

大容量タンクで観察された自然植物プランクトン群集の 製鋼スラグ添加に対する増殖応答： 植物プランクトン群集の量と分類群組成変化

中村 恵江*・谷口 旭*

Phytoplankton Response to the Enrichment with Steelmaking Slags Observed in Large-volume Outdoor Tanks:
Change of a Phytoplankton Assemblage in Abundance and Taxonomic Composition

Yasue NAKAMURA and Akira TANIGUCHI

Synopsis : In two series of the culture experiments to observe responses of a natural phytoplankton assemblage to enrichment with different steelmaking slags, de-Si slag and de-P slag temporal change of the assemblage in abundance and taxonomic composition was recorded. Phytoplankton chlorophyll *a* and abundance of diatoms attained their maxima on the 13th day in the first series, whereas on the 5th day in the second series. Among diatoms *Skeletonema costatum* was benefited most strikingly by the enrichments, particularly with the de-P slag. After the maxima, phytoplankton and diatoms as well readily decreased without forming a stationary state. Such a rapid initiation of decrease might be caused by the following three reasons, which were not directly caused by the slag enrichment. 1) Grazing by microheterotrophs such as amoebae, 2) physiological death caused by severe nitrogen depletion, and 3) sinking accelerated by coagulation with, fibrous exudate and filamentous bacteria.

Key words : de-Si slag; de-P slag; diatoms; *Skeletonema*; Thalassiosiraceae; SEM.

1. はじめに

製鋼スラグを栄養源として用いて海洋植物プランクトンの増殖促進に利用するための基礎的実験を、前報¹⁾で詳述したように、屋外設置型の3基の大型水槽を用いて行った。前報では、培養系(タンク)内の栄養塩とクロロフィルの経時変化から、スラグ添加には海洋植物プランクトン増殖促進効果があることを明らかにした。本報では、その間に起こった植物プランクトン群集の量と分類群組成の変化について報告する。

2. 実験方法と材料

2.1 植物プランクトン検鏡観察

スラグ添加実験区の設定は前報に述べた通りである¹⁾。各区から1日おきに植物プランクトン計数用の試水1000 mlを採水し、直ちに中性ホルマリン25 mlを添加して固定した。固定後24時間以上経過した後、1昼夜以上静置してプランクトンを沈殿させ、上澄み液をサイホンで除去し、約100 mlに1次濃縮を行った。さらにこの試水を同様にして沈殿濃縮した。その結果2-10 mlの濃縮試料が得られた。濃縮試料の一定量をマイクロチューブに採取し、ルゴール液10 μ lを添加してヨード染色したもの1 mlまたは0.3 mlをプランクトン計数板に入れ、生物顕微鏡を用いて観察・計数を行った。ヨードによって生物体が染色されて、コントラストが増すので観察や計数がしやすくなる。実験初期

で細胞数密度が少ないときは、原試水500 ml中の全プランクトンを計数するように検鏡試料量を決めた。実験中後期に植物プランクトンが増殖したときは、原試水1 mlを検鏡し、特に多量な分類群の計数には、さらに少量の原試水を検鏡するようにした。細胞サイズの測定には、接眼マイクロメーターで直接測定する方法と、デジタルカメラでパソコンに取り込んだ画像をNIH Image 1.61/68kで処理する方法とを併用した。

この外に細胞の生理状態を観察するために、実験期間中適宜蛍光顕微鏡による細胞形態の観察を行った。スライドガラス上にイムノペンで18×18 mmの枠を作り、枠中に沈殿濃縮した試水20 μ lを滴下し、それに5% DAPI溶液およびグリセリンをそれぞれ1滴加えた後、試料が均一に分布するようにし、カバーガラスで封入して検鏡に共した。

植物プランクトン計数用試料の一部は走査型電子顕微鏡による観察にも使用した。その試料は、自然乾燥法およびヌクレポアフィルターバッグ法²⁾の二方法によった。それぞれの概要は次のようである。まず自然乾燥法では、沈殿濃縮した試水2-3滴をスライドガラス上に滴下して自然乾燥・脱塩したもの、または、濃縮試水約0.2 mlを孔径0.4 μ mのヌクレポアフィルターで濾過したものを、蒸留水で脱塩・乾燥させた。フィルターバッグ法では、試水適当量(濃縮試水2-3滴)を0.4 μ mのヌクレポアフィルターで作製したバッグ中に注入して、バッグの口を封じた後、順次高い濃度のエタノール中で置換脱水し、最後に臨界点乾燥した。いずれの乾燥試料もPtで蒸着した後、走査型電子

顕微鏡（以下SEM）の検鏡に供した。また別にクロロフィル測定後のフィルター類をSEM観察およびX線分析に供した。

3. 結果と考察

3.1 植物プランクトン群集の細胞数密度の経時変化

第1回実験の開始時には、対照区では総植物プランクトン細胞数密度は620 cells/l, そのうち珪藻類は470 cells/l, 脱珪スラグ添加区および脱りんスラグ添加区では、総植物プランクトンおよび珪藻類細胞数密度はそれぞれ880および330 cells/l, 740および120 cells/lであり、いずれも自然群集から期待される細胞数密度よりも低かった。一宮³⁾によると、松島湾におけるこの時期の珪藻類細胞数密度は 1×10^5 cells/lである。それに比較すると、本実験での初期値は1%程度にすぎなかったことになる。これは圧力式砂濾過を経たことによる。実験開始後1日目には総植物プランクトン細胞数密度は、対照区、脱珪スラグ添加区および脱りんスラグ添加区で、それぞれ830, 150, 210 cells/lとなり、対照区ではわずかに増加したのに対してスラグ添加区では減少した。同様の遅延期間は珪藻類にもみられた。しかし、3日目を降どの実験区でも細胞数密度が高くなり、1日おきに観察した結果明らかになった総植物プランクトン細胞数密度の最大値は、対照区では13日目に 21×10^6 cells/l, 脱珪スラグ添加区では13日目に 23×10^6 cells/l, 脱りんスラグ添加区では13日目に 34×10^6 cells/lとなった。そのうち珪藻類は、それぞれ20, 23, 32×10^6 cells/lで、いずれも優占度は90%以上であった。珪藻類の豊度は、脱りんスラグ添加区で最も高くなり、中でも *Skeletonema costatum* (Fig.11-H, 以下 *Skeletonema* とする) の最大細胞数密度は13日目に 17.0×10^6 cells/lとなった。これに対して対照区では13日目に 7.3×10^6 cells/l, 脱珪スラグ添加区では15日目に 8.5×10^6 cells/lであった。円形の中心目珪藻には複数の種が含まれているが、光学顕微鏡では種の同定が困難であったため、*Thalassiosira* 類（以下 *Thalassiosiraceae* とする）として分類

分けした。*Thalassiosiraceae* は、対照区で13日目に 9.4×10^6 cells/l, 脱りんスラグ添加区で11日目に 10.7×10^6 cells/l, 脱珪スラグ添加区で11日目に 12.5×10^6 cells/lの順で多くなった。羽状目珪藻は、対照区で15日目に 5.0×10^6 cells/l, 脱珪スラグ添加区で13日目に 7.1×10^6 cells/l, 脱りんスラグ添加区で13日目に 7.4×10^6 cells/lとなり、両スラグの添加効果はほぼ等しかった (Fig. 1)。珪藻類以外では *Euglenaceae* と *Prasinophyceae* が優占した。*Euglenaceae* は、実験開始時には、対照区で30 cells/l, 脱珪スラグ添加区で100 cells/l, 脱りんスラグ添加区で130 cells/lを占め、珪藻類に次いで多かった。最大値は、対照区では13日目に 31×10^3 cells/l, 脱りんスラグ添加区では15日目に 69×10^3 cells/l, 脱珪スラグ添加区では11日目に 97×10^3 cells/lの順となり、いずれも珪藻に比べてかなり低かった (Fig. 2)。*Prasinophyceae* は、開始時にはいずれの区でも20 cells/lと少なかったのが、対照区では11日目に 1.4×10^6 cells/l, 脱珪スラグ添加区では11日目に 1.3×10^6 cells/l, 脱りんスラグ添加区では15日目に 2.0×10^6 cells/lの順となり、全区でよく増殖した。この種は数 μ m程度の小型種であるため本実験中の計数でも過小評価された可能性は否定できないが、得られた結果は高い増殖率を示していた (Fig. 2)。

第2回目の実験開始時における総植物プランクトン細胞数密度は1回目実験と同様に低く、156 cells/lであり、珪藻類は136 cells/lであった。第2回目の培養では遅延期間はみられず、総植物プランクトン細胞数密度は直ちに増加を始め、最大値に達したのはすべての実験区で5日目で、対照区では 32×10^6 cells/l, 脱珪スラグ添加区では 36×10^6 cells/l, 脱りんスラグ添加区では 33×10^6 cells/lとなり、対照区とスラグ添加区との差は小さかった (Fig. 3)。最優占種は *Skeletonema* であり、対照区では 10.9×10^6 cells/l, 脱珪スラグ添加区では 21.7×10^6 cells/l, 脱りんスラグ添加区では 21.4×10^6 cells/lであり、明らかにスラグ添加区で多くなっていた。*Thalassiosiraceae* も5日目に最大となったが、その量は対照区では 17.3×10^6 cells/lであったのに対して、脱珪スラグ添加区では 11.8×10^6 cells/l, 脱りんスラグ添加区では $10.0 \times$

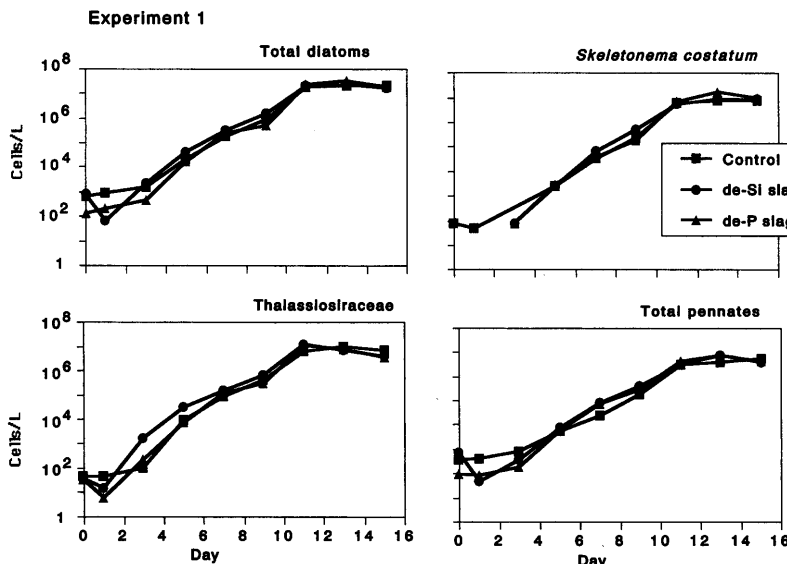


Fig. 1. Temporal changes in abundance of (A) total diatoms, (B) *Skeletonema costatum*, (C) *Thalassiosiraceae* and (D) total pennates in control tank and enriched tanks with de-Si slag and with de-P slag during Experiment 1.

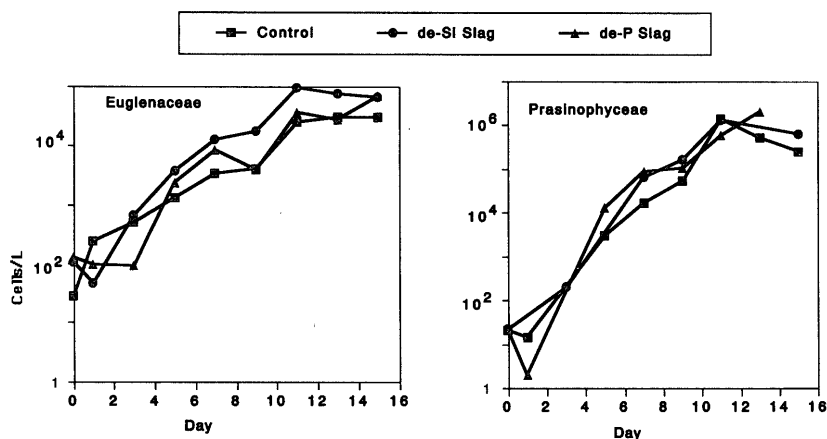


Fig. 2. Temporal changes in abundance of (A) Euglenaceae and (B) Prasinophyceae in control tank and enriched tanks with de-Si slag and with de-P slag during Experiment 1.

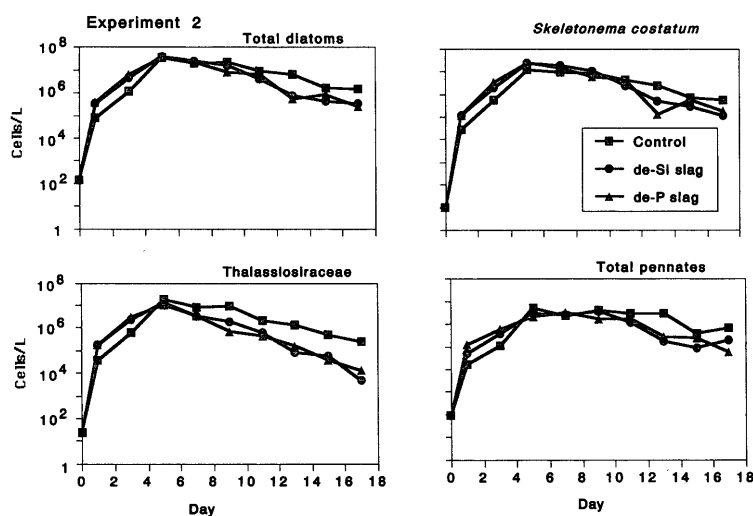


Fig. 3. Temporal changes in abundance of (A) total diatoms, (B) *Skeletonema costatum*, (C) Thalassiosiraceae and (D) total pennate in control tank and enriched tanks with de-Si slag and with de-P slag during Experiment 2.

10⁶ cells/lとなり、スラグ添加区ではむしろ少なかった。羽状目珪藻もまたスラグ添加区での増殖は低く、対照区では5日目に4.1×10⁶ cells/lとなったのに対して、脱珪スラグ添加区では9日目に3.7×10⁶ cells/l、脱りんスラグ添加区では7日目に3.2×10⁶ cells/lにとどまっていた。すなわち、Thalassiosiraceaeと羽状目珪藻の最大細胞数密度は、対照区>脱珪スラグ添加区>脱りんスラグ添加区の順となり、第1回実験時にはスラグ添加の効果がみられたことと異なっていた。このことが、第2回実験ではクロロフィル濃度が全実験区でほぼ等しかった¹⁾原因であると考えられるが、なぜこのようになったのかは説明できない。第2回実験では、珪藻類以外の植物プランクトンは実験期間中非常に少なかった。

前報では、クロロフィル濃度が最大に達した後いずれの実験区においても急激に減少することを報告した¹⁾。しかし、本報で明らかになった総植物プランクトンおよび珪藻類の細胞数密度には、最大値以降の急激な減少はみられなかった (Fig. 1, 3)。そこで、クロロフィル濃度の縦軸を対数目盛に描きかえて珪藻類細胞数密度の変化と比較した。第1回実験では (Fig. 4)、クロロフィル濃度は実験開始直後からほぼ直線的に増加していたのに対して、珪藻類の増殖には1-2日間の遅延期間 (lag time) があった。したがって珪藻類の貢献は、実験初期には低かったのが、培養中に高くなったものと判断できる。また、クロロフィル濃度が最

大に達した後に珪藻類に最大値がみられることが多く、しかもクロロフィル濃度がおよそ1/10に低下しても珪藻類の減少はほとんどなかった。すなわち、クロロフィル濃度と珪藻類細胞数密度が高い相関を示すのは対数増殖期だけであった。遅延期間中に珪藻類の貢献度が低かったことは前に述べたが、実験後期には細胞数でみた珪藻類の優占度は一貫して高かった。それにも関わらずクロロフィル最大値以降にはクロロフィル濃度と珪藻類細胞数密度との間に相関がなかったことについては後述する (Fig. 4)。

第2回実験では、実験開始直後から全実験区で珪藻類細胞数密度もクロロフィル濃度も対数的に増加しており、両者の相関は高かった (Fig. 5)。極大後の減少過程でも両者の相関は第1回実験時よりも高いが、やはり珪藻細胞数の減少よりもクロロフィル濃度の低下の方が顕著であった。

混合培養系における植物プランクトンのピーク後減少は、一般に動物プランクトンの摂食によると説明される⁴⁾。しかし、本実験では繊毛虫が僅かにみられただけで、その他に摂食者と考えられる動物プランクトンはほとんど計数されなかった。検鏡試水量が少なかったことも一因と考えられるが、全体的に植物プランクトン摂食者は少なかったといえる。

被摂食者以外にクロロフィルを減少させるものとして、植物プランクトンが表層中で死亡して消失するという過程もある⁵⁻⁹⁾。鏡味・川端は、寄生による死亡と生理的死亡

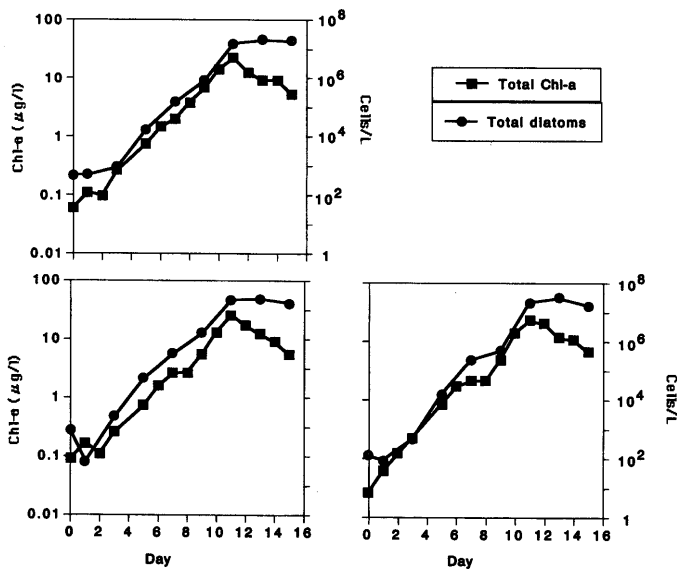


Fig. 4. Comparison of temporal changes of (A) total diatoms and chlorophyll *a* of total phytoplankton in control tank and enriched tanks with de-Si slag and with de-P slag during Experiment 1.

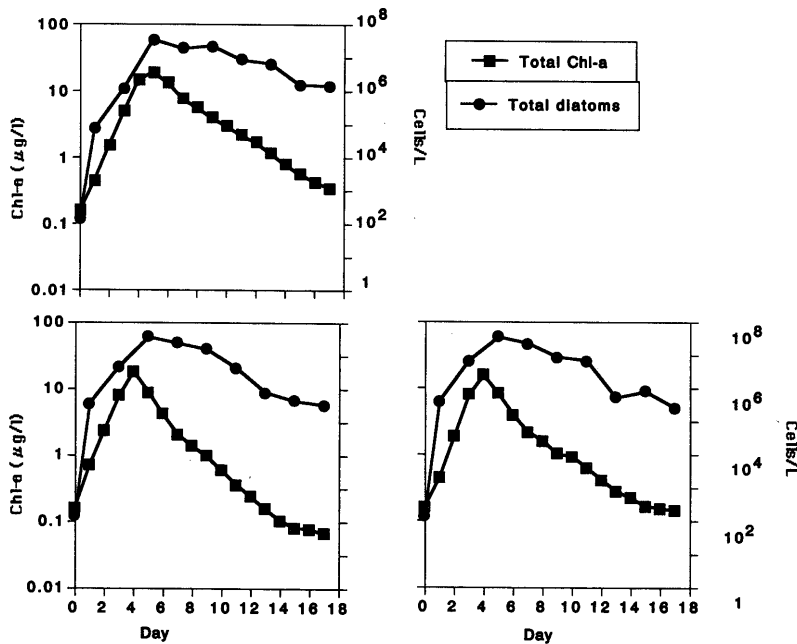


Fig. 5. Comparison of temporal changes of (A) total diatoms and chlorophyll *a* of total phytoplankton in control tank and enriched tanks with de-Si slag and with de-P slag during Experiment 2.

をあげている⁹⁾。そこで、本実験では植物プランクトンの生理状態等を観察した。実験初期のスラグ添加区から採取した検鏡試水には不定形の凝集物が多くみられた。その大部分はDAPIでは染色されないのが生物体ではないと判断された。しかし、その凝集物の中には珪藻類が存在し、しかもその珪藻は葉緑体が充満している健康な細胞であった。この凝集物が、前報でクロロフィル測定用のGF/Fフィルターが濾過後に褐色化したと述べた現象の原因物である。これは対照区には全く出現しなかったため、スラグから溶出した凝集物であると思われる (Fig.12-D)。その出現は、植物プランクトンが増殖するに従ってみられなくなり、本来この物質が可溶性であることが推測された。

増殖期にはほとんどの珪藻細胞は葉緑体が充満した健康細胞であったのに対し、ピーク時には細胞中で葉緑体の分布が偏って凝集したり、原形質分離して塊状になった細胞が多くなり、これが生理的死亡の兆候であると考えられた。こうした生理的死亡の原因は、前報で述べたように、本実

験系では後半にN律速が起こったことによると考えられる。Nの欠乏が植物プランクトンのクロロフィル合成を阻害することはよく知られている。本実験ではその他に寄生による死亡もあったかも知れない (Fig.11-I)。しかし、死亡だけではピーク後の細胞数密度減少を説明できない。すなわち、細胞死は空の細胞殻を増加させるはずなのに、その数は差ほど増加していなかった。一方、実験後期には、SEMで珪藻細胞から排出されたと思われる繊維状有機物と糸状菌および不健康な珪藻細胞からなる凝集体が多く観察された。したがって、本実験においてクロロフィルおよび細胞数密度が減少した原因は、被摂食、生理的死亡および凝集体にとりこまれて沈降することであったと考えられる。細胞が有機物を排出することも細胞の健康度低下の兆候であり、それが栄養塩欠乏によって発現することもよく知られている。

なお、本実験では珪藻細胞を摂食しているアメーバがかり観察された。海洋生態系における植物プランクトン摂食

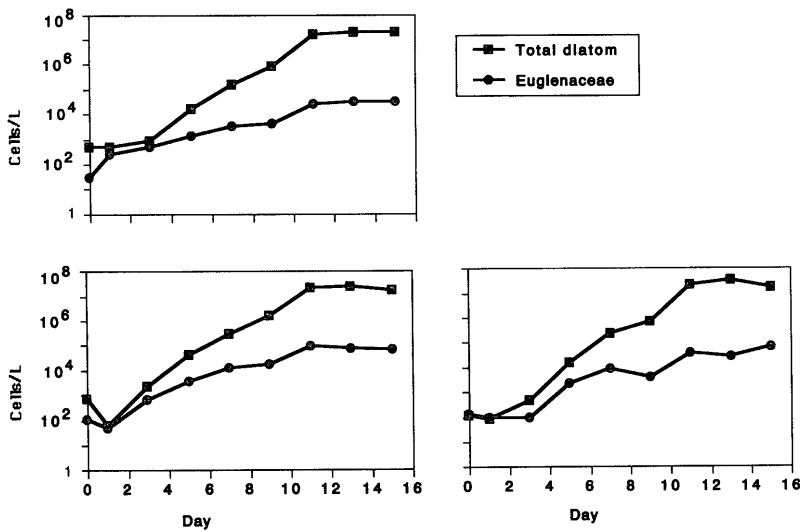


Fig. 6. Comparison of temporal changes in abundance of total diatoms and Euglenaceae in control tank and enriched tanks with de-Si slag and with de-P slag during Experiment 1.

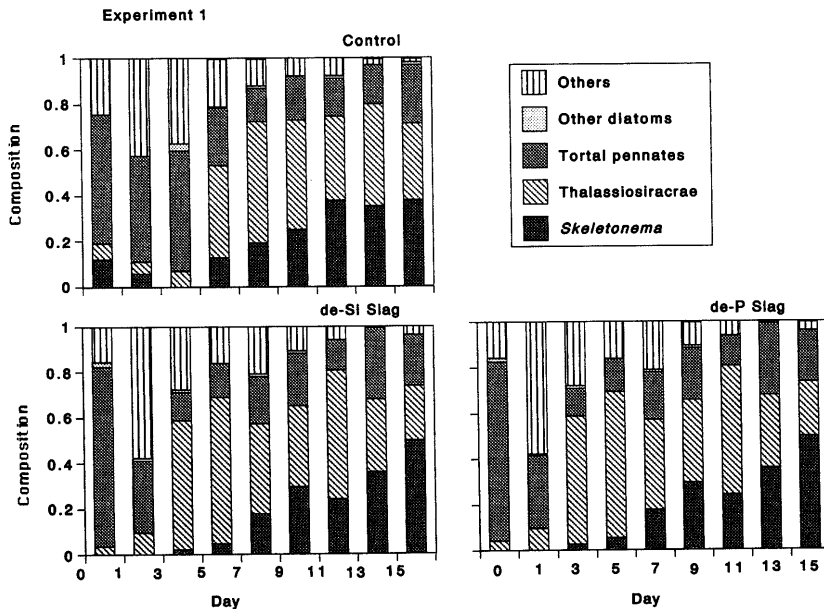


Fig. 7. Taxonomic composition in abundance of the phytoplankton assemblage in control tank and enriched tanks with de-Si slag and with de-P slag during Experiment 1.

者としてのアメーバの役割についての報告例が少ないので、今後研究が必要である。

3.2 プランクトンの群集構造

第1回実験の開始時には植物プランクトンは非常に少なく、Prasinophyceaeが20 cells/l, Euglenaceaeが30–130 cells/l, 珪藻類が120–740 cells/l程度にすぎなかった。実験初期、珪藻類には遅延期間があったが、他の2群は直ちに増殖したのでその優占度は高かった。実験中期には全群が増加し、特に珪藻類の増加は顕著であり、5日目以降は常に90%以上占めるようになった。これは、Euglenaceaeと珪藻類の増殖速度の差からくるものである (Fig. 6)。動物プランクトンでは繊毛虫が検出されたが、その数は非常に少なかった。また、透明で不定形のアメーバ類が観察された。その中には植物プランクトンを摂食しているものもあったが、その計数は困難であった。200 μmを越えるマクロ動物プランクトンは、どの実験区においても1000 mlの試水には検出されず、圧力式砂濾過で除去されたものと判断される。

珪藻中では、2回とも実験初期には羽状目珪藻が最も多

く、次いでThalassiosiracaeが優占していたのが、実験中にSkeletonemaが最も顕著に増加して実験後期には第1優占種となった。特に第1回実験では、初期にはスラグ添加区では検出されなかったのが、脱珪スラグ添加区では7日目に20%、15日目に52%を占め、脱りんスラグ添加区では3日目に16%、13日目から50%以上を占めるようになった (Fig. 7)。この結果は、スラグがSkeletonemaに対して特に効果的に働くことを示している。

第2回実験でも、実験初期には羽状目珪藻が最優占していたが(70%)、対照区では実験中3日目に9.5%に減少した。代わってSkeletonemaとThalassiosiracaeが増加し、Skeletonemaはその後34–48%と比較的一定の割合を占め、Thalassiosiracaeは1–9日目まで42–54%を占めたが、その後減少して最終日には18%となった。このThalassiosiracaeの低下分だけ羽状目珪藻の優占度が高くなり、終了時には44%とSkeletonemaとほぼ等しくなった。脱珪スラグ添加区ではSkeletonemaの優占度が最も顕著に増大し、7日目に74%となったが、終了時には35%へと低下した。Thalassiosiracaeも実験初期の17%から3日目に50%へと増大し

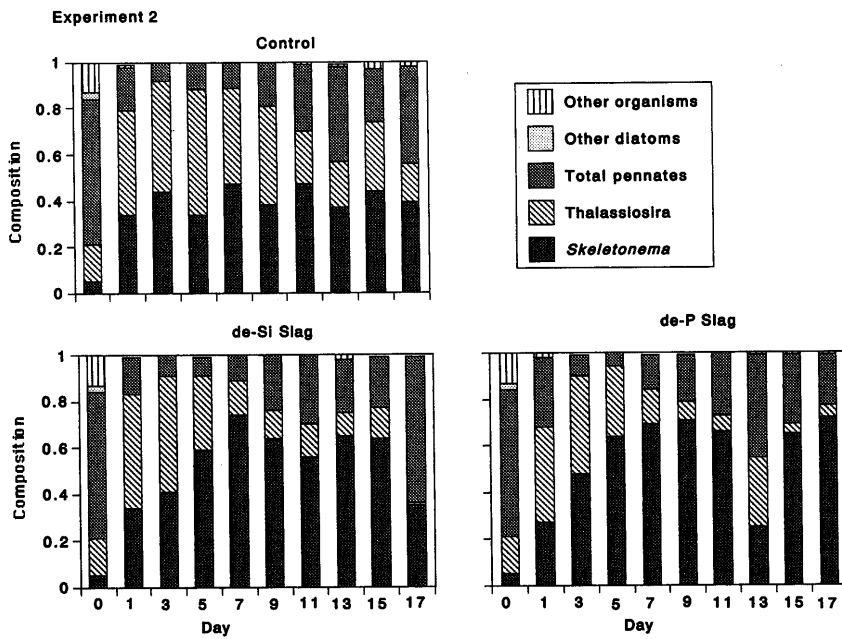


Fig. 8. Taxonomic composition in abundance of the phytoplankton assemblage in control tank and enriched tanks with de-Si slag and with de-P slag during Experiment 2.

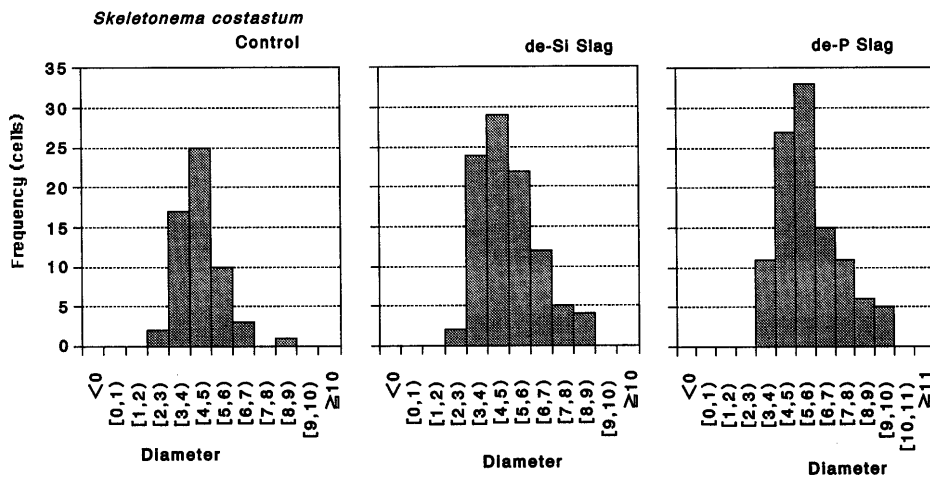


Fig. 9. Size composition in valve diameter of *Skeletonema costatum* in control tank and enriched tanks with de-Si slag and with de-P slag during Experiment 1.

たが、7-15日目に10-14%へ、さらに最終日には1.5%へと低下した。それらの変化につれて羽状目珪藻は5日目には7.8%に減少した後、再び増加して終了時には57%となった。脱りんスラグ添加区でもほぼ同様の変化がみられたが、*Skeletonema*の増加は顕著で、かつ終了時までその優占度は低下しなかった。その結果、培養終了時における*Skeletonema*の優占度は、脱りんスラグ添加区>脱珪スラグ添加区>対照区の順となり、*Skeletonema*に対して特に脱りんスラグが効果的に働くことを、第1回実験よりも明瞭に示された。

原口¹⁰⁾は*Skeletonema*およびThalassiosiraceaeの増殖がスラグや都市排水の添加によって促進されると報告しているが、本研究の結果は、Thalassiosiraceaeの優占度は実験初期には増大したが、終期には優占度は低下することを示した。

3.3 *Skeletonema*およびThalassiosiraceaeの細胞サイズ

第1回実験の11日目に*Skeletonema*およびThalassiosiraceaeの細胞サイズ組成を画像解析により観察した。*Skeletonema*の測定細胞数は、対照区では58細胞、脱珪スラグ

添加区では98細胞、脱りんスラグ添加区では108細胞であった (Fig. 9)。対照区と脱珪スラグ添加区では細胞直径頻度分布のピークはともに4-5 μm にみられたが、全細胞の平均値には差がみられた。すなわち対照区では $4.4 \pm 1.0 \mu\text{m}$ であったのに対して、脱珪スラグ添加区では $5.0 \pm 1.4 \mu\text{m}$ であり大型の細胞が多くなった。また、脱りんスラグ添加区ではピークが5-6 μm 平均値は $5.7 \pm 1.5 \mu\text{m}$ となり、さらに大きい細胞が出現した。細胞長の平均は、対照区では $6.6 \pm 1.7 \mu\text{m}$ 、脱珪スラグ添加区では $7.4 \pm 1.0 \mu\text{m}$ 、脱りんスラグ添加区では $8.4 \pm 2.1 \mu\text{m}$ であり、また、これらの平均値から計算される細胞体積は、それぞれ 111 ± 90 、 155 ± 102 、 $237 \pm 168 \mu\text{m}^3$ となった。

Thalassiosiraceaeの細胞サイズを、対照区では66細胞、脱珪スラグ添加区では98細胞および脱りんスラグ添加区では167細胞測定した結果、細胞直径の平均値は、それぞれ 8.9 ± 2.9 、 9.8 ± 2.5 、 $9.3 \pm 3.0 \mu\text{m}$ であった (Fig.10)。また、そのときの細胞体積の平均値は、それぞれに361、400、435 μm^3 となった。

以上の結果にStrathmann¹¹⁾の有機炭素含量 (C) と細胞体積 (V) との相関関係式 ($\log C = -0.422 + 0.758 \log(V)$) を適用

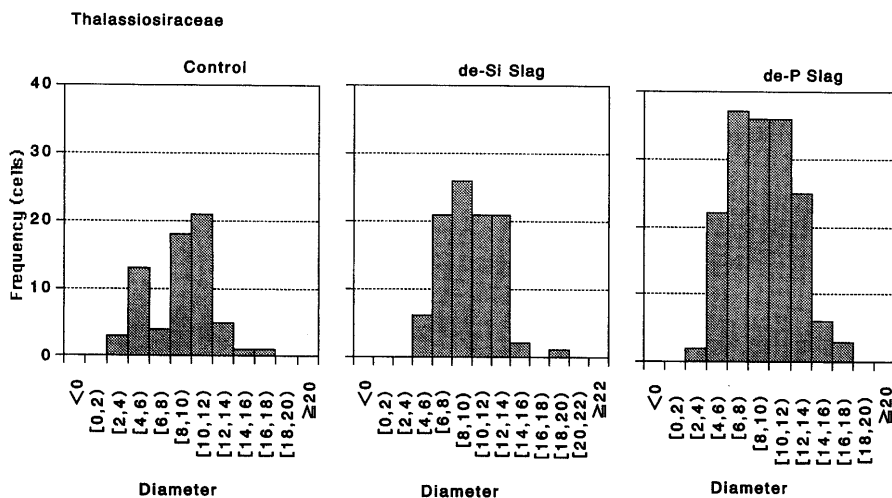


Fig. 10. Size composition in valve diameter of Thalassiosiraceae in control tank and enriched tanks with de-Si slag and with de-P slag during Experiment 1.

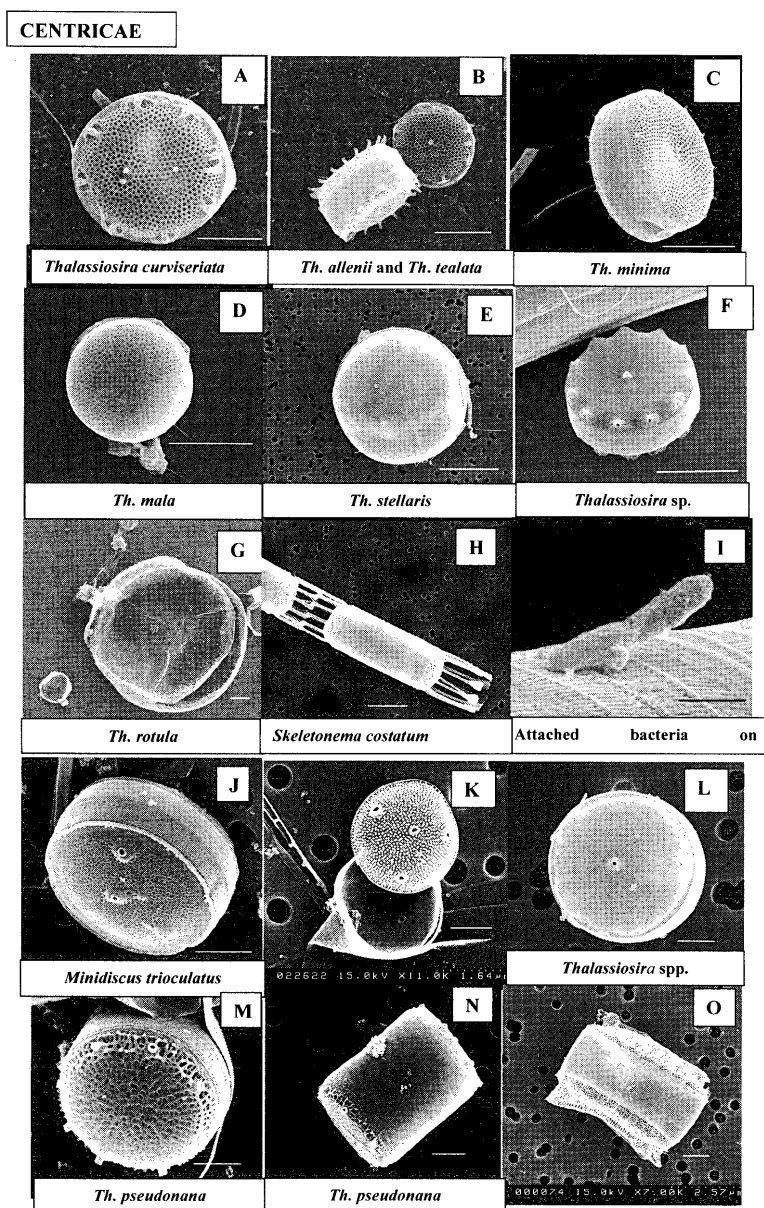


Fig. 11. Scanning electron micrographs of species of the Centricae. Scale bars 5 μm (A-H), 1 μm (J-O), 0.5 μm (I).

して、生体炭素量を求めた。その結果、Skeletonema および Thalassiosiraceae の炭素量は、対照区ではそれぞれ 12.5 および 32.8 pg/cell、脱珪スラグ添加区では 16.5 および 35.5

pg/cell、脱りんスラグ添加区では 25.8 および 37.8 pg/cell となった。スラグ添加区特に脱りんスラグ添加区での CO₂ 固定が大きかったことを示している。Muggli 等¹²⁾は、中心目

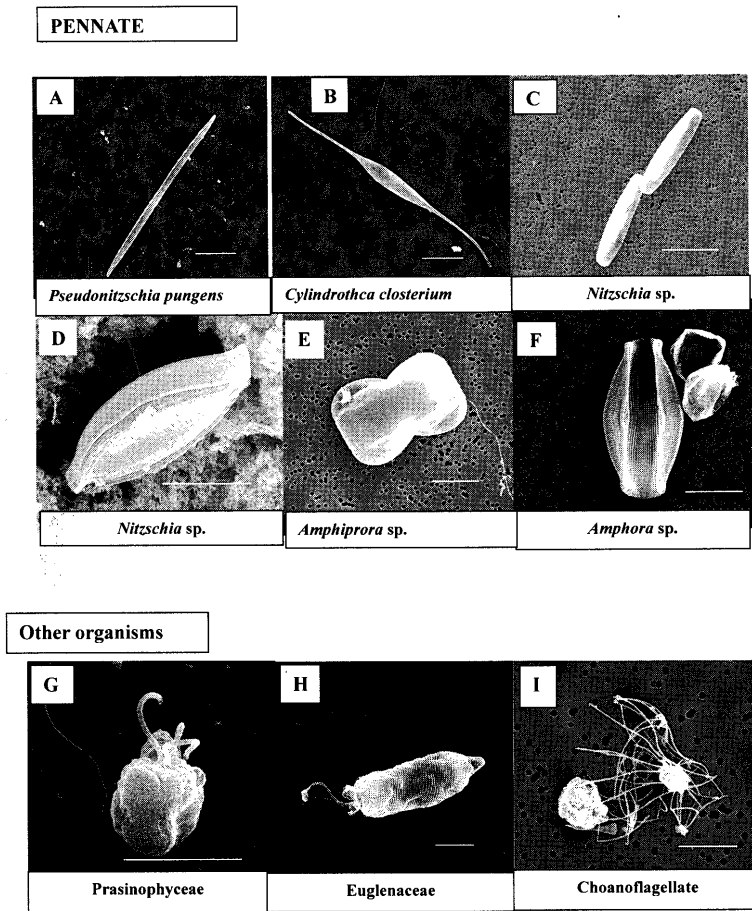


Fig. 12. Scanning electron micrographs of the dominant species of pennates and other tax. Scale bars 10 μm (A–C, F), 5 μm (D, E, G–I).

珪藻類 *Actinocyclus* sp. やハプト藻類 *Emiliania huxleyi* は Fe が欠乏すると細胞体積が小さくなると報告している。本研究の結果は、スラグ起源の栄養塩が *Skeletonema* および *Thalassiosiraceae* の細胞体積を大きくする効果をも有していることを示している。

3.4 走査電子顕微鏡による微細観察

Skeletonema 属 (Fig.11-H) は1種からなることは広く知られているのに対して、本研究で *Thalassiosiraceae* あるいは羽状目珪藻として1群にまとめたものの中には複数の種が含まれている。しかし、その同定を生物顕微鏡で行うのは困難なので、走査型顕微鏡で観察した (Fig.11)。その結果、前者には *Cyclotella striata*, *Thalassiosira minima*, *Th. rotura*, *Th. stellaris*, *Th. tealata*, *Th. allenii*, *Thalassiosira* spp. が含まれていることが判明した。また、細胞数密度はさほど多くないが、大型の種が出現した。羽状目珪藻には多数の種が含まれていたが、優占していたのは、順に *Pseudonitzschia pungens*, *Cylindrotheca closterium* や *Amphora* sp. であり、他に *Thalassionema nitzschioides*, *Amphiprora* sp., *Nitzschia* spp., *Navicula* spp. が観察された (Fig.12)。またSEMでないと観察できない *Minidiscus* sp. などの微小珪藻数種 (Fig. 11), および従属栄養鞭毛虫である Choanoflagellate も観察された。

4. まとめ

本実験の結果はスラグ添加が珪藻類とくに *Skeletonema*

および *Thalassiosiraceae* の増殖に対して効果的であることを示した。クロロフィル濃度がピークに達した後急速に低下する¹⁾のは、1), アメーバなどの微小な摂食者の存在、2), N欠乏による植物プランクトンの死亡、3), 凝集物に取り込まれての沈降によると考えられ、スラグ添加が直接的な原因ではないと判断される。

この研究を行うにあたり、走査型電子顕微鏡の観察に際しご協力いただいた東北大学農学研究科佐藤鶴治氏に厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) Y.Nakamura, T.Sato, K.Shitogiden, Y.Saito, H.Nakata and A.Taniguchi: *Tetsu-to-Hagané*, **89** (2003), 438.
- 2) Y.Nakamura: *Bull. Jpn. Soc. Microb. Ecol.*, **6** (1991), 71.
- 3) 一宮睦雄: 東北大学大学院農学研究科修士学位論文, (2001).
- 4) K.Suzuki, A.Tsuda, H.Kiyosawa, S.Takeda, J.Nishioka, T.Saino, M.Takahashi and C.S.Wong: *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **271** (2002), 99.
- 5) W.H.M. van Boekel, F.D.Hansen, R.Reigman and R.P.M.Bak: *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **81** (1992), 269.
- 6) C.P.D.Brussaard, R.Reigman, A.A.M.Noordeliis, G.C.Cadee, H.Witte, A.J.Kop, G.Nieuwland, F.C. van Duyl and R.P.M.Bak: *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **123** (1995), 259.
- 7) S.Agusti, M.P.Satta, M.P.Mura and E.Benavent: *Limnol. Oceanogr.*, **43** (1998), 1836.
- 8) K.I.Kirchmann: *Nature (London)*, **398** (1999), 293.
- 9) 鏡味麻衣子, 川端善一郎: 月刊海洋号外21, 海洋植物プランクトンII, 海洋出版, 東京, (2000), 159.
- 10) 原口浩一: 東北大学大学院農学研究科博士論文, (2001).
- 11) R.R.Strathmann: *Limnol. Oceanogr.*, **12** (1967), 411.
- 12) D.L.Muggli, M.Lecourt and P.J.Harrison: *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **132** (1996), 215.