総説

微細藻類の栄養要求

岩崎 英雄

(1967年6月5日受理)

Nutrition of Algae

Hideo IWASAKI

海産微細藻類の培養は MIQUEL (1890-93)¹⁾ が実験室内で数種の珪藻を増殖させることに成功して以来続けられており、すでに多数の研究報告が見られる。これらの研究はその目的から二つに大別して考えることができる。その一つは海産諸動物やその幼生の餌料を得ることを目的とするものであり、他はその生理、生態に関するものである。ALLEN & NELSON (1910)²⁾ による最初の研究はこの二つの目的から行なわれたようであるが、その後行なわれた研究はほとんど生理、生態に関するものであるといつて良いようである。

近年になつて、再び水産諸動物幼生の飼育に各種の微細藻類が餌料として試験されるようになり、その価値が再検討されつつある。特にわが国の場合、沿岸増・養殖用の種苗生産の目的で各種の幼生の飼育が試みられており、好適な餌料生物の選定およびその入手、確保などが大きな問題になつてきている。すでに数種の珪藻、鞭毛藻類が甲殻類、軟体動物および棘皮動物の餌料に使用されており³⁾、研究の進展に伴つてさらにその開発が期待されるかも知れない。しかし、餌料微小生物の能率的大量培養についても解決されねばならない基本的な問題が少なからず残されている。

ここでは淡水種を含めた微細藻類一般の培養と栄養要求に関する文献を取りまとめ、参考に供したいと思う。

藻類の培養

無菌分離法

無菌培養は実験の目的によつて必ずしも必要とされるものではないが、純粹培養で得られた実験結果はその正確さと再現性において遙かに勝れていることは多言を要しないであろう。

古くから行なわれている“稀釈法”は珪藻の分離に役立つこともあるが⁴⁾、粗培養から毛細ピペットを用いて分離する“ピペット法”はより有効で選択的に使用されることが多い⁵⁻⁷⁾。天然からの分離は PROVASOLI, PINTNER & PACKER⁸⁾, SPENCER⁹⁾ および GOLDZWEIG-SHELUBSKY¹⁰⁾ らによつて導入された抗生物質の使用によつて単純化され、藻類の無菌化に役立つ抗生物質の混合液の組成が PROVASOLI¹¹⁾ や GUILLARD & RYTH⁷⁾ によつて報告されている。また GERLOFF, FITZGERALS & SKOOG¹²⁾ は紫外線の照射によつて藍藻類を無菌化する手法を完成している。しかし、ALLEN¹³⁾ は純粹培養を得るのに突然変異を誘発し易いような処理は望ましくないとして、寒天平板に分散させたコロニーの外周から移し換えを繰返している。こうした藻類一般の分離法については LEWIN¹⁴⁾ が詳しく述べている。その後 MCDANIEL, MIDDLEBROOK & BOWMAN¹⁵⁾ は洗浄剤 (detergent) とフェノールの混合液内で振盪することによつて、*Chlorella*, *Anacystis* および *Chlamydomonas* の無菌培養を得たことを報告している。また BROWN & BISCHOFF¹⁶⁾ は藻類の表面

* 広島大学水畜産学部 (Fac. Fish. and Anim. Husb. Hiroshima Univ. Fukuyama, Japan).

から細菌を分離するのに洗浄剤への浸漬と超音波処理を繰返すことをすすめている。FRIES¹⁷⁾ は沃素を主成分とする殺菌剤 Jodopax 液を用いて 3 種の紅藻の無菌培養を得たことを報告している。

以上のように多種多様の手法が試みられているが、その優劣、適否は目的とする生物の習性と汚染度および汚染微生物の種類などによっても異なり、一般的に論ずることはできないようである。

培 養 液

淡水種用培養液 淡水藻に対し、CHU¹⁸⁾、RODHE¹⁹⁾ および PROVASOLI & PINTNER²⁰⁾ らが工夫したような薄い無機の培養液は PROVASOLI ら²⁰⁾ が特記しているように基本的には天然の重炭酸水を硝酸塩、磷酸塩および珪酸塩などで栄養化したものと変わるところはない。これらの比較的単純な培養液は、湖底泥の抽出液²¹⁾や泥炭土壌の抽出液²⁰⁾が加えられると増殖が良くなるという実験例からもわかるように、すべての種に常に好適な培養液であるとはいわれない。しかし、これらの培養液にビタミン類を加え、適当に pH 緩衝能を与え、また、ほど良く金属をキレート化して殺菌された培養液は非常に良く利用されている。PROVASOLI & PINTNER²²⁾ は有用な培養液の目録を作つたばかりでなく、キレート剤の性質、微量金属の量、pH と緩衝剤の間の相互作用について検討を行ない、重要な貢献をしている。これらの要素は重炭酸水とは異なり、生理学的に天然水に似ている培養液を計画する場合特に重要な意義をもつといえる。

海産種用培養液 海産藻類の培養には海水に N, P, Ca, (Si), Fe を加えた ALLEN-MIQUEL²³⁾ 型の培養液、および海水を N, P, 土壌抽出液で栄養化した ERD-SCHREIBER²³⁾ 型の培養液が非常に良く利用されている。前者は珪藻およびある種の鞭毛藻類の単一種培養に適しており、後者はある種の無菌培養に使用されている。さらに添加すべき有機抽出物の拡大と貯蔵海水の使用とによつて培養される生物は次第に増加してきた。これらの培養液の基本的な欠点は高圧殺菌で沈澱を作り易く、さらに同じものを作り出すことができないという点である。海水に必須の微量要素を添加しても培養できない種類が多く、少量の天然物の抽出液を添加することによつて培養が可能となつた例は極めて多い^{6) 24-27)}。このような海水に添加すべき栄養剤の組成と発達の過程については PROVASOLI, MCLAUGHLIN & DROOP²⁸⁾ によつて詳しく述べられている。土壌抽出液は現在では普通ビタミン B₁₂、チアミン、キレート化した微量金属などでおき換えられ、さらに Tris* の形で pH を緩衝することによつて合成培養液は一層改良されている^{28) 29)}。このように工夫、改良された合成培養液によつて、広範囲の多種多様の生物の培養ができるようになってきているが、問題がすべて解決されているわけではない。

珪藻の auxospore の形成は栄養塩を添加した海水中でしばしば観察されているが^{6) 30-32)}、培養では珪藻の生活環は必ずしも完成していない。外洋性の藻類は細菌が存在すると増殖するが、無菌培養では同じ海水でも、また合成培養液でも培養できないといわれる³³⁾。LEWIN & GUILLARD²⁴⁾ はこれはある種の未知の栄養素の欠乏というよりは、むしろ培養の物理化学的条件が不適当なことに原因があると述べている。この疑問は人工海水培養液を企画する際に、PROVASOLI ら²⁸⁾や DROOP³⁵⁾ によつて調査された培養液の性質および発展過程などで考慮はされてきている。DROOP³⁶⁾ は浮游珪藻 *Skeletonema costatum* の研究で多くの疑問を提出している。例えば、a) 数種の弱キレート剤は強キレート剤に勝るものか否か？ b) Fe 要求が高いのは本質的なものであるのか、それとも摂取能力が弱いことを示すものか？ c) 土壌抽出液はなぜ auxospore の完成を促進するのか？ などである。

必須の栄養要素

藻類の無機栄養が高等植物のそれに類似することはすでに 1896 年に MOLISH³⁷⁾ によつて述べられ、この一般論は何度も再肯定されている。現在すべての藻類に要求される栄養素は C, N, P, K, Mg, Ca, Fe, Zn, Mn および S と考えられている。Mn と Fe は極く少量要求され、Na は不可欠のものではない。Ca の要求については異論もある。Si は珪藻の増殖に対しては主要な元素であるが、他の形態の藻に対しては不必要である。B, Co, Mo および Cu のような種々の他の元素は微量要素として必要であるかも知れず、多

* Tris (hydroxymethyl) aminomethane.

くの藻類があるビタミンを要求することも知られている。海水および大部分の湖水にはNとPは例外として、主要な要素は普通過剰に存在している。以下にこれらの要素に対する特別な要求について紹介し、二、三論議を試みる。

窒素

利用される窒素源 遊離窒素の固定は藍藻類で広く見られ、Fogg³⁸⁾によると8属の21種が窒素固定の能力をもつといわれる。しかし、増殖に対する窒素源としては NH_4^+ や NO_3^- ほど能率的ではないようで、KRATZ & MYERS³⁹⁾によると *Nostoc* では遊離窒素の固定だけでは NO_3^- で得られる増殖量の75%に過ぎないといわれる。藍藻以外の藻類では窒素固定についての十分な証拠はまだ見出されていないが、研究されたすべての種がこの窒素固定能力について注意深く研究されているわけではない。

藻類の大部分および光合成鞭毛藻類は NO_3^- 、 NO_2^- および NH_4^+ を利用しており、ある種類では NH_4^+ を選択的にあるいは好んで利用する^{29)40)~46)}。*Navicula pelliculosa*では NH_4^+ は NO_3^- よりも代謝のプールの中に入るのが早いといわれ⁴⁴⁾、*Nitzschia seriata*、*Coccolithus huxleyi*、*Cyclotella nana*、*C. caspia*、*Skeletonema* sp. および *Coscinodiscus asteromphalus* では NO_3^- よりも NH_4^+ の方で増殖が良いといわれている²⁹⁾。数種の鞭毛藻類では NO_3^- を利用することができないといわれ、一方、*Phaeodactylum tricornutum** は NH_4^+ では増殖しないといわれる⁴⁷⁾。HARVEY⁴³⁾によると *Phaeodactylum** は暗所では NO_3^- 、 NO_2^- 、 NH_4^+ の3種の窒素源を利用するが、 NO_2^- からの有機物の合成は非常に低いといわれる。また3種の珪藻では NO_3^- が供給（特に暗所で）され、窒素欠乏から回復すると NO_2^- を放出するという⁴⁰⁾⁴⁸⁾。*Nitzschia thermalis*は最初のpH 8.0の淡水中でアミノ酸からアミノ基(NH_2)をとり、遊離の NH_3 を放出することが知られている⁴⁹⁾。

有機態のNに関しては、ALEGEUSが淡水の緑藻によるグリシン⁵⁰⁾、アラニン⁵⁵⁾、アスパラギン酸、コハク酸アミド、アスパラギン⁵²⁾⁵³⁾およびグルタミン酸⁵⁴⁾の利用について研究を行なっている。この中でアラニンだけが *Scenedesmus* によつて窒素源として利用されず、一般にアミド態Nはアミノ態Nよりも速やかに吸収されるといわれる。アスパラギン酸は高等植物での研究から予期されるようなアミノ酸における重要な位置を占めるものでないことは明らかである。ARNOW, OLESON & WILLIAMS⁵⁶⁾は *Chlorella* では窒素源として役立つのはアルギニン、シトルリン、オルニチンおよび尿素であることを見出し、WALKER & MYERS⁵⁷⁾によつて少し前に述べられたオルニチン回路の活動を確認している。アルギニンはMnによつて活性化されるが、Mnはシトルリンの同化には必要でないといわれる。BIRDSEY & LYNCH⁵⁸⁾によると *Euglena gracilis* のような従属栄養種では尿素や尿酸は利用しないといわれ、またある種の *Chlorella*、*C. reinhardi* および *Scenedesmus* は尿素、尿酸およびキサンチンを利用し、アラントインやクレアチンを利用する藻類はないといわれている。

海産の珪藻は一般に海水中の有機窒素化合物を利用できないようである²⁹⁾⁵⁹⁾。GUILLARD²⁹⁾は彼が実験に使用した15 cloneの同心目珪藻と1種の羽状目珪藻のうち、底生性の *Melosira* sp. と *Coscinodiscus asteromphalus* の2種だけがグルタミン酸塩で硝酸塩と同程度の増殖を示し、一般にグルタミン酸が多少良いようで、汚染された河口流域水から分離された *Cyclotella nana* および *C. caspia* は尿素、尿酸を利用することができたと述べている。しかし、珪藻の増殖に絶対に必要とされるような有機窒素化合物はまだ知られていない。

一方、栄養要求の面で独立栄養と従属栄養の中間に位置すると考えられている鞭毛藻類では、その窒素要求は千差万別である。*Gyrodinium cohnii* ではヒスチジンを必要とし、 NH_4^+ や数種のアミノ酸およびアミンを利用するが窒素源として NO_3^- を利用しないといわれ⁶⁰⁾、*Hymenomonas* sp. では NO_3^- よりもグルタミン酸塩、アスパラギン酸塩およびアラニンを良く利用するといわれる⁶²⁾。以上のような例外はあるにしても、一般の種にとつては窒素源として NO_3^- -Nが最も勝れているようである⁶¹⁾⁶²⁾²⁹⁾。アルギニン、ア

* 原著では *Nitzschia closterium* として引用。本綜述では訂正のあつたものについては訂正名を使用する。

スバラギン、グルタミン、アラニンなどは多くの種によつて利用されており、グリシン、リジン、ロイシン、メチオニン、チロシン、トリプトファン、ヒスチジン、 γ -アミノブチル酸、タウリン、オルニチン、シトルリン、カナバニン、アグマチンなどもそれぞれの生物によつて利用されることが知られ、特に *Chrysomonads* では広範囲の有機窒素を利用するという⁶¹⁾⁶²⁾。また、*Pavlova gyraus* では試験した有機物のいずれも利用しなかつたと報告されている。

藻類の培養液にはアンモニウム塩よりも硝酸塩の方が良く利用されている。というのは緩衝の弱い淡水の培養液では NH_4^+ の吸収に伴つて pH が低下し、増殖を阻害するようになるためである。さらに NH_4^+ はアルカリ性の培養液では急激に毒性を示すようになり、ある種では特に鋭敏に反応する。イスラエルの淡水性養魚池では有毒な *Prymnesium parvum* の異常増殖を抑制するのに NH_4NO_3 が使用されているが⁶³⁾、ある場合にはこの処理で効果がないともいわれている。MCLAUGHLIN⁶⁴⁾ によると、 NH_4^+ は pH 7 以下の場合この種に対して窒素源として非常に勝れ、毒性は塩分濃度の増大と共に急激に減少するという。

窒素源の濃度 窒素の至適濃度も種によつて非常に異なるようである。*Chlorella* は栄養塩の濃度の変動に非常に耐性があるといわれ、MYERS⁶⁵⁾ は十分な培養液 (N 168 mg/l) を希釈することによつて、主要塩類の濃度を 20 倍に薄めても *Chlorella* の増殖や光合成に影響のないことを報告している。CHU⁴¹⁾ は種々の淡水藻の増殖に好適な N の最大濃度について調べ、N 5~17 mg/l 以上の濃度になると増殖が制約されることを見出している。また、SPORE & MILNER⁶⁶⁾ によると *Chlorella pyrenoidosa* の増殖は $\text{NH}_4\text{-N}$ が 31.5 mg/l 以上になると阻害されると述べており、一方、GEOGHEGAN⁶⁷⁾ は pH が制御された培養液中ではより高い濃度 ($\text{NH}_4\text{-N}$) でも *C. vulgaris* は良く増殖したことを報告している。

海産珪藻の培養に及ぼす窒素濃度の影響については KETCHUM⁶⁸⁾、CHU⁴¹⁾、VOLLENWEIDER⁶⁹⁾、SPENCER⁷⁰⁾ および KAIN & FOGG⁷¹⁾ らによつて研究が行なわれているが、その増殖率を制限する窒素濃度については明らかにされていない。*Phaeodactylum tricornutum** は窒素濃度に関係なく良く増殖し、培養における増殖率は $\text{NO}_3\text{-N}$ が 0.05~0.5 mg/l の間では無関係であるが、0.2 mg/l 以下になると N の同化率が減少することが KETCHUM⁶⁸⁾ によつて報告されている。ZOBELL⁴⁰⁾ によると *P. tricornutum** の $\text{NH}_4\text{-}$ 、 $\text{NO}_2\text{-}$ 、 $\text{NO}_3\text{-N}$ の好適範囲の上限界はそれぞれ 0.7、70 および 560 mg/l といわれる。GUILLARD²⁹⁾ によると珪藻類の NH_4Cl に対する耐性の限界は 0.1 mM 前後といわれ、一般に接種量が少なく、窒素欠乏の細胞を弱光下で培養する時に著しいといわれる。

ある種の鞭毛藻類では非常に低濃度の N でも利用でき、BARKER²⁶⁾ によると *Prorocentrum micans* および *Peridinium* は海水に添加される NaNO_3 が 1 $\mu\text{g/l}$ の添加で増殖が阻害されたという。一方、*Chrysomonads* では硝酸塩 100~500 mg/l の濃度で最大の増殖を示したといわれる。

以上の結果から *Chlorella* や *Phaeodactylum* は溶液中の窒素量 (豊富に存在する場合) の変動に対して比較的鈍感であるが、ある種の藻類では過剰になると増殖が阻害されることがわかる。

利用される磷化合物 天然水中の P、N の濃度は一般に非常に低いので、一番はつきりした制限要素である。普通天然水中に見られる P の形態は正磷酸塩としてであり、培養液にも使用されてきている。CHU⁷¹⁾ によるとピロ磷酸 (P_2O_7) は *Phaeocystis pouchetti*、*Skeletonema costatum* および *Phaeodactylum tricornutum** によつて正磷酸ほど効果的に利用されないといわれる。無菌の *Phaeodactylum** は暗所で増殖する際にグリセロ磷酸塩および inositol-hexaphosphate を利用できるといわれ⁷³⁾、HARVEY⁷⁴⁾ は磷酸欠乏細胞では暗所でもこれらの有機磷化合物を同化することを示している。PROVASOLI ら⁶¹⁾ および PINTNER ら⁶²⁾ によると、試験した 3 種の *Amphidinium*、3 種の *Gyrodinium* および 5 種の *Chrysomonads* のすべてが程度の差はあるが、グリセロ磷酸塩、モノエチル磷酸、アデニル酸、グアニル酸、シチジル酸およびイースト核酸をそれぞれ利用したといわれ、数種に対してはグリセロ磷酸塩は無機態の P よりも一層効果的であつたという。MCLAUGHLIN⁶⁴⁾ は $\text{PO}_4\text{-P}$ 1.1mg/l とグリセロ磷酸塩の P 0.1 mg/l で *Prymnesium*

* KETCHUM (1939)⁶⁸⁾、ZOBELL (1935)⁴⁰⁾、CHU⁷²⁾⁷³⁾ により *Nitzschia closterium* として引用。

parvum, *Monochrysis lutherii* および *Isochrysis galbana* の十分な増殖を得ている。このグリセロリン酸塩の効果は特殊なものであるのか、それともグリセロリン酸の Ca, Mg 塩は溶解度が高いため高圧殺菌処理で沈澱を作らないことに原因するものかについては明確にしておく必要があるように思われる。

燐の濃度 淡水藻 *Pediastrum boryanum*, *Staurastrum paradoxum*, *Botryococcus Braunii*, *crotonensis*, *Nitzschia palea* および *Asterionella gracillima* などの増殖に対する P の至適濃度について *Fragillaria* では CHU⁴¹⁾ によつて研究されており、最大の増殖率を与える燐濃度の上限界は P 8.9~17.8 mg/l と異なっており、それ以上の濃度では阻害的に作用したという。RODHE¹⁹⁾ によると *Scenedesmus quadricauda* の増殖は P の濃度が 1 mg/l までは濃度とともに増加したが、Erken 湖水の細菌汚過水に P を僅か 0.002 mg/l 添加することによつて *Asterionella formosa* の増殖は最大となり、0.05mg/l 以上加えると増殖は阻害されたといわれる。このように燐酸塩が蒸留水や他の種々の合成培養液に加えられた時よりも湖水に加えられた際に良く吸収され、藻類が活発に増殖するという現象は CHU⁴¹⁾, RODHE¹⁹⁾, LUND⁷⁵⁾, MACKERETH⁷⁶⁾ らによつて観察されている。この重要な現象には燐酸塩と Fe および有機結合体、もしくは天然水中にしばしば低濃度で存在する吸着剤の間の反応が含まれているのかも知れない。

珪藻は細胞内の燐含量がある最低値以下になると細胞分裂ができなくなるが (*Phaeodactylum* および *Asterionella formosa* の両種では細胞当たり 6×10^{-14} g), 細胞はこの必要量の少なくとも 30 倍量を過剰の燐酸として蓄積し、外部環境に P がなくなると、この貯蔵燐酸を分割使用して細胞分裂を続けるといわれている^{76) 77)}。この燐酸貯蔵作用についてはすでに RODHE¹⁹⁾ 松江⁷⁸⁾, LUND⁷⁹⁾, GOLDBERG, WALKER & WHISENAND⁸⁰⁾ らによつて観察されており、この“luxury uptake”が珪藻の燐酸含量変動の一因とされている⁸⁰⁻⁸²⁾。KRUMHOLZ⁷³⁾ は Oak Ridge から放射性廃棄物が少量流入する White oak 湖で、藻類が放射性の同位元素 P³² を摂取して濃縮することを観察している。すなわち、*Euglena* は約 10 万倍、*Volvox* は 14 万倍、*Pandorina* 28.5 万倍、*Spirogra* では実に 85 万倍も濃縮するという。

カルシウム、マグネシウム

合成培養液中の 1 価と 2 価の陽イオン濃度は、その絶対要求量や増殖に及ぼす塩類比率 (Ca/Mg 比, 1 価/2 価イオン比など) の影響を調べるために変えられてきている^{69) 84-86)}。PROVASOLI³³⁾ はイオンの比率, Ca と Mg の濃度, その他と珪藻の増殖に及ぼすそれらの影響などについて論評を行なっている。

一般に, Ca は比較的高い濃度で藻類の増殖を刺激するようである^{69) 85)}。淡水珪藻 *Fragilaria capucina* の増殖には, 1 価/2 価の陽イオン比や Ca/Mg 比などよりも Ca の絶対濃度の方がより重要であるとされ⁸⁵⁾, また, 1 価/2 価陽イオン比 1.5 以下が淡水珪藻の増殖に好適といわれている³³⁾。*Phaeodactylum* に対する至適カルシウム濃度は Na の濃度の増加と共に高くなるといわれ⁸⁶⁾, Ca と Mg はある範囲内で相互に置換できることも明らかにされている³³⁾。DROOP⁸⁶⁾ によると *Phaeodactylum* は Ca/Mg 比がかなり違つても増殖でき、至適比率というのは海産種、淡水種のいずれにも特徴的なものでないことを指摘している。

Skeletonema costatum の Na に対する耐性は研究された他の生物に比べ比較的低い値を示し、この Na に対する耐性は neritic, supralittoral および estuarine 種を区別する指標になるかも知れないといわれている⁸⁶⁾。

硫黄

珪藻類の硫黄要求についてはあまり知られていない。KRAUSS⁸⁷⁾ は *Scenedesmus obliquus* の硫黄含量は全乾燥重量の 0.91% と報告している。S は生物にとつて不変の構成物であり、培養液中では普通硫酸塩として与えられている。しかし、硫酸塩濃度の増殖に及ぼす影響については研究がないので不明である。海水は 28 mg-atom/l の硫酸塩を含んでおり、これは藻類の増殖に対して要求される量を遙かに上回っているものと考えられる。

HARVEY⁸⁰⁾ によると、海産珪藻 *Ditylum* は夏に採水されたある海水中では、2 価の S を含む化合物が加えられないと正常に増殖できないといわれ、Na₂S あるいはシスチン、グルタチオン、メチオニンおよびチアミンなどは海水の肥沃度を回復させると述べている。MATUDAIRA⁸⁸⁾ は海水に Na₂S·9H₂O を 0.1~

1.0mg/l 添加すると *Skeletonema costatum* の増殖は促進されるが、5 mg/l の濃度では細胞分裂を抑制し、10 mg/l になると全然細胞分裂が行なわれないことを報告している。シスチンやアラニンもまた効果的で、auxospore の形成は硫化物の添加によつて促進されたといわれる。

珪素

珪藻の細胞膜は非結晶性の水和シリカで構成されている。Si に代わつてこの役割を果すことができるような他の元素はまだ見出されていないので Si は珪藻の細胞増殖に不可欠なものとされている⁸⁹⁾⁹⁰⁾。LEWIN⁹¹⁾によると珪藻に利用される Si は可溶性の Si が得られる化合物（オルト珪酸）だけであるといわれる。培養では普通メタ珪酸塩（例 $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ ）が与えられている。これは溶液中で加水分解され、珪藻に利用され易い形のオルト珪酸 ($\text{Si}(\text{OH})_4$) になるためである。培養液中にすべての他の栄養塩が適当量存在すると、細胞の最終的な増殖量は添加された Si の量によるといわれている⁹¹⁻⁹³⁾。しかしながら、細胞の分裂速度が速い場合には薄い殻が作られ、珪酸殻の厚さは細胞分裂の速度によるといわれる⁷⁸⁾⁹⁴⁾⁹⁵⁾。ある場合には外部の珪素濃度が珪藻の増殖速度に影響するようである。HARVEY⁹⁶⁾は海水に珪酸塩を添加することによつて *Phaeodactylum** の増殖は促進されるようであると述べ、HARDER & WITSCH⁹⁷⁾は sodium “wosserglas” を 0.16% まで加えることによつて珪藻の大量培養で収量を増加させることができたが、0.3% の濃度では増殖は阻害されたと報告している。しかし、*Bacillaria paradoxa* のいわゆる “exponential growth phase” にあるものでは、増殖率は Si の濃度が 10^{-8}g-atom/l までは無関係であるといわれている⁹³⁾。この結果から考えると、珪藻の増殖が阻害されるのは普通天然で見出される最低値あるいはそれ以下ということになるかも知れない。

他の栄養塩が適当量存在すると、*A. formosa*⁹⁸⁾ や *Navicula pelliculosa*⁹⁵⁾ は培養液中のすべての Si を細胞内にとりこむといわれる。とすると以前に報告された、すべての Si が体内に摂取される前に増殖が停止するという結果⁷⁹⁾⁹⁹⁾は他の要素による増殖の限定ということになるかも知れない。同じ栄養塩濃度でも強い光よりも弱光の下で細胞の収量が多いという結果から HUGHES & LUND⁹⁸⁾は *A. formosa* によつて利用される Si の効率光度や照明時間の影響を受けることは明らかであるとしている。

微量金属

鉄 藻類がその増殖に Fe を要求することについては疑問の余地はないようであるが、その供給法については長いこと論議されてきている。アルカリ性溶液における Fe の溶解度は非常に低く、COOPER¹⁰⁰⁾の計算によると、水酸化鉄と平衡して海水中に溶在できる Fe イオンは 10^{-7}mg/l 以下とされている。HARVEY¹⁰¹⁾は珪藻の増殖の研究で、また GOLDBERG¹⁰²⁾はトレーサーとして放射性の Fe を用い、珪藻はコロイド状の微分子 (particulate) から Fe を得ており、クエン酸、酒石酸および腐植酸塩としての Fe は使用されないとしている。しかし、摂取についてはトレーサーを使用した実験で説明することは困難であるように思われる。というのは珪藻の珪酸質膜上の受動的な吸着が原形質内への取入れを遮蔽するかも知れないからである。

SCHATZ & HUTNER¹⁰³⁾ および HUTNER, PROVASOLL, SCHATZ & HASKINS¹⁰⁴⁾ の報告以来、種々のキレート剤¹⁰⁵⁾、就中、EDTA**¹⁰⁶⁾が培養液中に欠かさず使用されている。SPENCER¹⁰⁷⁾は Cu や Mn の EDTA キレート化合物の毒作用や増殖促進作用は全キレート化合物の量ではなく金属のイオン濃度に関係することを報告している。さらに彼は EDTA は安定で物質交代で変化しないことを指摘している。しかし、 C^{14} でラベルした EDTA の実験資料は EDTA は吸収されて分解されることを示し、珪藻はこのようにしてキレート化合物から金属を捕捉するといわれている¹⁰⁸⁾。このような結果は高等植物での観察からも裏付けられている。

細胞内または培養液中におけるキレート化合物の破壊の機構は KRUGERS & AGTERDENBOS¹⁰⁹⁾ および JONES & LONG¹¹⁰⁾ によつて示唆され、JONES ら¹¹⁰⁾は Fe-EDTA キレート化合物は光によつて速かに分解すると述べている。金属は錯化合物の分解によつて徐々に藻類に利用されるようになるものと考えられる。

* HARBEY (1933)⁹⁶⁾ により *Nitzschia closterium* として引用。

** Ethylenediaminetetraacetic acid (sodium salt)。

マンガン *C. vulgaris* が Mn を含まない寒天上でグルコースで従属栄養的に増殖するのに対し、独立栄養の際には Mn が要求されることから、PIRSON & BERGMANN¹¹¹⁾ は Mn と光合成との密接な関係を立証している。Mn は酵素の賦活剤として多くの場合認められているにもかかわらず、光合成反応以外は取除くことができるというのは奇異に感じられる。REISNER & THOMPSON¹¹²⁾ は Mn はグルコース中に夾雑物として含まれていたかも知れないことを示唆して、これらの発見を反ばくしている。しかしながら、彼らの実験は Mn 欠乏の培養液中で独立栄養的に増殖した細胞が増殖を停止した際に、従属栄養的に増殖した細胞の2倍も Mn が多いことを示している。EYSTER, BROWN & TANNER¹¹³⁾ は Mn 欠乏の細胞では光合成が25%減少し、Hill 反応(光合成の明反応)が見られないことを示している。Mn はまた、*C. vulgaris* での硝酸塩の還元にある役割を果たすことが知られている。このことは窒素源が NH_4^+ でなく NO_3^- の場合、アオサ *Ulva* の発芽体の生長を促進するという KYLIN¹¹⁴⁾ の観察によつて裏付けられている。

HARVEY³⁰⁾¹¹⁵⁾ は海産珪藻 *Ditylum brightwelli*, *Dunaliella tertilecta** 海産の *Chlorella*, *Cryptomonad* および2種の *Chrysomonads* などでは Mn 0.5~2.0 $\mu\text{g/l}$ の濃度で活発に増殖すると述べ、Mn は *Chlorella* によつて培養液から速かに摂取されると報告している。GESSEVA¹¹⁶⁾ は藻類の Fe 要求が高いと Mn の要求も高くなることを観察している。POLLARD & SMITH¹¹⁷⁾ は藻類の多糖類による Mn の著しい吸着について報告を行なっている。SPENCER¹⁰⁷⁾ は *Phaeodactylum* では計算によるイオン濃度で Mn が $10^{-9}\text{g}\cdot\text{atom/l}$ になると要求されるようになるが、Cu, Zn あるいは Co では $10^{-13}\sim 10^{-14}\text{g}\cdot\text{atom/l}$ でも欠乏は見られないと述べている。

銅 藻類の増殖には Cu も必要とされているが、その最大要求量と毒性の間の限界は特に狭いようである。GREENFIELD¹¹⁸⁾ は Cu は非常に低濃度 (10^{-7}M) で光合成を阻害すると述べているが、WALKER¹¹⁹⁾ はより低濃度の Cu は *Chlorella* の増殖に不可欠のものであるとしている。PIALLI¹²⁰⁾ は広塩性の藍藻類で研究を行ない、*Spirulina* および *Oscillatoria* sp. の増殖を促進する Cu 濃度で *Phormidium tenue* の増殖が阻害されることを見出している。PROVASOLI & PINTNER²⁰⁾ は微量の Zn, Mn, Cu および Co は数種の鞭毛藻類によつて要求されることを報告している。

モリブデン ARNON ら¹²¹⁾ は *Scenedesmus* で硝酸の還元 Mo は不可欠のものであることを示している。光合成、呼吸および葉緑素成分の還元については LONERAGEN & ARNON¹²²⁾ が報告を行なっている。WOLFE¹²³⁾ は *Anabaena cylindrica* の硝酸塩還元の際の Mo の役割について実験を行ない、Mo がないと NO_3^- が NH_3 に還元されても蛋白が合成されないことを観察している。

コバルト HOLM-HANSEN, GERLOFF & SKOOG¹²⁴⁾ は Co が *Nostoc muscorum*, *Calothrix parietina*, *Coccochloris penicostis* および *Diplocystis aeruginosa* の微量栄養素であることを立証し、対照と区別するには僅か 2 p.p.t. (10^{-9}) で十分であり、至適濃度は 400 p.p.t. であつたと述べている。ビタミン B_{12} を合成する *Cyanophyceae* における Co の役割は明らかであるが、緑藻における Co の増殖刺激効果¹²⁵⁾ は GALSTON & SIEGEL¹²⁶⁾ によつて示唆されているように、多分間接的な保護作用によるものと考えられ、藍藻類以外の他の藻類でも同様な役割を演ずるものと考えられる。

硼 素

B は *N. muscotum* に必要とされ¹²⁷⁾, *chlorella*¹²⁸⁾ や *diatom*¹²⁹⁾ の増殖を刺激することが報告されているが、HERZINGER¹²⁹⁾ によると珪藻の混合培養では B の 10^{-4}M 以上の濃度では増殖が阻害されたといわれる。近年、MCILRATH & SKOK¹³⁰⁾ は 0.5 p.p.m. の B を含む培養液での *C. vulgaris* の増殖量(乾燥重量)は B を含まぬものの 1.37 倍であつたと述べているが、一方では B は不可欠の要素でないという証拠が STEGMAN¹³¹⁾ によつて出されている。培養液にはその必要性についての実質的な裏付けがないままで使用されてきている。

バナジウム 塩化鉄の夾雑物として普通に存在する V は *Scenedesmus* の微量要求物として報告され¹³²⁾, また CO_2 の還元にも関与することが WARBURG, KRIPPAHL & BUCHHOLZ¹³³⁾ によつて述べられてい

* HARVEY (1947)¹¹⁵⁾ により *Chlamydomonas* として引用。

る。

その他の金属 微量の Zn の要求については種々の鞭毛藻類¹³⁴⁾や *chlorella*¹³¹⁾ などで報告されている。Ga は N と P が欠乏している培養液中では細胞の増殖を促進するが、これらの栄養塩が補給されると影響はなくなるといわれている¹³⁵⁾。また、珪藻による Sr^{136) 138)}, Y^{136) 138)}, Ce¹³⁸⁻¹³⁹⁾ および Mo¹⁴⁰⁾ に関する実験的研究が報告されている。

微量元素の要求を明らかにするには培養液に使用する成分を高度に純粋化する必要があることはいうまでもない。HUTNER ら¹⁰⁴⁾ が示唆しているように、培養液に用いる薬品や蒸留水の純度を高めることが技術的に解決されれば、未知の不可欠要素が知られてくる可能性は十分考えられる。

ビタミンおよびホルモン

一般藻類のビタミン要求については PROVASOLI³³⁾, 金沢¹⁴¹⁾ らの綜述があるので、ここでは珪藻に関する

Vitamin requirements of diatoms

No vitamin requirement	Require B ₁₂	Require thiamine	Require B ₁₂ + thiamine
<i>Melosira</i> sp.	<i>Cyclotella nana</i>	<i>Amphiprora paludosa</i> var.	<i>Amphipleura rutilans</i>
<i>Detonula cofeovacea</i>	<i>C. caspia</i>	<i>duplex</i>	<i>Amphora coffaeiformis</i> *
	<i>C. sp.</i>	<i>Amphora coffaeiformis</i> *	<i>Nitzschia closterium</i> *
<i>Fragilaria capucina</i> †	<i>Coscinodiscus</i>	<i>Nitzschia closterium</i> *	
<i>Asterionella formosa</i> †	<i>asteromphalus</i>		
<i>Tabellaria flocculosa</i> †	<i>Thalassiosira</i>		
	<i>nordenskioldii</i> **		
<i>Navicula incerta</i>	<i>Thal'ra fluviatilis</i>		
<i>N. menisculus</i>	<i>Skeletonema costatum</i>		
<i>N. pelliculosa</i>	<i>Stephanopyxis turris</i>		
<i>N. sp.</i>	<i>Rhizosolenia setigera</i> **		
<i>Amphora coffaeiformis</i> *	<i>Chaetoceros lorenzianus</i>		
<i>Nitzschia angularis</i>	<i>Ch. pelagicus</i>		
var. <i>affinis</i>	<i>Ch. sp. (BBsM)</i> ²⁹⁾		
<i>N. putrida</i>	<i>Synedra affinis</i>		
<i>N. filiformis</i>	<i>Achnanthes brevipes</i>		
<i>N. frustulum</i> *	<i>Amphora perpusilla</i>		
<i>N. hybridaeformis</i>	(<i>coffaeiformis</i> ?)		
<i>N. laevis</i>	<i>A. coffaeiformis</i> *		
<i>N. curvilineata</i>	<i>A. lineolata</i>		
<i>N. marginata</i>	<i>Nitzschia frustulum</i> *		
<i>N. obtusa</i> var.	<i>N. ovalis</i>		
<i>scalpelliformis</i>	<i>N. punctata</i>		
<i>N. aff. ovalis</i>	<i>N. seriata</i>		
<i>Phaeodactylum</i>			
<i>tricornutum</i>			
<i>Stauroneis amphoroides</i>			

These data were contributed by HUTNER⁸⁴⁾, HUTNER and PROVASOLI¹⁴⁹⁾, DROOP¹⁴²⁾, PROVASOLI and PINTNER³³⁾, LEWIN¹⁵⁰⁾, J. C. LEWIN and R. A. LEWIN¹⁴⁵⁾, and GUILLAND²⁹⁾.

* Species represented by strains with different vitamin requirements.

** B₁₂ required or markedly stimulatory.

† Fresh water diatoms.

報告の紹介に留めたい。

珪藻のビタミン要求に関する研究の大部分は海産種について行なわれている^{19) 20) 29) 142-146)}。LEWIN & LEWIN¹⁴⁵⁾ によつて分離された沿岸性の珪藻では、その 46% が 1~数種のビタミンを必要とし、25% がコバラミン (B₁₂) だけ、14% がチアミンだけ、また 7% が両方のビタミンを要求したといわれる。浮游性の同心目珪藻 (13 strains) では外部から供給される B₁₂ に依存する割合はさらに高いといわれている²⁹⁾。2 種の海産珪藻の B₁₂ 類似化合物に対する反応が DROOP¹⁴³⁾ によつて研究されている。海水中の B₁₂ の試験生物として *Cyclotera nana* が RYTHYER & GUILLARD¹⁴⁷⁾ によつて使用され、細胞物質 1 μ^3 の生産に必要な B₁₂ の最少量が海産同心目珪藻の 7 clone について算出されている¹⁴⁸⁾。

珪藻のビタミン要求に関する資料^{29) 33) 84) 142) 145) 149) 150)} を整理して次表に示す。羽状目珪藻ではビタミンを必要しないものが多く、B₁₂ の要求は一般に同心目珪藻で多く見られる。

藻類がその生活相(栄養, 生殖)を制御し、他の微生物に影響を与えるようなホルモンおよび生長促進物質を作り出す可能性のあることは十分考えられる。珪藻 *Cocconeis*¹⁵¹⁾ の接合因子、および *Pediastrum*¹⁵²⁾ におけるコロニー形成を規制するいわゆる “Swarming substance” が見出されている。高等植物で最初に分離されたオーキシンおよび関連物質の作用については藻類ではまだ十分に研究されていない。BRANNON¹⁵³⁾ および BRANNON & BARTSCH¹⁵⁴⁾ はこれらの物質の *Chlorella*, *Coccomyxa* および *Mesotaenium* に及ぼす影響について研究を行なっている。彼らは無機の培養液中では NAA*, IAA, IBA** および PAA*** などの増殖促進作用を認めたが、ブドウ糖溶液中では見られなかつたという。したがつて、ホルモンとしての作用それ自体よりもむしろ炭素栄養に役立つものと考えることができる。主に IAA による増殖刺激効果については *Scenedesmus*¹⁵⁵⁾, *Chlorella*¹⁵⁶⁾ などで観察されている。

以上述べたように、藻類に要求される栄養塩の種類および形態、最大必要量、毒性を示す濃度などは藻類のグループによつて異なり、また、種の間でも異なる例が多いという事実は特に留意すべきである。また、ある種の外洋性の珪藻は混菌培養で増殖しているが、無菌培養で外洋種を培養することにまだ誰も成功していないという事実を追加しておきたい。

文 献

- 1) P. MIQUEL: *Le Diatomiste*, 1 (9 & 10), 93~99 & 121~128 (1890~93).
- 2) E. J. ALLEN and E. W. NELSON: *J. Mar. Biol. Assoc. U. K.*, 8, 421~474 (1910).
- 3) 平野礼次郎・大島泰雄: 本誌, 29, 282~297 (1963).
- 4) E. W. NIGHT-JONES: *J. Conseil Perm. Intern. Exploraton Mer.*, 17, 140~155 (1951).
- 5) T. BRAARUD: *J. Conseil, Conseil Perm. Intern. Exploration Mer.*, 12, 321~332 (1937).
- 6) F. GROSS: *J. Mar. Biol. Assoc. U. K.*, 21, 753~768 (1937).
- 7) R. R. L. GUILLARD and J. H. RYTHYER: *Can. J. Microbiol.*, 8, 229~239 (1962).
- 8) L. PROVASOLI, I. J. PINTNER and L. PACKER: *Proc. Am. Soc. Protozool.*, 2, 6 (1951).
- 9) C. P. SPENCER: *J. Mar. Biol. Assoc. U. K.*, 31, 97~106 (1952).
- 10) M. GOLDWEIG-SHELUBSKY: *Palestine J. Botany, Jerusalem Ser.*, 5, 129~131 (1957).
- 11) L. PROVASOLI: *Biol. Bull.*, 114 (3), 375~384 (1958).
- 12) G. C. GERLOFF, G. P. FITZGERALD and F. SKOOG: *Am. J. Botany*, 37, 216~218 (1950).
- 13) M. B. ALLEN: *Arch Mikrobiol.*, 17, 34~53 (1952).
- 14) R. A. LEWIN: *Rev. Algologique*, 4, 181~197 (1959).
- 15) H. R. DANIEL, J. B. MIDDLEBROOK and R. O. BOWMAN: *App. Microbiol.*, 10, 223 (1962).
- 16) R. M. BROWN and H. W. BISCHOFF: *Phycol. News Bull.*, 15, 43~44 (1962).
- 17) L. FRIES: *Physiol. Plant.*, 16, 695~708 (1963).

* α -naphthaleneacetic acid

** 2,3,5-triiodobenzoic acid

*** (2,4-dichlorophenoxy) acetic acid

- 18) S. P. CHU: *J. Ecol.* **30**, 284~325 (1942).
- 19) W. RODHE: *Symbolae Botan. Upsaliensis*, **10** (1), 1~149 (1948).
- 20) L. PROVASOLI and I. J. PINTNER: *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **56**, 839~851 (1953).
- 21) D. CANNON, J. W. G. LUND and J. SIEMINSKA: *J. Ecol.*, **49**, 277~287 (1961).
- 22) L. PROVASOLI and I. J. PINTNER: in "The Ecology of Algae, Spec. Publ." (C. A. TRYON, Jr., & R. T. HARTMAN, eds.) Vol. 2, 84~96, Univ. of Pittsburgh, Pittsburg Pa. (1960).
- 23) B. FØYN: *Arch. Protistenk.*, **83**, 1~56 (1934).
- 24) F. GROSS: *Arch. Protistenk.*, **83**, 178~196 (1934).
- 25) T. BRAARUD: *Plant Psol.*, **4**, 28~34 (1951).
- 26) H. A. BARKER: *Arch. Mikrobiol.*, **6**, 157~181 (1935).
- 27) B. M. SWEENEY: *Am. J. Bot.*, **38**, 669~677 (1951).
- 28) L. PROVASOLI, J. J. A. MCLAUGHLIN and M. R. DROOP: *Arch. Mikrobiol.*, **25**, 392~428 (1957).
- 29) R. R. L. GUILLARD: in "Symp. Marine Microbiol." (E. H. OPPENHEIMER ed.) Chap. 9, 93~104 (1963).
- 30) H. W. HARVEY: *J. Mar. Biol. Assoc. U. K.*, **23**, 499~520 (1939).
- 31) T. BRAARUD: *Avhandl. Norske Videnskaps-Akad. Oslo I. Mat-Naturv. Kl.*, **14**, 1~16 (1945).
- 32) J. F. TALLING: *Limnol. Oceanog.*, **5**, 62~77 (1960).
- 33) L. PROVASOLI: *Ann. Rev. Microbiol.*, **12**, 279~308 (1958).
- 34) J. C. LEWIN and R. R. L. GUILLARD: *Ann. Rev. Microbiol.*, **17**, 373~414 (1963).
- 35) M. R. DROOP: *Botan. Marina*, **2**, 231~246 (1961).
- 36) M. R. DROOP: *Vortr. Ges. Botan., Deut. Botan. Ges.*, **1**, 77~82 (1962).
- 37) H. MOLISH: *Sitzber. Akad. Wiss. Wien. Math-Naturw. Kl.*, **105**, 633~648 (1896).
- 38) G. E. FOGG: *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **7**, 51~70 (1956).
- 39) W. A. KRATZ and J. MYERS: *Am. J. Botany*, **42**, 282~287 (1955).
- 40) C. E. ZOBELL: *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **21**, 517~522 (1935).
- 41) S. P. CHU: *J. Ecol.*, **31**, 109~148 (1943).
- 42) H. W. HARVEY: *J. Mar. Biol. Assoc. U. K.*, **24**, 115~123 (1940).
- 43) H. W. HARVEY: *ibid.*, **31**, 477~487 (1953).
- 44) G. E. FOGG: *Ann. Botany* (London), **20**, 265~285 (1956).
- 45) 松江吉行: 水産学集成, 東大出版会, 東京, (1957).
- 46) E. HARRIS: *Bull. Bingham Oceanog. Collection*, **17**, Art. **1**, 31~65 (1959).
- 47) J. H. RYTHER: *Biol. Bull.*, **106**, 198~209 (1954).
- 48) R. F. VACCARO and J. H. RYTHER: *J. Conseil, Conseil Perm. Intern. Exploration Mer.*, **25**, 260~271 (1960).
- 49) S. S. SAUBERT: *African J. Sci.*, **53**, 335~339 (1957).
- 50) S. ALGEUS: *Physiol. Plantarum*, **1**, 65~84 (1948).
- 51) S. ALGEUS: *ibid.*, **2**, 267~271 (1949).
- 52) S. ALGEUS: *ibid.*, **3**, 225~235 (1950).
- 53) S. ALGEUS: *ibid.*, **3**, 370~375 (1950).
- 54) S. ALGEUS: *ibid.*, **4**, 450~460 (1951).
- 55) S. ALGEUS: *ibid.*, **4**, 495~497 (1951).
- 56) P. ARNOW, J. J. OLESON and J. H. WILLIAMS: *Am. J. Botany*, **40**, 100~104 (1953).
- 57) J. B. WALKER and J. MYERS: *J. Biol. Chem.*, **203**, 143~152 (1953).
- 58) E. C. BIRDSEY and V. H. LYNCH: *Science*, **137**, 763~764 (1962).
- 59) H. W. HARVEY: *J. Mar. Biol. Assoc. U. K.*, **36**, 157~160 (1957).
- 60) L. PROVASOLI and K. GOLD: *Arch. Microbiol.*, **42**, 196~203 (1962).
- 61) L. PROVASOLI and J. J. A. MCLAUGHLIN: in "Symp. Marine Microbiol." (E. H. OPPENHEIMER ed.) Chap. 10, 105~113, Springfield, Ill. (1963).
- 62) I. J. PINTNER and L. PROVASOLI: *ibid.*, Chap. 11, 114~121 (1963).
- 63) K. REICH and M. ASCHNER: *Palestine J. Botany, Jerusalem Ser.*, **4**, 14~23 (1947).
- 64) J. J. A. MCLAUGHLIN: *J. Protzool.*, **5**, 75~81 (1958).

- 65) J. MYERS: *Plant Physiol.*, **22**, 590~597 (1947).
- 66) H. A. SPOEHR and H. W. MILNER: *Plant Physiol.*, **24**, 120~149 (1949).
- 67) M. J. GEOGHEGAN: *Carnegie Inst. Wash. Publ.*, No. 600, 182~189 (1953).
- 68) B. H. KETCHUM: *Am. J. Botany*, **26**, 399~407 (1939).
- 69) R. A. VOLLENWEIDER: *Schweiz. Z. Hydrol.*, **12**, 194~262 (1950).
- 70) C. P. SPENCER: *J. Mar. Biol. Assoc. U. K.*, **33**, 265~290 (1954).
- 71) J. M. KAIN and G. E. FOGG: *ibid.*, **37**, 397~413 (1958).
- 72) S. P. CHU: *Science & Technol. China*, **2**, 37~52 (1949).
- 73) S. P. CHU: *J. Mar. Biol. Assoc. U. K.*, **26**, 285~295 (1946).
- 74) H. W. HARVEY: *ibid.*, **31**, 475~476 (1953).
- 75) J. W. G. LUND: *J. Ecol.*, **37**, 389~419 (1949).
- 76) F. J. MACKERETH: *J. Exptl. Botany*, **4**, 296~313 (1953).
- 77) E. J. KUENZLER and B. H. KETCHUM: *Biol. Bull.*, **123**, 134~145 (1962).
- 78) 松江吉行: 水産研究会報, **2**, 29 (1949).
- 79) J. W. G. LUND: *J. Ecol.*, **38**, 15~35 (1950).
- 80) E. D. GOLDBERG, T. J. WALKER and E. WHISENAND: *Biol. Bull.*, **101**, 274~284 (1951).
- 81) J. D. H. STRICKLAND: *Bull. Fish. Res. Board Can.*, No. 122, 1~173 (1960).
- 82) T. R. PARSONS, K. STEPHENS and J. D. H. STRICKLAND: *J. Fish. Res. Board Can.*, **18**, 1001~1016 (1961).
- 83) L. A. KRUMHOLZ: *U. S. Atomic Energy Commission Document, Technical Information Service*, ORO-132, 1~54 (1954).
- 84) S. H. HUTNER: *Trans. N. Y. Acad. Sci.*, **10**, 136~141 (1948).
- 85) L. PROVASOLI, J. J. A. MCLAUGHLIN and I. J. PINTNER: *ibid.*, **16**, 412~417 (1954).
- 86) M. R. DROOP: *Verhandl. Intern. Ver. Limnol.*, **13**, 722~730 (1958).
- 87) R. W. KRAUSS: *Carnegie Inst. Wash. Publ.*, No. 600, 85~102 (1953).
- 88) T. MATUDAIRA: *Proc. Imp. Acad. (Tokyo)*, **18**, 107~116 (1942).
- 89) J. C. LEWIN: *Recent Advan. Botany*, **1**, 253~254, Univ. Toronto Press. Toronto. (1961).
- 90) J. C. LEWIN: in "Physiology and Chemistry of algae" (R. A. LEWIN ed.) Chap. 27, 445~455, Academic Press, New York (1962).
- 91) J. C. LEWIN: *Plant Physiol.*, **30**, 129~134 (1955).
- 92) E. G. JØRGENSEN: *Physiol. Plant.*, **5**, 161~170 (1952).
- 93) E. G. JØRGENSEN: *Dansk. Botan. Arkiv.*, **18**, 6~54 (1957).
- 94) E. G. JØRGENSEN: *Physiol. Plant.*, **8**, 840~845 (1955).
- 95) J. C. LEWIN: *Can. J. Microbiol.*, **3**, 427~433 (1957).
- 96) H. W. HARVEY: *J. Mar. Biol. Assoc. U. K.*, **19**, 253~276 (1933).
- 97) R. HARDER and H. WITSCH: *von Ber. deut. botan. Ges.*, **60**, 146~152 (1943).
- 98) J. C. HUGHES and J. W. G. LUND: *Arch. Microbiol.*, **42**, 117~129 (1962).
- 99) E. G. JØRGENSEN: *Physiol. Plant.*, **6**, 301~315 (1953).
- 100) L. H. N. COOPER: *J. Mar. Biol. Assoc. U. K.*, **22**, 183~204 (1937).
- 101) H. W. HARVEY: *ibid.*, **22**, 205~219 (1937).
- 102) E. D. GOLDBERG: *Biol. Bull.*, **102**, 243~248 (1952).
- 103) A. SCHATZ and S. H. HUTNER: *Bacteriol. Proc. (Soc. Am. Bacteriologists)*, **49**, 34 (1949).
- 104) S. H. HUTNER, L. PROVASOLI, A. SCHATZ and C. P. HASKINS: *Proc. Am. Phil. Soc.*, **94**, 152~170 (1951).
- 105) S. CHABEREK, Jr., and F. C. BERSWORTH: *Science*, **118**, 280 (1953).
- 106) S. CHABEREK, Jr., F. C. BERSWORTH and A. E. MARTELL: *Arch. Biochem. Biophys.*, **55**, 321~337 (1955).
- 107) C. P. SPENCER: *J. Gen. Microbiol.*, **16**, 282~285 (1957).
- 108) R. W. KRAUSS: *Phycological Soc. Am. News Bull.*, **10**, 27~28 (1957).
- 109) J. KRUGERS and J. AGTERDENBOS: *Nature*, **179**, 45 (1957).
- 110) S. S. JONES and F. A. LONG: *J. Phys. Chem.*, **56**, 25~33 (1952).
- 111) A. PIRSON and L. BERGMANN: *Nature*, **176**, 209~210 (1955).
- 112) G. S. REISNER and J. F. THOMPSON: *Nature*, **178**, 1473~1474 (1956).

- 113) C. EYSTER, T. E. BROWN and H. A. TANNER: *Arch. Biochem. Biophys.*, **64**, 240~241 (1956).
- 114) A. KYLIN: *Kgi. Fysiograf. Sällskap. i Lund, Förh.*, **13**, 185~192 (1943).
- 115) H. W. HARVEY: *J. Mar. Biol. Assoc. U. K.*, **26**, 562~579 (1947).
- 116) K. A. GUSSEVA: *Mikrobiologiya*, **6**, 292~307 (1937).
- 117) A. L. POLLARD and P. B. SMITH: *Science*, **114**, 413~414 (1951).
- 118) S. S. GREENFIELD: *Am. J. Botany*, **29**, 121~131 (1942).
- 119) J. B. WALKER: *Arch. Biochem. Biophys.*, **46**, 1~11 (1953).
- 120) V. K. PILLAI: *Proc. Indo-Pacific Fisheries Council*, [II] **5**, 78~81 (1954).
- 121) D. I. ARNON, P. S. ICHIOKA, G. WESSEL, A. FUJIWARA and J. T. WOOLEY: *Physiol. Plant.*, **8**, 538~551 (1955).
- 122) J. F. LONERAGAN and D. I. ARNON: *Nature*, **174**, 459 (1954).
- 123) M. WOLFE: *Ann. Botany (London)*, **18**, 299~325 (1954).
- 124) O. HOLM-HANSEN, G. F. GERLOFF and F. SKOOG: *Physiol. Plant.*, **7**, 665~675 (1954).
- 125) R. W. KRAUSS: *Sci. Monthly*, **80**, 21~28 (1955).
- 126) A. W. GALSTON and S. M. SIEGEL: *Science*, **120**, 1070~1071 (1954).
- 127) C. EYSTER: *Nature*, **170** 755 (1952).
- 128) A. R. GEIGEL: *J. Agri. Univ. Puerto Rico*, **19**, 5~28 (1935).
- 129) F. HERZINGER: *Pflanzenernährung*, **16**, 141~168 (1940).
- 130) W. J. MCILRATH and J. SKOK: *Plant Physiol.*, **32**, suppl., xxiii (1957).
- 131) G. STEGMAN: *Z. Botan.*, **35**, 385~422 (1940).
- 132) D. I. ARNON and G. WESSEL: *Nature*, **172**, 1039 (1953).
- 133) O. WARBURG, G. KRIPPAHL and W. BUCHHOLZ: *Z. Naturforsch.*, **10b**, 422 (1955).
- 134) K. ONDRATSCHEK: *Arch. Microbiol.*, **12**, 241~253 (1942).
- 135) G. A. RILEY: *Bull. Bingham Oceanog. Coll.*, **8** (4), 53 pp. (1943).
- 136) G. M. SPOONER: *J. Mar. Biol. Assoc., U. K.*, **28**, 587~626 (1949).
- 137) T. R. RICE: *Limnol. Oceanog.*, **1**, 123~138 (1956).
- 138) H. BOROUGHS, W. A. CHIPMAN and T. R. RICE: *Natl. Acad. Sci.-Natl. Res. Council Publ.*, **551**, 80~87 (1957).
- 139) T. R. RICE and V. H. WILLIS: *Limnol. Oceanog.*, **4**, 277~290 (1959).
- 140) R. J. BARSDATE and R. R. L. GUILLARD: *Biol. Bull.*, **121**, 373 (1961).
- 141) 金沢昭夫: 本誌, **29**, 713~731 (1963).
- 142) M. R. DROOP: *J. Mar. Biol. Assoc. U. K.*, **34**, 229~231 (1955).
- 143) M. R. DROOP: *J. Gen. Microbiol.*, **16**, 286~293 (1957).
- 144) 須藤俊造: 水産増殖, **7** (2), 17~19 (1959).
- 145) J. C. LEWIN and R. A. LEWIN: *Can. J. Microbiol.*, **6**, 127~134 (1960).
- 146) R. A. LEWIN: in "Encyclopedia of plant Physiol." (W. RUHLAND ed.), Vol. 14, 401~417, Springer, Berlin (1961).
- 147) J. H. RYTHER and R. R. L. GUILLARD: *Can. J. Microbiol.*, **8**, 437~445 (1962).
- 148) R. R. L. GUILLARD and V. CASSIE: *Limnol. Oceanog.*, **8**, 161~165 (1963).
- 149) S. H. HUTNER and L. PROVASOLI: *Physiological News Bull.*, **6**, 7~8 (1953).
- 150) J. C. LEWIN: *J. Gen. Microbiol.*, **9**, 305~313 (1953).
- 151) L. GEITLER: *Z. Naturforsch.*, **7b**, 411~414 (1952).
- 152) J. E. MONER: *Biol. Bull.*, **107**, 236~246 (1954).
- 153) M. A. BRANNON: *Science*, **86**, 353~354 (1937).
- 154) M. A. BRANNON and A. F. BARTSCH: *Am. J. Botany*, **26**, 271~279 (1939).
- 155) K. YAMAFUJI and S. NAKAMURA: *Enzymologia*, **16**, 130~135 (1953).
- 156) H. C. YIN: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, **23**, 174~176 (1937).