有害赤潮鞭毛藻 *Gymnodinium nagasakiense* の増殖におよぼす 水温、塩分および光強度の影響

山口 峰生, 本城 凡夫

(1989 年 7 月 28 日受付)

Effects of Temperature, Salinity and Irradiance on the Growth of the Noxious Red Tide Flagellate *Gymnodinium nagasakiense* (Dinophyceae)

Mineo Yamaguchi*¹ and Tsuneo Honjo*¹

The noxious red tide flagellate *Gymnodinium nagasakiense* (Dinophyceae) was collected from Suo-Nada, in the western section of Seto Inland Sea. The effects of temperature, salinity and irradiance on growth of this organism were examined using axenic culture to evaluate the relative importance of these factors on dynamics of natural populations. The growth of *G. nagasakiense* was observed at the irradiance more than $10 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ and saturated at $110 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$. The growth of the flagellate was examined in 25 different combinations of temperature (10 to 30°C) and salinity (10 to 30‰) under saturated irradiance. Growth occurred at temperatures from 10 to 30°C and at salinities from 15 to 30‰. The highest growth rate was observed in the combination of 25°C and 25‰. The tolerable salinity range of growth was relatively wide at optimum temperature and was reduced to a much narrower range at sub-optimal temperatures. A statistical test indicates that temperature and salinity interact in their influence on growth. The present study reveals that *G. nagasakiense* is an eurythermal and euryhaline organism. These physiological characteristics presumably allow them to endure the winter as motile cells, which in turn act as the seed population for the summer red tide.

有害赤潮鞭毛藻 *Gymnodinium nagasakiense* は、1965 年に長崎県大村湾で赤潮を形成して以来、¹⁾ 西日本を中心に本種の赤潮が報告されている。^{2),3)} 近年では、1984 年に熊野灘、⁴⁾ 1985 年に周防灘⁵⁾で大規模な赤潮を形成し、それぞれ 43 億円、⁶⁾ 10 億円⁷⁾にのぼる漁業被害を引き起したことは記憶に新しい。このように本種による赤潮は、魚介類に多大な被害をおよぼすため、その発生機構の解明が緊急の課題となっている。とくに、本種の増殖特性および越冬様式を解明することは、重要な課題のひとつと言える。近年冬季の周防灘沿岸⁴⁾や大村湾⁵⁾で本種の栄養細胞が認められており、また五カ所湾では周年にわたり本種の遊泳細胞が観察されている。⁸⁾ しかし、本種の増殖における最適水温、あるいは耐性限界など増殖生理を詳細に検討した例は殆どない。一方、赤潮の発生は多量の降雨による塩分低下に続いて起こること、⁹⁾そ

して塩分自体が増殖速度に影響を与えることが報告されている。^{8),9)} さらに、植物プランクトンの増殖におよぼすこれらの要因が相乗的、干渉的に作用するといった報告もある。^{10),11)} しかし、本種の増殖に関してこれらの要因の相互作用を取り扱った例は皆無である。本報告では、周防灘から分離した *G. nagasakiense* の培養株を用いて、その増殖におよぼす光強度、水温および塩分の影響を調べた。その結果、本種は低光強度下でも増殖可能であること、本種が広温性かつ広塩分性であること、そして 10°C でも増殖可能であることが判明したので報告する。

実験方法

供試株と培地 実験に用いた *G. nagasakiense* は 1985 年に周防灘より分離し、マイクロピペット洗浄法により

*¹ 南西海区水産研究所 (Nansei National Fisheries Research Institute, Ohno, Saeki, Hiroshima 739-04, Japan).

*² 水産庁、三重県、和歌山県：昭和 59 年熊野灘海域に発生したギムノディニウム・ナガサキエンセ赤潮に関する調査報告書、1986, pp. 140.

*³ 伊藤克彦、今井一郎、山口峰生、松尾 豊、安楽正照、寺田和夫、神蘭真人：「赤潮の発生予知技術の開発に関する研究」昭和 60 年度研究報告書、南西水研・東海水研、1986, pp. 7-18.

*⁴ 水産庁瀬戸内海漁業調整事務所：昭和 60 年夏期西部瀬戸内海ギムノディニウム赤潮の発生状況と被害の概要、1986, pp. 1-18.

無菌化したクローン株である。継代培養および実験には海水強化培地である改変 SWM-3¹²⁾ を用いた。無菌検査には SWM-3 を基本とした ST 10⁻¹ 培地¹³⁾ を用いた。

増殖速度におよぼす光強度の影響 光強度 100 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ で前培養を行った *G. nagasakiense* を、培地 300 ml (塩分は 31‰) を入れた 500 ml 容の 3 角フラスコ 10 本に接種した。培養温度は 25°C、光強度は 10 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ から 190 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ までの 10 段階で培養を行った。光源は白色蛍光灯によった。また、明暗周期は 14L: 10D とした。培養開始後 15 日間にわたり、1 日おきに細胞数を計数し、片対数グラフにプロットした。その直線部分(対数増殖期)について、最小自乗法により傾きを計算し、増殖速度 (μ ; divisions/day) を計算した。¹⁴⁾ すなわち、

$$\mu = \frac{n \cdot \sum (t_i \cdot \ln C_i) - (\sum t_i) \cdot (\sum \ln C_i)}{[n \cdot \sum (t_i^2) - (\sum t_i)^2] \cdot \ln 2} \quad (1)$$

ここで、 t_i は培養日数 (day), C_i は細胞数 (cells/ml), n はサンプル数をそれぞれ示す。増殖速度と光強度の関係式には、(2) 式で表せる直角双曲線モデル¹⁵⁾ を適用した。

$$\mu = \mu_m \frac{I}{K_s + I} \quad (2)$$

ここで、 μ は増殖速度 (divisions/day), I は光強度 ($\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$), μ_m は最大増殖速度, K_s は $\mu_m/2$ を与える光強度をそれぞれ示す。そして (2) 式のパラメータは (3) 式に示す逆数プロットにより求めた。

$$\frac{I}{\mu} = \frac{I}{\mu_m} + \frac{K_s}{\mu_m} \quad (3)$$

in vivo クロロフィル蛍光による増殖速度の測定 細胞数の計数に代わる、より迅速で簡便な生物量の測定法として、in vivo クロロフィル蛍光による増殖速度測定法¹⁶⁾ の検討を行った。培地 3 l を入れた平底フラスコに *G. nagasakiense* を接種し、温度 22°C、光強度 100 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$, 12L: 12D の明暗周期で培養を行い、1 日おきに細胞数および in vivo クロロフィル蛍光の測定を行った。蛍光値は蛍光光度計 (TURNER DESIGNS 社製 model 110) で測定した。

増殖におよぼす水温と塩分の影響 SWM-3 培地の塩分濃度は、基本海水を超純水により希釈し、5‰ 間隔で 10‰ から 30‰ までの 5 段階に調整した。また培養温度は、5°C 間隔で、10°C から 30°C の 5 段階に設定した。培養実験はこれら水温と塩分のすべての組み合わせ、すなわち 25 通りについて実施した。まず保存株を実験条件に馴致させるため、以下の継代培養を約 3 カ月間行った。まず温度については、保存株の培養温度である 22°C から、少しづつ温度を上昇あるいは下降させながら実験温度条件に馴致させた。次に各温度で増殖した細胞を 5 段階の塩分濃度の培地に接種した。ただし 10‰ について

Fig. 1. The growth rate (μ) of *Gymnodinium nagasakiense* versus irradiance (I) (open circle). Rectangular hyperbola model, $\mu = \mu_m \cdot I / (K_s + I)$, was fitted by linear transformation (solid circle). K_s (value of I for which $\mu = \mu_m/2$) and μ_m were calculated to be 53.6 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$, 1.18 divisions/day, respectively.

は 15‰ で増殖した細胞を接種した。以上の操作で増殖したものを前培養とした。本培養は培地 4 ml を分注した PP キャップ試験管 (13×120 mm) に前培養を 1 ml 接種し (3 本立て)、光強度 120 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$, 明暗周期 12L: 12D で前培養とおなじ温度で行った。接種細胞密度は、20°C 以上については 10~90 cells/ml (平均 50 cells/ml), 15°C 以下では 80~150 cells/ml (平均 100 cells/ml) であった。培養開始後 1 日おきに in vivo クロロフィル蛍光を測定した。増殖速度は (1) 式の細胞数に蛍光値を代入して計算した。また定常期の最大蛍光値を最大収量とした。結果は 2 因子要因計画法により解析した。

結 果

増殖速度におよぼす光強度の影響 *G. nagasakiense* の増殖速度と光強度の関係を Fig. 1 に示す。*G. nagasakiense* の増殖速度は光強度とともに増加したが、110 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ 以上では約 0.9 divisions/day で飽和した。また、実験した最低光強度 10 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ でも 0.19 divisions/day の増殖速度が認められた。Hofstee の逆数プロットによって計算された μ_m と K_s はそれぞれ 1.18 divisions/day, 53.6 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ であり、増殖速度と光強度の関係は次の式で表せることが明らかとなった。

$$\mu = \frac{1.18 \cdot I}{53.6 + I}$$

そこで、水温と塩分の影響を調べる実験は、増殖速度が飽和する光強度 110 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ 以上で実施した。

増殖におよぼす水温と塩分の影響 *G. nagasakiense* の増殖にともなう細胞密度 (C) と in vivo クロロフィル蛍光 (F) の変化を Fig. 2 に示す。両者の間には次式で示されるような高い相関関係が認められた。

$$\ln C = 1.183 \cdot \ln F + 2.741 \quad (r = 0.99)$$

Fig. 2. Relationship between cell density (C) and *in vivo* chlorophyll fluorescence (F) in *G. nagasakiense* cultures: the regression equation accounts for 98% of the variation.

このことから、増殖速度の測定には細胞数の代わりに蛍光値が使用できることが判明した。

各水温および塩分条件下で培養した *G. nagasakiense* の増殖曲線を Figs. 3~7 に示す。なお前培養において増殖が認められなかった実験区については本培養は行わず、増殖速度は 0.0 とした。まず水温が 30°C の場合は、塩分 15‰ と 10‰ での増殖は観察されなかった。塩分が 30‰ および 25‰ では誘導期もなく、15~20 日まで指数関数的な蛍光値の増加がみられた (Fig. 3)。次に水

温が 25°C の場合は、15‰ 以上の塩分でやはり指数関数的な蛍光値の増加がみられ、その傾きも大きかった (Fig. 4)。この場合も塩分 10‰ での増殖は認められなかった。水温が 20°C の場合は、25°C に比べるとやや直線の傾きが小さく、同様に 10‰ での増殖はみられなかった (Fig. 5)。水温が 15°C の場合には、20°C に比べてさらに傾きが小さくなっており、定常期に達するのに 40~50 日要した (Fig. 6)。10°C の場合は塩分 25‰ 以上でのみ増殖が観察された (Fig. 7)。

先の増殖曲線から増殖速度と最大収量を求め、その結果を水温と塩分の 2 因子要因計画 (繰り返しは完全無作為化) として解析した (Table 1)。増殖速度の場合も最大収量の場合も同様に、水温および塩分の各々の主効果とそれらの交互作用が有意水準 1% で有意であった。したがって、水温と塩分の 2 つの因子が相互に関連しながら *G. nagasakiense* の増殖に影響をおよぼしていることが明らかとなった。また平均平方でみると、増殖速度におよぼす水温と塩分の効果はほぼ等しいことが判明した。しかし、最大収量に関しては塩分の効果の方が大きかった。

Fig. 8 に水温と塩分の組合せに対する増殖速度、および最大収量の等値線を示す。最大増殖速度を与える水温と塩分の組合せは 25°C, 25‰ であった。また、温度が 25°C より上昇あるいは下降するにつれて、至適塩分領域が狭まる傾向がみられた。一方、最大収量を与える条件は 20°C, 30‰ で、増殖速度の場合とは若干異なっていた。

考 察

赤潮の発生過程には大きく分けて 3 つの段階があると

Fig. 3. Growth curves for *G. nagasakiense* cultured in 30°C and three different salinities (30, 25 and 20‰) combinations. Growth was not observed in 15 and 10‰ salinities.

Fig. 4. Growth curves for *G. nagasakiense* cultured in 25°C and four different salinities (30, 25, 20 and 15‰) combinations. Growth was not observed in 10‰ salinity.

Fig. 5. Growth curves for *G. nagasakiense* cultured in 20°C and four different salinities (30, 25, 20 and 15‰) combinations. Growth was not observed in 10‰ salinity.

考えられている。¹⁷⁾ 第1の段階は初期個体群の増加, 第2段階は適度な環境下での増殖, 第3段階は赤潮状態の持続と集積である。したがって, 赤潮の発生機構を解明するためには, 第1については冬季の生活様式の, また第2, 第3については増殖および集積機構の研究が重要になる。ここでは本研究によって得られた水温, 塩分および光に対する増殖応答の結果に基づき, 本種の増殖最適条件および耐性限界について検討し, 赤潮の発生機構について考察する。

本報告における室内実験で *G. nagasakiense* は $10 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ という弱光下でも増殖が可能であり, その増殖速度は $110 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ で飽和することが判明した。また, $190 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ まで強光阻害は認められなかった (Fig. 1)。

Nakamura and Watanabe¹⁸⁾ によれば, わが国の代表的な有害赤潮種である *Chattonella antiqua* の増殖は $0.011 \text{ ly}/\text{min}$ 以上でみられ, 最大増殖速度を与える光強度は $0.04 \text{ ly}/\text{min}$ とされている。これらの光強度は, 波長を 550 nm とした場合, それぞれ $35 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$, $128 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ と換算される。¹⁹⁾ したがって *G. nagasakiense* は *C. antiqua* に比べて弱光下での増殖に有利であると考えられる。

G. nagasakiense は水温, 塩分単独でみた場合, 温度 $10 \sim 30^\circ\text{C}$, 塩分 $15 \sim 30\text{‰}$ の範囲で増殖可能であった。また, 増殖速度の最大値を与える水温と塩分の組み合わせは 25°C , 25‰ であった (Fig. 8)。この最適温度条件は, 大村湾における *G. nagasakiense* 赤潮発生の至適水温が

Fig. 6. Growth curves for *G. nagasakiense* cultured in 15°C and four different salinities (30, 25, 20 and 15‰) combinations. Growth was not observed in 10‰ salinity.

Fig. 7. Growth curves for *G. nagasakiense* cultured in 10°C and two different salinities (30 and 25‰) combinations. Growth was not observed in 20, 15 and 10‰ salinities.

26~30°Cであるという報告¹⁾とはほぼ一致する。また Iwasaki²⁰⁾は総説の中で、赤潮鞭毛藻の増殖最適水温をまとめている。それを参照すると、25°C以上に最適域を有する種は少なく、また増殖可能な温度範囲が20°Cにわたる種はほとんどない。したがって、25°Cという高い最適温度を有することは、本種が夏季に他の藻類と共存しながら、次第に生息場を独占できる重要な要因の一つであると考えられる。

五カ所湾においては21~13°Cで本種の冬季赤潮が発生しており、²⁾また冬季の周防灘沿岸(水温10°C以上)でも 10^8 cells/mlを越える高い細胞密度が観察されている。⁴⁾これらの赤潮発生時および冬季の現場観察と本実験結果から、本種は広温性種(eurythermal species)であると判断される。

*G. nagasakiense*の増殖速度の温度依存性を調べるため Fig. 9 にアレウスプロットを示す。25°C以下のデ

Table 1. Summary of two-way analysis of variance of growth rate and maximum yield as a function of temperature, salinity and their interaction

Variables	Source of variation	Degrees of freedom	Sum of squares	Mean square	F
Growth rate	Total	74	7.3772		
	Temperature	4	3.1042	0.7761	1261.41***
	Salinity	4	3.0434	0.7608	1236.69***
	Interaction	16	1.1988	0.0749	121.79***
	Error	50	0.0308	0.0006	
Maximum yield	Total	74	29949.0		
	Temperature	4	7301.1	1825.3	33.69***
	Salinity	4	15630.0	3907.5	72.13***
	Interaction	16	4309.3	269.3	4.97***
	Error	50	2708.6	54.2	

*** Significant at the 1% level

Fig. 8. Contour plots of growth rate (divisions/day) (left) and final cell yield ($\times 10$ relative fluorescence unit) (right) of *G. nagasakiense*.

ータを用いて計算した Q_{10} は塩分 30, 25, 20, 15‰ についてそれぞれ 3.3, 4.2, 2.0, 2.0 であった。25‰ 以上の値は植物プランクトンの光合成速度で報告されている 2.0~2.3²¹⁾ や藍藻の増殖速度の 1.5~2.1²²⁾ に比べて 1.5~2 倍程度大きい。したがって、25‰ 以上の好適塩分域では、*G. nagasakiense* の増殖速度は温度変化に極めて鋭敏に依存することが判った。

飯塚および入江¹⁾ は蒸留水希釈海水の方が現場海水よりも培養成績が良いことから、本種が低塩分種であると推測した。培養実験でも大村湾から分離された株は塩素量で 11~18.5‰ に好適領域を有していることが報告されている。^{2a)} これは塩分に換算すると 19.9~33.4‰ に相当する。さらに五カ所湾産株の好適塩分範囲は 18~

33.5‰ で 22‰ 付近で最高の増殖が観察されている。^{*1} さらに、1984 年の熊野灘南部の赤潮時には 10^4 cells/ml 以上の細胞密度は 18.0~34.0‰ の範囲に見られている。^{*2} したがって、本研究で得られた周防灘株の結果も合わせて考えると、*G. nagasakiense* は広塩分性種 (euryhaline species) であり、むしろ低塩分を好む種であると考えられる。これは本種の赤潮が大量の降雨の後に起こるという現場観察ともよく一致する。^{*2a, 2b), *2, 3}

本研究において塩分 10‰ の場合、すべての温度条件下で *G. nagasakiense* は増殖しなかった。塩分 15‰ で増殖させた細胞を、10‰ の培養液に接種した後に顕微鏡で観察したところ、寺田ほか⁴⁾ が冬季の周防灘 (水温 3.5~3.8°C) や培養 (水温 4°C) で観察したような、球形

*1 岩崎英雄: 昭和 59 年度赤潮生物動態解明試験報告書 (水産庁), 1985, pp. 1-8.

*2 水産庁, 三重県, 和歌山県: 昭和 59 年熊野灘海域に発生したギムノディニウム・ナガサキエンセ赤潮に関する調査報告書, 1986, pp. 140.

*3 伊藤克彦, 今井一郎, 山口峰生, 松尾 豊, 安楽正照, 寺田和夫, 神薗真人: 「赤潮の発生予知技術の開発に関する研究」昭和 60 年度研究報告書, 南西水研・東海水研, 1986, pp. 7-18.

Fig. 9. Effect of temperature on the growth rate of *G. nagasakiense* grown in four different salinities. Upper and lower dotted lines indicate theoretical curves whose Q_{10} values are assumed to be 3.0 and 2.0, respectively.

あるいは風船状の突出物を持った異常形態を呈した。したがって、このような異常形態は、低温下のみならず低塩分条件下でも起こることが明らかとなった。沼口および平山²³⁾は大村湾産株が塩素量 7.38‰ (塩分 13.3‰ に相当) では増殖しなかったと報告している。これらのことから *G. nagasakiense* の最低塩分限界は 10~15‰ の間にあるものと考えられる。しかし、熊野灘に出現した *G. nagasakiense* は 10‰ 以下の塩分濃度の水域でも細胞数で 10^3 cells/ml 程度存在することが報告されており、²²⁾ *G. nagasakiense* の低塩分耐性については、分離株間による生理的特性の差も考慮して、さらに検討が必要であろう。

次に瀬戸内海で漁業被害を起こす代表的な赤潮生物種である *Chattonella* と比較して、*G. nagasakiense* の低水温に対する耐性と越冬様式について考察する。*Chattonella* は 13°C では増殖できないが、²⁶⁾ 今回の結果から *G. nagasakiense* は 10°C でも十分増殖可能であることが判った。さらにその生存はより低い 6.5~9°C でも可能であることも報告されている。⁴⁾ 瀬戸内海における冬季の最低水温が約 7°C 付近であることから、²⁷⁾ *Chattonella* は遊泳細胞では越冬できず、シストによって越冬することが明らかにされた。²⁸⁾ しかし、*G. nagasaki-*

ense については未だシストに関する報告がない。一方、冬季の現場海域で本種の遊泳細胞が確認されており、^{4, 6)} また五ヶ所湾では周年遊泳細胞が認められている。⁹⁾ したがって、本種は遊泳細胞の形態で越冬し、それが翌年の赤潮のシードポピュレーションとなる可能性が大きいと考えられる。

赤潮による漁業被害を防止するためには、いつ、どこで被害をおよぼす高細胞密度まで *G. nagasakiense* が増殖するかを的確に予測することが望ましい。このためにはその増殖や生存を支配する物理、化学、生物的要因の影響を数量的に把握する必要がある。先の分散分析の結果、水温と塩分の相互作用が有意であること (Table 1), そして各水準が等間隔でとられていることから、増殖速度におよぼす水温と塩分の関係を数量的に表すために多項式の当てはめを行った。モデルとしては一般に次の式が考えられる;

$$\begin{aligned} \mu = & \beta_{00} + \beta_{10} \cdot T + \beta_{20} \cdot T^2 + \beta_{30} \cdot T^3 + \beta_{01} \cdot S \\ & + \beta_{02} \cdot S^2 + \beta_{03} \cdot S^3 + \beta_{11} \cdot T \cdot S + \beta_{12} \cdot T \cdot S^2 \\ & + \beta_{21} \cdot T^2 \cdot S + \dots + \beta_{nn} \cdot T^n \cdot S^n + \varepsilon \end{aligned}$$

ここで μ は増殖速度 (divisions/day), T は水温 (°C), S は塩分 (‰), β_{nn} は偏回帰係数, ε は誤差項をそれぞれ示す。ここでは 3 次までをとり変数増減法による重回帰分析によって偏回帰係数を求めた。その結果、次に示す項が有意で残り、重回帰式が求まった。

$$\begin{aligned} \mu = & 1.05753 - 0.30220 \cdot T + 0.01777 \cdot T^2 \\ & - 0.00035 \cdot T^3 + 0.00515 \cdot T \cdot S - 0.00010 \cdot T \cdot S^2 \end{aligned}$$

また重回帰係数は 0.94 であった。したがって、この式により、光条件および栄養塩が制限要因になっていない条件下での増殖速度の予測が行えると考えられる。

本研究で明らかになったように水温、塩分および光強度は本種の群集動態を支配する重要な要因である。しかし、本種の増殖には溶存有機物、²⁹⁾ 硫化ナトリウム³⁰⁾あるいは微量金属³¹⁾も影響をおよぼすことが報告されており、化学的条件と増殖との関係を無視することはできない。したがって今後の問題として、*G. nagasakiense* の栄養要求性および生活史の解明、そして現場海域での観察を通して本種赤潮の動態を左右する要因に関する知見を蓄積させていく必要がある。

謝 辞

本研究は環境庁国立機関公害防止等試験研究費「赤潮の発生予知技術の開発に関する研究」によって行われた。

引用文献

- 1) 飯塚昭二, 入江春彦: 長大水研報, **21**, 67-101 (1966).

- 2) 本城凡夫: 赤潮の科学 (岡市友利編), 恒星社厚生閣, 東京, 1987, pp. 228-237.
- 3) K. Matsuoka, S. Iizuka, H. Takayama, T. Honjo, Y. Fukuyo, and T. Ishimaru: in "Red Tides: Biology, Environmental Science, and Toxicology", (ed. by T. Okaichi, D. M. Anderson, and T. Nemoto), Elsevier Science, New York, 1989, pp. 101-104.
- 4) 寺田和夫, 池内 仁, 高山晴義: 日本プランクトン学会報, **34**, 201-204 (1987).
- 5) 中田憲一, 飯塚昭二: 日本プランクトン学会報, **34**, 199-201 (1987).
- 6) T. Honjo, S. Yamamoto, O. Nakamura, and M. Yamaguchi: in "Toxic Marine Phytoplankton", (ed. by E. Granéli, B. Sundström, L. Edler, and D. M. Anderson), Elsevier Science, New York, (in press).
- 7) L. B. Slobodkin: *J. Mar. Res.*, **12**, 148-155 (1953).
- 8) T. Braarud: *Physiol. Plant.*, **4**, 28-34 (1951).
- 9) D. V. Aldrich and W. B. Wilson: *Biol. Bull.*, **119**, 57-64 (1960).
- 10) C. R. Tomas: *J. Phycol.*, **14**, 309-313 (1978).
- 11) L. Norris and K. K. Chew: in "Toxic Dinoflagellate Blooms" (ed. by V. R. LoCicero), Mass. Sci. Technol. Found., Massachusetts, 1975, pp. 143-152.
- 12) 伊藤克彦, 今井一郎: 赤潮生物研究指針 (日本水産資源保護協会), 秀和, 東京, 1987, pp. 122-130.
- 13) 石田祐三郎, 赤木美治: 海洋微生物研究法 (門田 元, 多賀信夫編), 学会出版センター, 東京, 1985, pp. 81-98.
- 14) R. R. L. Guillard: in "Handbook of Phycolological Methods, Culture Methods and Growth Measurements" (ed. by J. R. Stein), Cambridge Univ. Press, Cambridge, 1979, pp. 289-311.
- 15) T. C. Lederman and P. Tett: *Bot. Mar.*, **24**, 125-134 (1981).
- 16) L. E. Brand, R. R. L. Guillard, and L. S. Murphy: *J. Plankton Res.*, **3**, 193-201 (1981).
- 17) K. A. Steidinger: in "Toxic Dinoflagellate Blooms" (ed. by V. R. LoCicero), Mass. Sci. Technol. Found., Massachusetts, 1975, pp. 153-162.
- 18) Y. Nakamura and M. M. Watanabe: *J. Oceanogr. Soc. Japan*, **39**, 110-114 (1983).
- 19) 有賀祐勝, 横浜康継: 藻類研究法 (西澤一俊, 千原光雄編), 共立出版, 東京, 1979, pp. 436-453.
- 20) H. Iwasaki: in "Biochemistry and Physiology of Protozoa" (ed. by M. Levandowsky and S. H. Hutner), vol. 1, 2nd ed., Academic Press, New York, 1979, pp. 357-393.
- 21) C. S. Reynolds: *The Ecology of Freshwater Phytoplankton*, Cambridge Univ. Press, Cambridge, 1984, pp. 192-224.
- 22) R. H. Foy, C. E. Gibson, and R. V. Smith: *Br. phycol. J.*, **11**, 151-163 (1976).
- 23) 沼口克之, 平山和次: 長大水研報, **33**, 7-10 (1972).
- 24) 飯塚昭二, 入江春彦: 日本プランクトン学会報, **16**, 99-115 (1969).
- 25) C. H. Cho: *Bull. Korean Fish. Soc.*, **14**, 227-232 (1981).
- 26) 矢持 進: 日本プランクトン学会報, **31**, 15-22 (1984).
- 27) 小村久美男: 神戸海洋気象台彙報, **201**, 10-39 (1983).
- 28) I. Imai and K. Itoh: *Mar. Biol.*, **94**, 287-292 (1987).
- 29) 西村昭史: 日本プランクトン学会報, **29**, 1-7 (1982).
- 30) K. Hirayama and K. Numaguchi: *Bull. Plankton Soc. Japan*, **19**, 13-21 (1972).
- 31) T. Ishimaru, T. Takeuchi, Y. Fukuyo and M. Kodama: in "Red Tides: Biology, Environmental Science, and Toxicology" (ed. by T. Okaichi, D. M. Anderson, and T. Nemoto), Elsevier Science, New York, 1989, pp. 357-360.