



# HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	腐植物質が有害ラフィド藻 <i>Chattonella antiqua</i> の増殖に与える影響
Author(s)	福崎, 康司; Fukuzaki, Koji; 内藤, 佳奈子 他
Citation	北海道大学水産科学研究彙報, 61(1), 23-28
Issue Date	2011-06-20
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/47537">https://hdl.handle.net/2115/47537</a>
Type	departmental bulletin paper
File Information	23-28.pdf



## 腐植物質が有害ラフィド藻 *Chattonella antiqua* の増殖に与える影響

福崎 康司<sup>1)</sup>・内藤佳奈子<sup>2)</sup>・吉岡 崇仁<sup>1),3)</sup>・澤山 茂樹<sup>4)</sup>・今井 一郎<sup>5)</sup>

(2011年4月1日受付, 2011年4月6日受理)

### Effects of Humic Substances on the Growth of the Harmful Raphidophyte *Chattonella antiqua*

Koji FUKUZAKI<sup>1)</sup>, Kanako NAITO<sup>2)</sup>, Takahito YOSHIOKA<sup>3)</sup>, Shigeki SAWAYAMA<sup>4)</sup> and Ichiro IMAI<sup>5)</sup>

#### Abstract

Humic substances (HS) are major components of dissolved organic matter in aquatic systems and known to have a substantial influence on the trace metal speciation, and thus the bioavailability of trace elements. Trace metals, such as iron, frequently act as a crucial limiting factor for phytoplankton growth, and sometimes bloom developments in the sea. The effects of HS on the growth of the harmful red tide phytoplankton, *Chattonella antiqua* were investigated by using a chemically defined artificial medium. Humic acid (0.6, 6, 60 and 600  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) supplied with iron (541  $\mu\text{g L}^{-1}$  of ferric chloride hexahydrate) had accelerative effects on the growth of *C. antiqua*. The growth yield was highest in the medium of 6  $\mu\text{g L}^{-1}$  of humic acid, and 8 times larger than that in the control medium without humic acid. On the contrary, fulvic acid did not enhance the growth of *C. antiqua*. It is suggested that the composition and concentration of HS possibly affects the bloom developments of *C. antiqua* by controlling the iron availability. This is the first report of the effects of humic substances on the growth of *C. antiqua*, raising an insight into the growth physiology of this fish-killing species.

**Key words:** *Chattonella antiqua*, Humic substance, Iron, Artificial medium, Culture experiment

#### 緒 言

河川水の影響を強く受ける沿岸域において、陸域から供給される物質は植物プランクトンの増殖に大きな影響を及ぼす。窒素やリンなどの栄養塩が植物プランクトンの動態を制御する重要な因子であることは古くから知られてきたが、近年の研究により、微量金属元素である鉄も海洋の植物プランクトンの増殖を律速する要因として重要であることが認識されるようになった (Martin and Fitzwater, 1988; Martin et al., 1991, 1994; Coale et al., 1996; Hutchins and Bruland, 1998; Hutchins et al., 1998; Boyd and Ellwood, 2010)。

海水や陸水中には金属イオンと錯体を形成する有機リガンドが多量に存在し、微量溶存鉄の99%は有機錯体として存在すると報告されている (Wu and Luther, 1995; Witter and Luther, 1998)。河川水中の有機物の大部分を占め

る溶存腐植物質 (フミン酸及びフルボ酸) は、多価の原子価をもつ金属イオンとの錯形成能が高く (長尾, 2008)、環境水中における金属のスぺシエーションに大きく影響する (Nagai et al., 2007; 永井ら, 2007)。吸着濃縮ボルタメトリー (Cathodic Stripping Voltammetry: CSV) 法を現場海水に適用した最近の研究においても、天然海水中に存在する溶存腐植物質が、鉄の配位子として主要な要素を占めていることが報告されている (Laglera and Van Den Berg, 2009)。従って、溶存腐植物質は鉄との錯化を通じて、植物プランクトンへの鉄供給の重要な因子となっていると推察される (Kuma and Matsunaga, 1995; Matsunaga et al., 1998; Kuma et al., 1999, 2000; 大西, 2010)。

ラフィド藻の *Chattonella antiqua* は沿岸域において赤潮を形成する有害植物プランクトンの一種であり、これまでに瀬戸内海等において頻繁に赤潮を形成し、巨額の漁業被害をもたらしてきた (今井, 2005, 2010)。本種が沿岸

<sup>1)</sup> 京都大学大学院農学研究科森林科学専攻森林情報学分野

(Laboratory of Forest Information, Division of Forest and Biomaterials, Graduate School of Agriculture, Kyoto University)

<sup>2)</sup> 県立広島大学生命環境学部環境科学科

(Department of Environment Sciences, Faculty of Life and Environmental Sciences, Prefectural University of Hiroshima)

<sup>3)</sup> 京都大学フィールド科学教育研究センター森林生物圏部門森林資源管理学分野

(Laboratory of Forest Resource Management, Division of Forest Biosphere, Field Science Education and Research Center, Kyoto University)

<sup>4)</sup> 京都大学大学院農学研究科応用生物学専攻海洋環境微生物学分野

(Laboratory of Marine Environmental Microbiology, Division of Applied Bioscience, Graduate School of Agriculture, Kyoto University)

<sup>5)</sup> 北海道大学大学院水産科学研究院海洋生物学分野浮遊生物学領域

(Plankton Laboratory, Division of Marine Bioresource and Environmental Science, Graduate School of Fisheries Sciences, Hokkaido University)

域において著しく大きい生物量の増殖を達成する上で、腐植物質共存下での鉄の利用は重要な要素と想定され、その生理学的特性を明らかにすることは喫緊の課題である。溶存腐植物質が植物プランクトンに与える影響に関する既往の知見をみると、増殖を促進したとするものと阻害したとするものの両者の報告が認められる (Prakash and Rashid, 1968; Prakash et al., 1973; Jackson and Hecky, 1980; Guildford et al., 1987; 今井ら, 1999)。しかし、その多くが現場群集に対する添加実験や現場観測に基づくものであり、ある特定の植物プランクトン種に対する影響という観点からの研究は技術上困難であることから乏しく、沿岸域における最重要赤潮種とも言える *Chattonella antiqua* に関する限り、研究例は皆無である。溶存腐植物質と結びついた鉄を植物プランクトンが利用可能であるか否かを実証するためには、人工合成培地による無菌培養実験が必須である。2004年に発表された IHN 培地は、それまで不可能であったラフィド藻を始めとする多種の海洋植物プランクトンの培養を可能にした完全人工合成培地である (Imai et al., 2004)。この培地を用いた培養実験により、有機リガンドの存在が植物プランクトンの鉄取り込みに大きな影響を与えることが次第に明らかにされてきている (Naito et al., 2005a, b, 2008)。

本研究においては、改変 IHN 培地を用いて培養実験を行うことにより、沿岸域において養殖魚の大量斃死を伴う赤潮を発生させる有害ラフィド藻、*Chattonella antiqua* について、腐植物質と錯形成した鉄の利用能、及び腐植物質の濃度が増殖に与える影響を明らかにすることを目的とした。

## 実 験 方 法

### 培地の調製

実験のために用いた、完全人工合成培地である改変 IHN 培地 (m-IHN 培地) を Naito et al. (2005a) の方法に従って調製した。Table 1 に m-IHN 培地の組成を示した。この

培地は鉄源として  $770 \mu\text{g L}^{-1}$  の Fe-Na-EDTA、キレーターとして  $11.17 \text{ mg L}^{-1}$  の  $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  を含んでいる (Naito et al., 2005a)。

培養実験のために、腐植物質や鉄を様々に組み合わせた培地を調製した (Table 2)。ネガティブコントロールとして m-IHN 培地から鉄とキレーターを除いた培地を調製した (Non 培地)。Non 培地に鉄源として  $541 \mu\text{g L}^{-1}$  の  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  を添加した培地を調製し、基礎培地とした (Fe 培地)。検討する腐植物質として、フミン酸 (和光純薬) とフルボ酸 (日本腐植物質学会) を使用した。腐植物質の溶液調製は Sun et al. (2005) の方法に従った。腐植物質と鉄の影響を検討するために、Fe 培地に有機配位子として  $600, 60, 6, 0.6 \mu\text{g L}^{-1}$  のフミン酸を含む培地 (Fe-H1, Fe-H2, Fe-H3, Fe-H4)、 $600, 60, 6 \mu\text{g L}^{-1}$  のフルボ酸を含む培地 (Fe-F1, Fe-F2, Fe-F3) を調製した。同様に腐植物質のみによる影響を検討するために、Non 培地にフミン酸を  $600, 60, 6, 0.6 \mu\text{g L}^{-1}$  の濃度となるように添加した培地 (H1, H2, H3, H4)、フルボ酸を  $600, 60, 6 \mu\text{g L}^{-1}$  の濃度となるように添加した培地 (F1, F2, F3) を調製した。

培地の pH は  $7.8 \pm 0.1$  に調整した。全ての培地は  $121^\circ\text{C}$  で 15 分間オートクレーブ滅菌した後、平衡に達するまで少なくとも 24 時間  $20^\circ\text{C}$  の暗所に静置した。培地の調製に使用する試薬は、金属の混入を出来るだけ少なく抑えるため、手に入る限り純度の高いものを用いた。鉄源を含まない培地の準備は空気中の金属による汚染を避けるためにクリーンボックス中で行った。培地の調製には Milli-Q 水 (Milli-Q system, Millipore) を使用した。培地の調製、保存には塩酸洗浄を施したポリカーボネート製透明角型ビン (Nalgene) を用いた。

### 培養実験

実験には、ラフィド藻 *Chattonella antiqua* NIES-1 株 (国立環境研究所より分譲) の無菌培養株を供した。実験における無菌状態は DAPI 染色、及び落射蛍光顕微鏡を用いた直接検鏡法により確認した (Imai, 1987)。容量 8 mL のスク

Table 1. Composition of m-IHN medium (concentration per liter) (Naito et al., 2005a) after modification of IHN medium (Imai et al., 2004).

S3-Vitamin mix		P1 metals	
NaCl	25.1 g	Vitamin B <sub>12</sub>	1 $\mu\text{g}$
KCl	0.7 g	Biotin	1 $\mu\text{g}$
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	9.1 g	Thiamine HCl	0.5 mg
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	1.1 g	Nicotinic acid	0.1 mg
NaNO <sub>3</sub>	170 mg	Calcium pantothenate	0.1 mg
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	15.6 mg	<i>p</i> -aminobenzoic acid	10 $\mu\text{g}$
Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> · 9H <sub>2</sub> O	93.8 mg	Inositol	5 mg
Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>	0.3 $\mu\text{g}$	Folic acid	2 $\mu\text{g}$
KI	78.0 $\mu\text{g}$	Thymine	3 mg
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	24.2 $\mu\text{g}$		
HEPES	1.2 g		

Table 2. Concentrations of iron and chelators in each medium.

Media	Iron sources ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Chelators ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )
m-IHN	Fe-Na-EDTA 770	$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 11,167
Non	None	None
Fe	$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 541	None
Fe-H1	$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 541	Humic acid 600
Fe-H2	$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 541	Humic acid 60
Fe-H3	$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 541	Humic acid 6
Fe-H4	$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 541	Humic acid 0.6
H	None	Humic acid 600
H2	None	Humic acid 60
H3	None	Humic acid 6
H4	None	Humic acid 0.6
Fe-F1	$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 541	Fulvic acid 600
Fe-F2	$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 541	Fulvic acid 60
Fe-F3	$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 541	Fulvic acid 6
F1	None	Fulvic acid 600
F2	None	Fulvic acid 60
F3	None	Fulvic acid 6

リユーキャップ付きポリスチレン製試験管 (Evergreen scientific) 内の培地 4 mL に、対数増殖期後期から前期定常期の培養を 80  $\mu\text{L}$  接種し、増殖を調べた。培養条件は温度 25°C、光強度 75~110  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (白色蛍光灯使用)、14h L : 10h D の明暗サイクルとした。植物プランクトンの増殖量は、*in vivo* クロロフィル *a* 量を蛍光光度計 (Turner Designs 10-AU 005) を用いて測定することにより求めた (Brand et al., 1981)。培養実験は 3~4 本立てで行った。培地の分注及び、培養株の接種はクリーンベンチ内で酸洗浄したチップを用いて行い、空気中及びチップからの鉄の混入を防いだ。実験用の培養株は、上述の条件下で使用する培地を用いて 2 回前培養を行った後に本実験に供した。

## 結果と考察

### フミン酸添加による増殖への影響

それぞれの培地中における *C. antiqua* の最大増殖量を Fig. 1 に、また増殖曲線を Fig. 2 に示した。*C. antiqua* は鉄源を添加しない培地 (Non, H1, H2, H3, H4, F1, F2, F3 培地) 中では全く増殖を示さなかった (Fig. 1)。このことから、腐植物質試薬からの鉄混入の影響はないと判断できる。また、m-IHN 区と比べ、その他の実験区での増殖が著しく低いことから、m-IHN 区以外の区では鉄が本種の増殖を制限する要因となっていることが明らかである。*C. antiqua* は無機鉄-フミン酸添加区 (Fe-H 培地) において増殖を示し、特に 6  $\mu\text{g L}^{-1}$  の濃度でフミン酸を添加した区 (Fe-H3 培地) において、m-IHN 区以外の実験区の中で最も顕著な増殖を示した (Figs. 1, 2b)。無機鉄のみ添加区 (Fe 培地) と無機鉄-フミン酸添加区 (Fe-H 培地) を比較する

と、フミン酸添加培地中において、増殖速度と最大増殖量が共に大きく (Figs. 1, 2)、特に Fe-H3 区では Fe 区の 8.7 倍の最大増殖量を示した (Fig. 1)。多重比較検定の結果、Fe 区と Fe-H3 区の差は有意であった ( $P < 0.01$ )。従って、フミン酸はある濃度を最適として *C. antiqua* の増殖への鉄利用を促進する物質であるといえる。Stolte et al. (2006) は限外濾過法により、河川水から捕集した高分子量 (>1,000 Da) の溶存有機物を用いたメソコスム実験により、溶存有機物の添加が藍藻類の増殖を促進することを見出し、その効果は鉄の植物プランクトンへの鉄供給を促進した結果であると推察している。この結果と本研究の結果は整合する。

多種の赤潮形成植物プランクトンの鉄利用に対して、有機リガンドの与える影響について検討がなされ、有機リガンドの種類と共に鉄との濃度比が増殖に大きく影響することが報じられている (Naito et al., 2008)。本研究で用いたフミン酸は市販の汎用試薬であり、分子量に関する分析データは無いが、一般的にフミン酸の分子量は数十から数十万程度であると言われている (藤嶽, 2007)。本研究で用いたフルボ酸の値を参考に、仮にフミン酸も同程度の平均分子量 (3,000) を持つものとして計算すると、6  $\mu\text{g L}^{-1}$  のフミン酸は、2 nM に対応する。鉄源である  $\text{FeCl}_3$  の濃度が 2  $\mu\text{M}$  であるところを考えると、フミン酸は極めて少量で植物プランクトンの増殖に影響を及ぼすことが示唆される。またフミン酸添加による増殖の効果が一番高かったのは 6  $\mu\text{g L}^{-1}$  の時であり、フミン酸の鉄に対する濃度比がより低い場合もより高い場合も共に、その効果は小さかった (Figs. 1, 2b)。Naito et al. (2008) は IHN 培地を用いた培養実験により、Fe : EDTA の濃度比が 1 : 10 の時に本種の増殖が促進され、濃度比がより低い (1 : 1) 場合もより高い (1 : 100) 場合もその効果が小さい、あるいは見られないことを報告しており、本研究の結果はこの報告と傾向が同じである。

一方、フルボ酸添加による増殖促進の効果は観察されなかった (Figs. 1, 2c)。このことから、*C. antiqua* はフルボ酸鉄を増殖に利用できないものと考えられる。溶存腐植物質が植物プランクトンへの鉄供給に与える影響について、今井ら (1999) は *Microcystis aeruginosa* 無菌株を用いた培養実験により、霞ヶ浦由来のフルボ酸の添加が *M. aeruginosa* の増殖を阻害することを見出している。そして、それが鉄と腐植物質の錯形成による鉄供給の制限のためであると推察している。本研究においては、*C. antiqua* が無機鉄のみではさほど良好な増殖を示さないため、フルボ酸の添加が増殖を阻害したか否かは明らかではないが、共存する腐植物質の種類によって、植物プランクトンの増殖における鉄利用は大きな影響を受けることが示唆された。

### 環境水中の腐植物質が植物プランクトンに与える影響

腐植物質は河川水中に遍く存在する物質であり、溶存

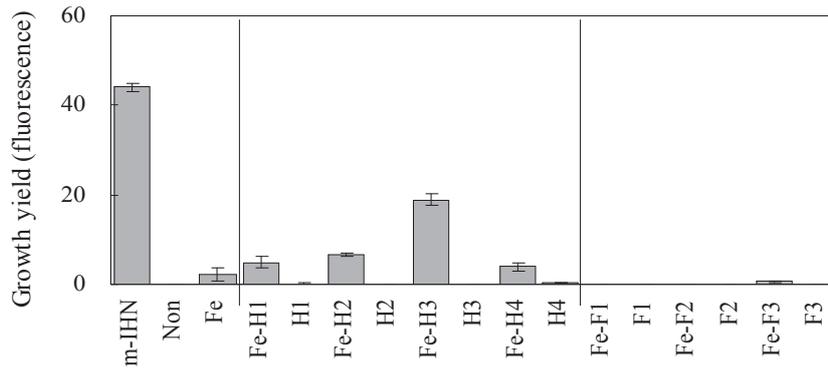


Fig. 1. Maximum growth yields of *Chattonella antiqua* in each experimental medium supplied with various concentrations of humic substances (see Table 1). Fluorescence value of 10 corresponds to approximate 4,500 cells mL<sup>-1</sup>. Error bars represent standard error.

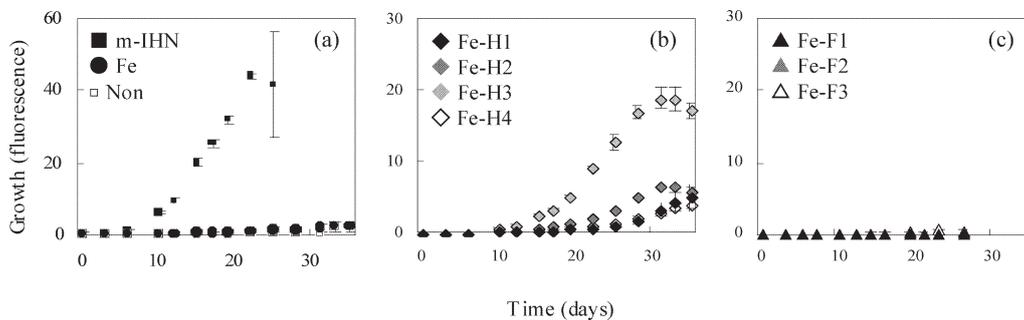


Fig. 2. Growth curves of *Chattonella antiqua* in artificial media supplied with iron and EDTA (m-IHN), with iron only (Fe) and without iron and its chelator (Non) (a), supplied with iron and various concentrations of humic acid (b), and supplied with iron and various concentrations of fluvic acid (c). Fluorescence value of 10 corresponds with approximate 4,500 cells mL<sup>-1</sup>. Error bars represent standard error.

有機物 (DOC) の大半を占める。日本の富栄養湖である霞ヶ浦で行なわれた研究によると、湖水中に存在する DOC (約 1.1~4.1 mg C L<sup>-1</sup>) の多くは河川から供給された陸域起源フルボ酸であり、それらが鉄との錯形成を通して、植物プランクトンの種構成と多様性に大きく影響していることが示唆された (今井ら, 1999; Nagai et al., 2004, 2006, 2007)。海洋においても、河川水を通して供給された腐植物質は様々な濃度で沿岸環境に存在すると考えられる (Laglera et al., 2007, 2009)。例えば、東京湾における定線観測の結果から、荒川河口から湾口に向かって塩分の上昇に伴い、DOC が約 3.5 mg C L<sup>-1</sup> から 1.5 mg C L<sup>-1</sup> まで漸減する様子が示されている (鈴木ら, 2001)。また周防灘において、沿岸域で濃度が高いという傾向が報じられている (今井ら, 1986)。その他の海域において、DOC は 0.9~4.7 mg C L<sup>-1</sup> (三河湾), 3~12 mg C L<sup>-1</sup> (知多湾), 0.8~2.5 mg C L<sup>-1</sup> (広島湾) の範囲で変動することが報告されている (田中ら, 1982; 三戸ら, 2007; 赤根ら, 2004)。DOC の 90% が腐植物質であり、そのうちさらに 90% をフルボ酸が占めると仮定すると、フミン酸は DOC の 9% 前後に相当すると概算される。沿岸域における DOC の既報の値からフミン酸の濃度を試算すると約 70 μg C L<sup>-1</sup>~1 mg C L<sup>-1</sup> の範囲で存在しているものと想定される。本研究で *C. antiqua* に対して増

殖促進効果の認められたフミン酸濃度は 6, 60 μg L<sup>-1</sup> であるが、これは沿岸環境水中では下限付近の濃度である。このことから、本種の鉄利用にとって最適な腐植物質濃度は、陸域由来の DOC 濃度が低い外洋水の混合がある程度起こる環境であることが示唆される。例えば周防灘においては *Chattonella* 赤潮の発生水域がやや沖合いに認められる場合が観測されている (今井, 1990)。また八代海においては、*Chattonella* 赤潮の発生した年の表層塩分は、非発生年に比べて有意に高いことが報じられている (櫻田ら, 2007)。以上から、*Chattonella* 赤潮の発生機構に関して、河川水とそこに含まれる腐植物質の組成と濃度を考慮するという、新しい視点が必要であることが提唱される。

本研究では人工合成培地を用いた培養実験により、腐植物質が代表的な有害赤潮鞭毛藻 *C. antiqua* の増殖に与える影響について検討した。その結果、フミン酸によって *C. antiqua* の増殖が促進されることが示された。

腐植物質は複雑な構造を持つ高分子有機物の混合物であり、その起源や生成過程によって性質が異なる。今後、*C. antiqua* の増殖に対して腐植物質が与える影響をより詳細に検討するためには、起源の異なるいくつかの腐植物質を用いて同様の実験を行うことが必要である。また、本研究においては培地の滅菌にオートクレーブを使用して

おり、腐植物質の一部が分解・変性している可能性が完全には棄却できないことから、結果の解釈にはある程度注意が必要である。

## 謝 辞

貴重な腐植物質標準試料を提供していただいた日本腐植物質学会に感謝申し上げます。

## 文 献

- Boyd, P.W. and Ellwood, M.J. (2010) The biogeochemical cycle of iron in the ocean. *Nat. Geosci.*, **3**, 675-682.
- Brand, L.E., Guillard, R.R.L. and Murphy, L.S. (1981) A method for the rapid and precise determination of acclimated phytoplankton reproduction rates. *J. Plankton Res.*, **3**, 193-201.
- Coale, K.H., Johnson, K.S., Fitzwater, S.E., Gordon, R.M., Tanner, S., Chavez, F.P., Ferioli, L., Sakamoto, C., Rogers, P., Millero, F., Steinberg, P., Nightingale, P., Cooper, D., Cochlan, W.P., Landry, M.R., Constantinou, J., Rollwagen, G., Trassvina, A. and Kudela, R. (1996) A massive phytoplankton bloom induced by an ecosystem-scale iron fertilization experiment in the equatorial Pacific Ocean. *Nature*, **383**, 495-501.
- 藤嶽暢英 (2007) 分子量分布. pp. 83-88, 渡辺 彰・藤嶽暢英・長尾誠也 (編), 腐植物質分析ハンドブック, 三恵社, 愛知.
- Guildford, S.J., Healey, F.P. and Hecky, R.E. (1987) Depression of primary production by humic matter and suspended sediment in limnocorral experiments at Southern Indian Lake, Northern Manitoba. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, **44**, 1408-1417.
- Hutchins, D.A. and Bruland, K.W. (1998) Iron-limited diatom growth and Si : N uptake ratios in a coastal upwelling regime. *Nature*, **393**, 561-564.
- Hutchins, D.A., Ditullio, G.R., Zhang, Y. and Bruland, K.W. (1998) An iron limitation mosaic in the California upwelling regime. *Limnol. Oceanogr.*, **43**, 1037-1054.
- 今井章雄・福島武彦・松重一夫 (1999) 溶存フミン物質の藍藻 *Microcystis aeruginosa* の増殖に及ぼす影響. 水環境学会誌, **22**, 555-560.
- Imai, I. (1987) Size distribution, number and biomass of bacteria in intertidal sediments and sea water of Ohmi Bay, Japan. *Bull. Jpn. Soc. Microb. Ecol.*, **2**, 1-11.
- 今井一郎 (1990) 有害赤潮ラフィド藻 *Chattonella* のシストに関する生理生態学的研究. 南水水研研報, **23**, 63-166.
- 今井一郎 (2005) 有害・有毒赤潮と漁業被害. pp. 115-126, 石田祐三郎・杉田治男 (編), 海の環境微生物学, 恒星社厚生閣, 東京.
- 今井一郎 (2010) 有害有毒赤潮の生物学 (11) シャットネラ赤潮と漁業被害および被害軽減対策. 海洋と生物, **32**, 501-506.
- Imai, I., Hatano, M. and Naito, K. (2004) Development of a chemically defined artificial medium for marine red tide-causing raphidophycean flagellates. *Plankton Biol. Ecol.*, **51**, 95-102.
- 今井一郎・伊藤克彦・寺田和夫・神蘭真人 (1986) 周防灘における *Chattonella* 耐久細胞の分布と夏季の赤潮. 日本水産学会誌, **52**, 1665-1671.
- Jackson, T.A. and Hecky, R.E. (1980) Depression of primary productivity by humic matter in lake and reservoir waters of the boreal forest zone. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, **37**, 2300-2317.
- Kuma, K., Katsumoto, A., Shiga, N., Sawabe, T. and Matsunaga, K. (2000) Variation of size-fractionated Fe concentrations and Fe (III) hydroxide solubilities during a spring phytoplankton bloom in Funka Bay (Japan). *Mar. Chem.*, **71**, 111-123.
- Kuma, K. and Matsunaga, K. (1995) Availability of colloidal ferric oxides to coastal marine-phytoplankton. *Mar. Biol.*, **122**, 1-11.
- Kuma, K., Tanaka, J. and Matsunaga, K. (1999) Effect of natural and synthetic organic-Fe (III) complexes in an estuarine mixing model on iron uptake and growth of a coastal marine diatom, *Chaetoceros sociale*. *Mar. Biol.*, **134**, 761-769.
- Laglera, L.M., Battaglia, G. and Van Den Berg, C.M.G. (2007) Determination of humic substances in natural waters by cathodic stripping voltammetry of their complexes with iron. *Anal. Chim. Acta*, **599**, 58-66.
- Laglera, L.M. and Van Den Berg, C.M.G. (2009) Evidence for geochemical control of iron by humic substances in seawater. *Limnol. Oceanogr.*, **54**, 610-619.
- Martin, J.H., Coale, K.H., Johnson, K.S., Fitzwater, S.E., Gordon, R.M., Tanner, S.J., Hunter, C.N., Elrod, V.A., Nowicki, J.L., Coley, T.L., Barber, R.T., Lindley, S., Watson, A.J., Scoy, K.V., Law, C.S., Liddicoat, M.I., Ling, R., Stanton, T., Stockel, J., Collins, C., Anderson, A., Bidigare, R., Ondrusek, M., Latasa, M., Millero, F.J., Lee, K., Yao, W., Zhang, J.Z., Friederich, G., Sakamoto, C., Chavez, F., Buck, K., Kolber, Z., Greene, R., Falkowski, P., Chisholm, S.W., Hoge, F., Swift, R., Yungel, J., Turner, S., Nightingale, P., Hatton, A., Liss, P. and Tindale, N.W. (1994) Testing the iron hypothesis in ecosystems of the equatorial Pacific-ocean. *Nature*, **371**, 123-129.
- Martin, J.H. and Fitzwater, S.E. (1988) Iron-deficiency limits phytoplankton growth in the northeast Pacific subarctic. *Nature*, **331**, 341-343.
- Martin, J.H., Gordon, R.M. and Fitzwater, S.E. (1991) The case for iron. *Limnol. Oceanogr.*, **36**, 1793-1802.
- Matsunaga, K., Nishioka, J., Kuma, K., Toya, K. and Suzuki, Y. (1998) Riverine input of bioavailable iron supporting phytoplankton growth in Kesenuma Bay (Japan). *Water Res.*, **32**, 3436-3442.
- 三戸勇吾・山田佳裕・小川浩史・山本敏哉・多田邦尚 (2007) 知多湾表層水中における窒素とリンの空間的季節的変動. 沿岸海洋研究, **44**, 191-202.
- Nagai, T., Imai, A., Matsushige, K. and Fukushima, T. (2006) Effect of iron complexation with dissolved organic matter on the growth of cyanobacteria in a eutrophic lake. *Aquat. Microb. Ecol.*, **44**, 231-239.
- Nagai, T., Imai, A., Matsushige, K., Yokoi, K. and Fukushima, T. (2004) Voltammetric determination of dissolved iron and its speciation in freshwater. *Limnology*, **5**, 87-94.
- Nagai, T., Imai, A., Matsushige, K., Yokoi, K. and Fukushima, T. (2007) Dissolved iron and its speciation in a shallow eutrophic lake and its inflowing rivers. *Water Res.*, **41**, 775-784.
- 永井孝志・恒見清孝・川本朱美 (2007) 河川水中における重金属のスペシエーション: Diffusive Gradients in Thin-films 法による分析と化学平衡モデルによる推定. 陸水学雑誌, **68**, 391-401.
- 長尾誠也 (2008) 水中の腐植物質. pp. 30-48, 環境中の腐植物質 その特徴と研究法, 石渡良志・米林甲陽・宮島徹 (編著), 三共出版, 東京.
- Naito, K., Imai, I. and Nakahara, H. (2008) Complexation of iron by microbial siderophores and effects of iron chelates on the growth of marine microalgae causing red tides. *Phycol. Res.*, **56**, 58-67.
- Naito, K., Matsui, M. and Imai, I. (2005a) Ability of marine eukaryotic red tide microalgae to utilize insoluble iron. *Harm-*

- ful Algae*, **4**, 1021-1032.
- Naito, K., Matsui, M. and Imai, I. (2005b) Influence of iron chelation with organic ligands on the growth of red tide phytoplankton. *Plankton Biol. Ecol.*, **52**, 14-26.
- 大西健夫 (2010) 物質循環と生物 森-川-海の鉄循環. pp. 82-83, 地球環境学事典, 総合地球環境学研究所 (編), 弘文堂, 東京.
- Prakash, A. and Rashid, M.A. (1968) Influence of humic substances on the growth of marine phytoplankton: dinoflagellates. *Limnol. Oceanogr.*, **13**, 598-606.
- Prakash, A., Rashid, M.A., Jensen, A. and Subba Rao, D.V. (1973) Influence of humic substances on the growth of marine phytoplankton: diatoms. *Limnol. Oceanogr.*, **18**, 516-524.
- 櫻田清成・木野世紀・小田長久・糸山力生 (2007) 八代海における有害プランクトンの発生状況と予察法の検討. 熊本水研センター研報, **7**, 31-51
- 赤根幸子・牧野慎也・橋本典親・八東陽介・河井 裕・竹田一彦・佐久川弘 (2004) 広島湾における海水中の過酸化水素の分布と挙動. 海の研究, **13**, 185-196.
- Stolte, W., Balode, M., Carlsson, P., Grzebyk, D., Janson, S., Lips, I., Panosso, R., Ward, C.J. and Graneli, E. (2006) Stimulation of nitrogen-fixing cyanobacteria in a Baltic Sea plankton community by land-derived organic matter or iron addition. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **327**, 71-82.
- Sun, B.K., Tanji, Y. and Unno, H. (2005) Influences of iron and humic acid on the growth of the cyanobacterium *Anabaena circinalis*. *Biochem. Eng. J.*, **24**, 195-201.
- 鈴木昌弘・小川浩史 (2001) 東京湾における夏季表層水中の溶存態炭素・窒素・リンの分布. 沿岸海洋研究, **38**, 119-129.
- 田中庸央・西野友彦・林 雅樹・丸山泰男 (1982) 三河湾における溶存有機炭素の季節変動とその支配要因. 沿岸海洋研究ノート, **20**, 85-93.
- Witter, A.E. and Luther, G.W. (1998) Variation in Fe-organic complexation with depth in the Northwestern Atlantic Ocean as determined using a kinetic approach. *Mar. Chem.*, **62**, 241-258.
- Wu, J.F. and Luther, G.W. (1995) Complexation of Fe (III) by natural organic-ligands in the northwest Atlantic-ocean by a competitive ligand equilibration method and a kinetic approach. *Mar. Chem.*, **50**, 159-177.