southeastern part of Hokkaido in 1998. Three bacterial strains showing *Laminaria*-frond degrading activity were isolated from the spot-wounded fronds of *L. japonica* collected at Minamikayabe, Hokkaido, Japan. All the strains were tentatively identified as *Alteromonas* strain, and two of them were identified as *Pseudoalteromonas elyakovii*, of which the species included an alginolytic marine bacterium isolated from a spot-disease of *Laminaria japonica* var. *ochotensis* occurring at Rishiri Island at 1985. The phenotypic and genotypic characterizations of the *Laminaria*-frond degrading bacteria were described.

キーワード: *Pseudoalteromonas elyakovii*, 穴あき症, コンブ, コンブ葉体分解性細菌

1985年に利尻島の養殖利尻コンブ *Laminaria japonica* var. *ochotensis* に、海洋動物による食害とは異なる多数の穴あき斑点症状を呈する個体が確認された。穴あき斑点症状を呈した個体は、穴あき患部の拡大により、藻体が枯死し、この年の利尻コンブの収穫に大きな損害を与えた。利尻島でのコンブ穴あき症は、1985年に発生が認められたのみで、終息し、今日に至るまで、発生の報告は見ない。この穴あき症状を呈した利尻コンブから、コンブ葉体の分解性が非常に強い海洋細菌 H-4 株が分離され、本菌は *Alteromonas* 属と同定された。<sup>1)</sup> *Alteromonas* sp. H-4 株は、非常に強いアルギン酸分解酵素を産生することから、酵素の利用とコンブ穴あき症の病害因子の解明を目的として、本酵素の性状を検討した結果、H-4 株が産生する菌体外アルギン酸リアーゼは、これまでに報告例がない新規な基質特異性を示す酵素であることが明らかとなった。<sup>2-4)</sup> しかし、本酵素あるいは H-4 株のみでは、コンブ藻体の分解は引き起こされるものの、<sup>5)</sup> 健全藻体に穴あき症を再現させるまでには至らなかった。

ところで、*Alteromonas* 属は、フランスの Gauthier ら<sup>6)</sup> のグループにより、*Alteromonas* 属と *Pseudoaltero-*

*monas* 属に分けることが妥当であるとの提案がなされた。彼らは、Bergey's Manual of Systematic Bacteriology<sup>7)</sup> および Bergey' Manual of Determinative Bacteriology 第9版<sup>8)</sup> には正式に記載されていなかった *Alteromonas* 属菌種も含め、全ての *Alteromonas* 属菌種の 16S rRNA 遺伝子の塩基配列を決定し、その塩基配列を基に詳細な分子系統解析を行い、*Alteromonas macleodii* のみが属するブランチとその他の *Alteromonas* 属菌種が属する *A. haloplanktis* クラスタに分けるべきであるとの Van Landschoot and De Ley<sup>9)</sup> 提案を裏付ける結果を得た。現在では、*A. macleodii* を type species とする *Alteromonas* 属と *Pseudoalteromonas haloplanktis* を type species とする *Pseudoalteromonas* 属が正式に認められている。*Alteromonas* sp. H-4 株も詳細な分類学的検討を行った結果、H-4 株はロシアウラジオストックの沿岸に生息するエゾイガイ *Crenomytilus grayanus* から分離された *A. elyakovii*<sup>10)</sup> と同種であることが明らかとなり、さらに、16S rRNA 遺伝子塩基配列を用いた *A. elyakovii* 菌株の分子系統解析結果から *Pseudoalteromonas* 属に移すことが適当であることが明らかとなったため、*P. elyakovii* として正式に種名の提案を行っ

\* 北海道大学水産学部微生物学講座 (Laboratory of Microbiology, Faculty of Fisheries, Hokkaido University Minato, Hakodate 041-8611, Japan).

た。<sup>11)</sup>

その後、1998年夏に、北海道渡島半島東部沿岸域で養殖中のマコンブに、重篤な穴あき症状を呈する個体が認められた (Fig. 1)。北海道渡島半島東部で発生が認められた穴あき症コンブは、海洋食害動物あるいは甲殻類による被害ではないと思われたことから、微生物が原因であることが疑われ、当研究室で微生物調査を行った。その結果、渡島半島東部の南茅部町沿岸で発生したマコンブ穴あき症病部から、コンブ葉片分解性を示す細菌が3株分離された。このうち2菌株が、*P. elyakovii* と同定された。本報ではその結果について報告する。

### 実験方法

**供試病変コンブ** 供試した病変コンブ藻体は、1)南茅部町沿岸で養殖され、1998年7月16日に採取されたマコンブ *Laminaria japonica*, 2)函館市沿岸で養殖され、1998年7月16日に採取されたマコンブ *L. japonica*, 3)鹿部町沿岸で養殖され、1998年8月28日に採取されたガゴメ *Kjellmaniella crassifolia* の3個体であった。なお、南茅部町沿岸で採取された穴あき症状を呈したマコンブの写真を Fig. 1 に示した。葉体全体に穴あき症状が認められた個体が多く (Fig. 1(A)), 穴あき患部の拡大とともに葉体が枯死する個体もあった (Fig. 1(B))。また、函館市および鹿部町の症状もほぼ同様であった。

**細菌の分離とアルギン酸およびコンブ葉片分解性試験** 各供試コンブについて、生長点付近に生じていた病斑部を無菌的に切除し、滅菌天然海水で数回洗浄後、10 ml の滅菌天然海水を加え、ストマッカー (80型, Seward Laboratory) を用いて1分間藻体をホモジナイ

ズした。この試料を原液とし、原液、10倍希釈試料、100倍希釈試料を、0.5%アルギン酸ナトリウムを添加した ZoBell 2216E 寒天培地<sup>12)</sup> 2枚に0.1 ml ずつ塗抹し、15°C で1週間培養を行った。平板培地上に生じたコロニーから、形状および色調が異なる計30コロニーを釣菌した。純粋分離を行った後、平板法により各分離株のアルギン酸分解活性の有無を15°Cにて調べた。<sup>12)</sup> アルギン酸分解能陽性を示した菌株は、コンブ葉片培地に接種し、15°Cで2-3週間培養し、コンブ葉片の分解性を調べた。なお、コンブ葉片培地は、乾燥マコンブ葉片を長さ約10 cm、幅約1 cmの短冊形に整形し、約10 mlの天然海水にマコンブ葉片を加えて滅菌し、作製した。

**コンブ葉片分解性細菌の同定** コンブ葉片分解性を示した3菌株 (O17株, O21株およびO22株), および対照株として *P. elyakovii* KMM 162<sup>T</sup>, *P. elyakovii* IAM 14594, *P. distincta* KMM 638<sup>T</sup>, *P. espejiana* IAM 12640<sup>T</sup>, および *P. carrageenovora* NCIMB 302<sup>T</sup> を供試し、常法に基づき性状検査を行った。<sup>12-13)</sup> また、*P. elyakovii* KMM 162<sup>T</sup>, IAM 14594, および南茅部マコンブ穴あき症藻体から分離され *P. elyakovii* と同定されたO22株,<sup>11)</sup> および *P. carrageenovora* NCIMB 302<sup>T</sup> のDNAを抽出・精製後,<sup>14)</sup> フォトビオチン標識し、これら4菌株のDNAを標識DNAとして、それぞれ病斑部分離株3株のDNAおよびTable 3に示す *Pseudoalteromonas* 属および *Alteromonas* 属標準株11株のDNAを被験DNA試料として、マイクロプレート交雑実験に供した。<sup>15-17)</sup>

### 結果

マコンブ葉片分解性細菌の分離と性状 各穴あき症藻

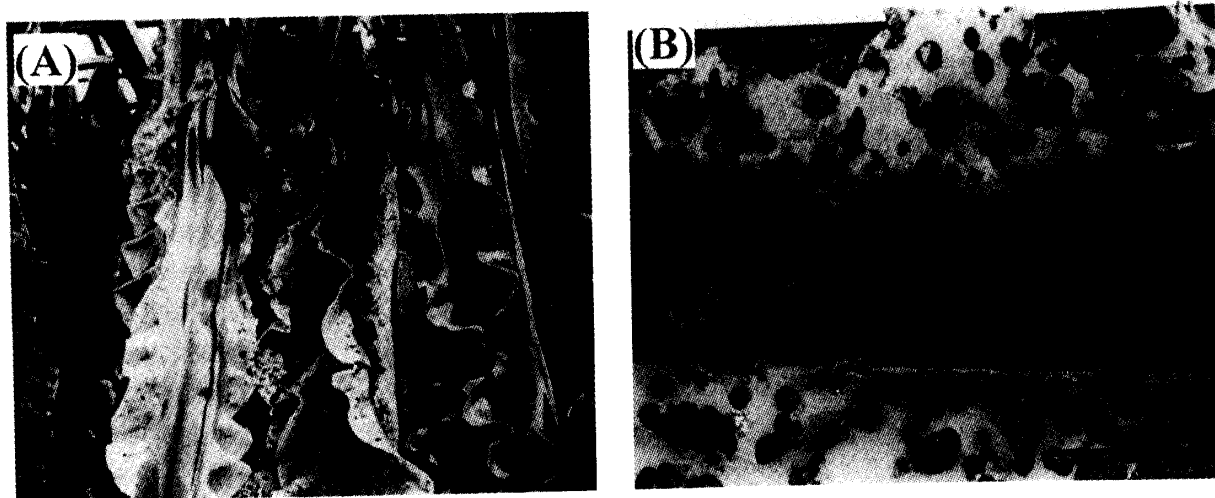


Fig. 1. A spot-wounded *Laminaria japonica* frond collected in the coastal area around Minamikayabe town. The photograph of the whole fronds of *Laminaria japonica* with a number of spot-wounded lesions appearing (A), and a portion with serious lesions (B). Scale of bar: 10 cm.

体から分離した30株ずつ計90株の供試菌について、アルギン酸分解能を調べた結果、南茅部町のマコンブ分離株では20株、函館のマコンブ分離株では21株、および鹿部のガゴメ分離株では5株がアルギン酸分解能陽性であった。さらに、アルギン酸分解能陽性菌株について、コンブ葉片分解性を調べた結果、南茅部マコンブ分離株のうち3株のみがコンブ葉片分解性を示した (Table 1)。そこで、コンブ葉片分解性を示した南茅部町藻体分離株をそれぞれ O17 株、O21 株および O22 株と名づけ、細菌学的性状検査を行った。なお、O22 株は既に *P. elyakovii* として同定された菌株である。<sup>11)</sup>

コンブ葉片分解性細菌3株の主要性状を Table 2 に示した。本調査で分離した3株は、いずれもグラム陰性の桿菌で、発育に Na<sup>+</sup> を必要とし、単極毛で、運動性を示し、グルコースを酸化的に分解すること、DNA およびゼラチンの分解性を示したことから (Table 2), *Alteromonas* 属細菌として分類した。<sup>13)</sup> O17 株と O21 株は、4°C あるいは 37°C での発育で性状が異なるものの、性状の比較を行った *Pseudoalteromonas* 標準株4菌種の中で、*P. elyakovii* および *P. espejiana* によく似た性状を示した (Table 2)。O21 株は *P. elyakovii* O22 株と、調べた30種類の有機物のうち、クエン酸塩、トレハロースおよび D-グルコサミンの利用性のみが異なっており、非常に類似した性状を示した。O21 株は *P. elyakovii* KMM 162<sup>T</sup> とは発育温度域および5種類の有機物利用性で、*P. elyakovii* IAM 14594 株とは発育温度域および4種類の有機物利用性で異なっていた。なお、O22 株は *P. elyakovii* KMM 162<sup>T</sup> とは発育温度域および4種類の有機物利用性で、*P. elyakovii* IAM 14594 株とは発育温度域および1種類の有機物利用性で異なっていた (Table 2)。

また、O17 株は *P. espejiana* IAM 12640<sup>T</sup> と非常に類似した性状を示し、37°C での発育と1種類の有機物利用性のみで異なっていた。

**DNA/DNA 交雑実験** *P. elyakovii* KMM 162<sup>T</sup> 株、IAM 14594 株、O22 株および *P. carrageenovora* NCIMB 302<sup>T</sup> 株の DNA を標識し、マイクロプレート DNA 交雑反応を行った結果を Table 3 に示した。O21 株は *P.*

*elyakovii* O22 株と 97% の DNA 相同性を示した。この時、O22 株と *P. elyakovii* KMM 162<sup>T</sup> および IAM 14594 とはそれぞれ 111.8% および 90.7% であり、また、*P. carrageenovora* NCIMB 302<sup>T</sup> とは 36.2%, *P. antarctica* CECT 4664<sup>T</sup> とは 19.0%, および *P. haloplanktis* IAM 12915<sup>T</sup> とは 29.7% の DNA 相同性を示した。

O17 株は *P. elyakovii* KMM 162<sup>T</sup> および IAM 14594 との間の DNA 相同性は 34.2% および 31.7% であり、*P. carrageenovora* NCIMB 302<sup>T</sup> とは 43.8% の DNA 相同性であった。

## 考 察

1998 年に発生した3例のマコンブ穴あき症藻体について、細菌学的調査を行い、南茅部町沿岸で採取されたマコンブの穴あき症患者部から、3株のコンブ葉片分解性海洋細菌が分離された (Table 1 および Table 2)。これら3株は、いずれの菌株も形態学および生化学的性状から *Alteromonas* 属と同定された (Table 2)。この中で、O22 株は、既に、1985 年に発生した利尻コンブ穴あき症藻体から分離された H-4 株 (=IAM 14594 株)<sup>11)</sup> と同種であることが明らかとなっており、*P. elyakovii* として正式に新組み合わせ種を提案したが、<sup>11)</sup> 表現形質および DNA 相同性の測定結果から、さらに O21 株も O22 株と同種の細菌、すなわち *P. elyakovii* であると判断された (Table 2 および Table 3)。また、もう一株のコンブ葉片分解性細菌 O17 株は、表現形質が類似していること (Table 2)、DNA 相同性の測定により *P. elyakovii* とも、*P. carrageenovora* とも同種の範囲ではなかったこと (Table 3) から、*P. espejiana* 類似菌と判断された。

1985 年の利尻コンブおよび 1998 年のマコンブに甚大な被害を与えた重篤な穴あき症患者部の2つの症例から分離されたコンブ葉片分解性細菌が *P. elyakovii* と同定されたことから、コンブの穴あき症発生に、*P. elyakovii* 菌株が大きく関与していることが示唆された。しかし、*P. elyakovii* 菌株のみでコンブ穴あき症を引き起こすことができるのか否かは明らかにされておらず、今後、調査研究を続けなければならない。また、種の同

Table 1. Alginate degrading and *Laminaria*-frond degrading ability of isolates

Isolates from	Number of isolates:		
	Experimented	Alginate degrading	<i>Laminaria</i> -frond degrading
<i>L. japonica</i> collected at Minamikayabe	30	20	3
<i>L. japonica</i> collected at Hakodate	30	21	0
<i>K. crassifolia</i> collected at Shikabe	30	5	0

**Table 2.** Phenotypic characteristics of the *Laminaria*-frond degrading isolates and closely related species

Characteristics	<i>P. elyakovii</i> O21	<i>P. elyakovii</i> O22	<i>P. elyakovii</i> KMM 162 <sup>T</sup>	<i>P. elyakovii</i> IAM 14594	<i>Alteromonas</i> sp. O17	<i>P. espejiana</i> IAM 12640 <sup>T</sup>	<i>P. carrageenovora</i> NCIMB 302 <sup>T</sup>	<i>P. distincta</i> KMM 638 <sup>T</sup>
Pigmentation	-	-	-	-	-	-	-	+
Water-soluble								Brown
Water-insoluble								
Na <sup>+</sup> requirement	+	+	+	+	+	+	+	+
OF test	O	O	O	O	O	O	O	N
Motility	+	+	+	+	+	+	+	+
Flagellar arrangement	pol	pol	pol	pol	pol	pol	pol	pol
Growth at								
4°C	+	+	-	-	+	+	+	-
37°C	+	+	-	-	+	-	-	-
40°C	-	-	-	-	-	-	-	-
Oxidase, catalase	+	+	+	+	+	+	+	+
Production of								
Amylase	+	+	+	+	+	+	-	-
Alginase	+	+	+	+	+	+	+	+
Agarase	-	-	-	-	-	-	-	-
Gelatinase, DNase	+	+	+	+	+	+	+	+
κ-Carrageenase	-	-	-	-	-	-	+	-
Requirement for organic growth factors	-	-	-	-	-	-	-	+
Utilization of:								
D-Fructose, sucrose, maltose, D-mannitol, D-gulcose, cellobiose	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Mannose	+	+	+	+	+	-	-	+
D-Galactose	+	+	+	+	+	+	-	-
Melibiose	+	+	+	+	+	+	+	-
Lactose	+	+	+	+	+	+	+	-
D-Gluconate	+	+	-	+	-	-	-	-
N-Acetylglucosamine	+	+	-	-	-	-	-	-
Succinate, fumarate	+	+	+	+	-	-	+	+
Citrate	+	-	+	-	+	+	+	-
Glycerol	+	+	-	+	+	+	+	+
Xylose	+	+	+	+	+	+	-	-
Trehalose	+	-	-	-	+	+	+	-
Acetate	+	+	+	+	+	+	+	-
D-Glucosamine	+	-	-	-	-	-	-	-
Pyruvate	+	+	+	+	+	+	+	-
δ-Aminovariate, glucronate, α- ketoglutarate, DL-malate, D-sorbitol, L-tyrosine, γ-aminobutyrate, meso-erythritol, aconitate	-	-	-	-	-	-	-	-

定までは至らなかったが, *P. elyakovii* 以外にも, O17 株のように, コンブ藻体を分解できる細菌の存在も明らかとなった。さらに, 穴あき症患者部からはコンブ葉片の分解性は乏しいが, コンブ組織の成分であるアルギン酸を分解する細菌が多数分離された (Table 1)。特に, 穴あき症を呈していたものの, コンブ葉片分解性細菌が見いだされなかった函館市沿岸のマコンブおよび鹿部町沿岸のガゴメでの穴あき症患者部の形成は, アルギン酸分解性菌の関与が大きいことが考えられる。穴あき症患者部の形成過程には, 種々の細菌が関与する可能性が考えられるため, 分離菌株を用いた感染実験あるいはこれら菌株のアルギン酸分解性以外のコンブ組織形成成分 (セルロース, ラミナリン, フコイダンなど) の分解性の有無についても検討する必要がある。なお, 現在, コンブ養殖海域でのコンブ葉片分解性の強い細菌の分布調査も行っており, 養殖環境からの *P. elyakovii* 以外のコンブ葉

片分解性細菌種の分離と同定, さらに穴あき症発生の要因およびメカニズムの解明を行いたいと考えている。

ところで, マコンブ穴あき症藻体から分離された *P. elyakovii* O21 株および O22 株は, *P. elyakovii* 標準株である KMM 162<sup>T</sup> あるいは *P. elyakovii* IAM 14594 株との間の細菌学的性状で, 発育温度および有機物利用性の結果が完全に一致せず, 若干異なることが観察された (Table 2)。また, ロシアウラジオストック沿岸に生息するエゾイガイから分離された *P. elyakovii* KMM 162<sup>T</sup> 株と, 利尻コンブ穴あき症藻体から分離された *P. elyakovii* IAM 14594 株も若干異なる性質を示すことから (Table 2), *P. elyakovii* は菌株間での表現形質の差異が比較的大きい種であると考えられた。*P. elyakovii* 分離株間で性状が異なる理由が, 各菌株が分離された場所および時間が異なることから, 分離された環境へ適応した結果なのか, 各菌株に遺伝的変異が生じている結果

**Table 3.** DNA relatedness among *Pseudoalteromonas* and *Alteromonas*

Species	Strains	G+C content (moles%)	% Reassociation with biotinylated DNA from:			
			<i>P. elyakovii</i>	<i>P. elyakovii</i>	<i>P. elyakovii</i>	<i>P. carrageenovora</i>
			KMM 162 <sup>T</sup>	IAM 14594	O22	NCIMB 302 <sup>T</sup>
<i>P. elyakovii</i>	KMM 162 <sup>T</sup>	38.5	100.0	78.1	111.8	48.3
<i>P. elyakovii</i>	IAM 14594	38.8	94.3	100.0	90.7	45.8
<i>P. elyakovii</i>	O21	NT			97.0	
<i>P. elyakovii</i>	O22	38.7	71.0	72.9	100.0	45.7
<i>Alteromonas</i> sp.	O17	NT	34.2	31.7		43.8
<i>P. citrea</i>	KMM 216	43.8* <sup>1</sup>	49.5	53.5		34.2
<i>P. distincta</i>	KMM 638 <sup>T</sup>	43.8* <sup>2</sup>	52.4	61.2		43.6
<i>A. macleodii</i>	IAM 12920 <sup>T</sup>	46.2		3.3		4.3
<i>P. espejiana</i>	IAM 12640 <sup>T</sup>	41.4	29.9	35.3		41.2
<i>P. atlantica</i>	NCIMB 301 <sup>T</sup>	41.2		36.8		34.7
<i>P. carrageenovora</i>	NCIMB 302 <sup>T</sup>	39.5* <sup>3</sup>	46.9	45.8	36.2	100.0
<i>P. antarctica</i>	CECT 4664 <sup>T</sup>	40.6–41.7* <sup>4</sup>	13.5	36.1	19.0	
<i>P. nigrifaciens</i>	IAM 13010 <sup>T</sup>	40.6		30.6		33.9
<i>P. haloplanktis</i>	IAM 12915 <sup>T</sup>	41.6	28.9	28.8	29.7	42.7

\*<sup>1</sup> Data from reference 18.\*<sup>2</sup> Data from reference 19.\*<sup>3</sup> Data from reference 20.\*<sup>4</sup> Data from reference 21.

なのか、あるいは他の理由であるかは、今後、結果を蓄積し、明らかにしていく必要がある。

### 謝 辞

本研究は平成 11 年度利尻島研究調査助成費の補助により行った。ここに謝意を表す。また、本研究遂行に際して試料の採取にご協力頂いた、渡島東部水産指導所および函館水産試験場の各位に謝意を表す。また、*P. elyakovii* および *P. distincta* 標準株を快く分与して頂いたロシア科学アカデミー極東生物化学研究所の E. P. Ivanova 博士、*P. antarctica* 標準株を分与して頂いたバルセロナ大学 J. Guinea 博士に謝意を表す。

### 参考文献

- 1) T. Sawabe, Y. Ezura, and T. Kimura: Characterization of an alginate lyase from decaying Rishirikombu *Laminaria japonica* var. *ochotensis*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **58**, 141–145 (1992).
- 2) T. Sawabe, Y. Ezura, and T. Kimura: Purification and characterization of an alginate lyase from marine *Alteromonas* sp. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **58**, 521–527 (1992).
- 3) T. Sawabe, Y. Ezura, and T. Kimura: Application of an alginate lyase from *Alteromonas* sp. for isolation of protoplasts from a brown algae *Laminaria japonica*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **59**, 705–709 (1993).
- 4) T. Sawabe, M. Ohtsuka, and Y. Ezura: Novel alginate lyases from marine bacterium *Alteromonas* sp. H-4. *Carbohydr. Res.*, **304**, 69–76 (1997).
- 5) T. Sawabe and Y. Ezura: Regeneration from *Laminaria japonica* Areschoug (Laminariales, Phaeophyceae) protoplasts isolated with bacterial alginase. *Plant Cell Reports*, **15**, 892–895 (1996).
- 6) G. Gauthier, M. Gauthier, and R. Christen: Phylogenetic analysis of the genera *Alteromonas*, *Shewanella*, and *Moritella* using genes coding for small-subunit rRNA sequences and division of the genus *Alteromonas* into two genera, *Alteromonas* (emended) and *Pseudoalteromonas* gen. nov., and proposal of twelve new species combinations. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **45**, 755–761 (1995).
- 7) P. Baumann, M. J. Gauthier, and L. Baumann: Genus *Alteromonas* Baumann, Baumann, Mandel and Allen 1972, 418<sup>AL</sup>, in “Bergey’s manual of systematic bacteriology” (ed. by N. R. Krieg and J. G. Holt), Vol. 1, The Williams & Wilkins, Baltimore, 1984, pp. 343–352.
- 8) J. G. Holt, N. R. Krieg, P. H. A. Sneath, J. T. Staley, and S. T. Williams: Gram-negative aerobic/microaerophilic rods and cocci, in “Bergey’s manual of determinative microbiology”, 9th ed, The Williams & Wilkins, Baltimore, 1994, pp. 71–174.
- 9) A. Van Landschoot and J. De Ley: Intra- and intergeneric similarities of the rRNA cistrons of *Alteromonas*, *Marinomonas* (gen. nov.) and some other gram-negative bacteria. *J. Gen. Microbiol.*, **129**, 3057–3074 (1983).
- 10) E. P. Ivanova, V. V. Mikhailov, E. A. Kiprianova, G. F. Levanova, A. D. Garagulya, G. M. Frolova, and V. I. Svetashev: *Alteromonas elyakovii* sp. nov. a new bacterium isolated from marine mollusks. *Russian J. Mar. Biol.*, **22**, 209–215 (1996).
- 11) T. Sawabe, R. Tanaka, M. M. Iqbal, K. Tajima, Y. Ezura, E. P. Ivanova, and R. Christen: Assignment of *Alteromonas*

- elyakovii* KMM 162<sup>T</sup> 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. Syst. Bacteriol.*, (in press).
- 12) T. Sawabe, Y. Oda, Y. Shiomi, and Y. Ezura: Alginate degradation by bacteria isolated from the gut of sea urchins and abalones. *Microb. Ecol.*, **30**, 193-202 (1995).
  - 13) 絵面良男, 清水 潮: 水質・微生物編, 「沿岸環境調査マニュアルII」(日本海洋学会編), 恒星社厚生閣, 東京, 1990, pp. 9-20.
  - 14) J. L. Johnson: Isolation and purification of nucleic acids, in "Nucleic acid techniques in bacterial systematics" (ed. by E. Stachebrandt and M. Goodfellow), John Wiley & Sons., Chichester, 1991, pp. 1-19.
  - 15) T. Ezaki, Y. Hashimoto, N. Takeuchi, H. Yamamoto, S.-L. Liu, H. Miura, K. Matsui, and E. Yabuuchi: Simple genetic method to identify viridans group *Streptococci* by colorimetric dot hybridization and fluorometric hybridization in microdilution wells. *J. Clin. Microbiol.*, **26**, 1708-1713 (1988).
  - 16) T. Ezaki, Y. Hashimoto, and E. Yabuuchi: Fluorometric deoxyribonucleic acid-deoxyribonucleic acid hybridization in microdilution wells as an alternative to membrane filter hybridization in which radioisotopes are used to determine genetic relatedness among bacterial strains. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **39**, 224-229 (1989).
  - 17) T. Sawabe, I. Sugimura, M. Ohtsuka, K. Nakano, K. Tajima, Y. Ezura, and R. Christen: *Vibrio halioticoli* sp. nov., a non-motile alginolytic marine bacterium isolated from the gut of the abalone *Haliotis discus hannai*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **48**, 573-580 (1998).
  - 18) L. A. Romanenko, V. V. Mikhailov, A. M. Lysenko, and V. I. Stepanenko: A new species of melanin-producing bacteria of the genus *Alteromonas*. *Mikrobiologiya*, **64**, 74-77 (1995).
  - 19) L. A. Romanenko, A. M. Lysenko, V. V. Mikhailov, and A. V. Kurika: A new species of brown-pigmented agarolytic bacteria of the genus *Alteromonas*. *Mikrobiologiya*, **63**, 1081-1087 (1994).
  - 20) M. Akagawa-Matsushita, M. Matsuo, Y. Koga, and K. Yamasato: *Alteromonas atlantica* sp. nov. and *Alteromonas carrageenovora* sp. nov., bacteria that decompose algal polysaccharides. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **42**, 621-627 (1992).
  - 21) N. Bozal, E. Tudela, R. Rosselló-Mora, J. Lalucat, and J. Guinea: *Pseudoalteromonas antarctica* sp. nov., isolated from an Antarctic coastal environment. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **47**, 345-351 (1997).