

赤潮プランクトン6種の尿素利用能

深尾剛志¹⁾・故西島敏隆・山口晴生²⁾・足立真佐雄²⁾

¹⁾ 愛媛大学大学院連合農学研究科 〒790-8566 愛媛県松山市樽味3-5-7

²⁾ 高知大学農学部栽培漁業学科水族環境学研究室 〒783-8502 高知県南国市物部乙200

Utilization of urea by the 6 species of red tide phytoplankton

TSUYOSHI FUKAO¹⁾, THE LATE TOSHITAKA NISHIJIMA, HARUO YAMAGUCHI²⁾ AND MASAO ADACHI²⁾

¹⁾ *United Graduate School of Agricultural Science, Ehime University, 3-5-7 Tarumi, Matsuyama, Ehime 790-8566, Japan*

²⁾ *Laboratory of Aquatic Environmental Science, Division of Aquaculture, Faculty of Agriculture, Kochi University, 200 Monobeetsu, Nankoku, Kochi 783-8502, Japan*

Abstract Utilization of urea by 6 species of red tide phytoplankton was examined to evaluate the contribution of urea to outbreaks of red tides in coastal environments. *Skeletonema costatum*, *Karenia mikimotoi*, *Prorocentrum minimum* and *Heterosigma akashiwo* could grow on urea effectively as the sole nitrogen source at various urea concentrations, but *Chattonella antiqua* and *Fibrocapsa japonica* were unable to grow. The uptake rate of urea for *K. mikimotoi* and *H. akashiwo* depended on the urea concentration, and these relationships were expressed by the Michaelis-Menten equation. Uptake kinetic parameters V_{max} and K_s were $2.89 \text{ pmol-N cell}^{-1} \text{ h}^{-1}$ and $16.5 \mu\text{M-N}$ for *K. mikimotoi* and $1.03 \text{ pmol-N cell}^{-1} \text{ h}^{-1}$ and $10.1 \mu\text{M-N}$ for *H. akashiwo*, respectively. Uptake rates of urea for both species were usually higher than those for nitrate at the various concentrations that were assumed to approach *in situ* concentrations. Present results indicate that several species of red tide phytoplankton can rapidly uptake urea and use it for growth even if urea concentration is at *in situ* levels (less than $10 \mu\text{M-N}$). Therefore, the urea availability and the uptake rate of red tide phytoplankton are important characteristics to give an ecological advantages in competition for nitrogen sources among phytoplankton species. We suggest that urea contributes not only to growth of the marine phytoplankton community but to the processes by which a phytoplankton species selectively grows and affects outbreaks of red tides in coastal environments.

Key words: growth, red tide, phytoplankton, urea, uptake kinetics

緒 言

富栄養化の進行した沿岸・内湾域では、依然として有害な赤潮が頻発し、それに伴う漁業被害が後を絶たない。そのため赤潮の発生メカニズムを明らかにし、その発生防除対策を講じることが急務となっている。これま

で、赤潮原因種を含む植物プランクトンの増殖を制御する主たる因子として、窒素源に関しては主に溶存無機態窒素 (DIN) が注目されてきた (Paasche & Kristiansen 1982, Takahashi & Fukazawa 1982, 西島ほか 1990)。

しかしながら、沿岸・内湾域の汚濁海中には無機態窒素のみならず有機態窒素も溶存しており、その濃度はしばしば DIN の数倍から数十倍にもなることが報告さ

れている(松山ほか 1998, 山本ほか 2002, Glibert et al. 2004). このうち, 植物プランクトンに利用されうる有機窒素化合物の尿素, 尿酸ならびに一部のアミド化合物・アミノ酸などの中でも化学構造が単純な尿素は, 植物プランクトン種に最も広く利用されやすい有機態窒素の一つであると考えられている(Antia et al. 1977, 1991). 沿岸汚濁海中には尿素がDINと同程度あるいはそれ以上の濃度で溶存していること(Kaufman et al. 1983, 深尾ほか 2006), さらに尿素が主に植物プランクトン群集の増殖に利用されていることが報告されており(Remsen et al. 1974, Mitamura & Saijo 1975, Cho et al. 1996), 沿岸汚濁海域における赤潮の発生過程において, 尿素が赤潮原因種の窒素源として重要な役割を果たしている可能性が高いと考えられる.

実際, いくつかの赤潮原因プランクトンは, 尿素を増殖に利用可能であることが知られている. 例えば, ラフィド藻 *Heterosigma akashiwo*, 渦鞭毛藻 *Prorocentrum minimum* ならびに珪藻 *Skeletonema costatum* および *Thalassiosira pseudonana* は, 尿素のみを窒素源とした場合であっても, 硝酸を窒素源とした場合と同程度の細胞収量まで増殖できる(Antia et al. 1977, Watanabe et al. 1982, Lourenco et al. 2002). しかしながら, これまでの研究では, 実際の現場では見られないほどの高尿素濃度(100 $\mu\text{M-N}$ 以上)で, 赤潮原因種が効率的に増殖するか増殖しないかが調べられてきた(Carpenter et al. 1972, Antia et al. 1977, 1991, 山田ほか 1983, Lourenco et al. 2002). 現場沿岸海中の尿素濃度は, 極端な場合を除いて, 一般に十数 $\mu\text{M-N}$ 以下の比較的低濃度で推移しているが(Remsen et al. 1974, Mitamura & Saijo 1975, Kaufman et al. 1983, Cho et al. 1996, Tada et al. 1998), このような現場尿素濃度においても赤潮原因種が尿素を窒素源としてどの程度増殖可能であるのかについては十分解析されていない.

赤潮原因種の尿素利用は, 環境水中の尿素を取り込みそして増殖するという二つの過程により達成される. したがって, 多様な植物プランクトンが混在している現場海域において, 特定種が増殖する赤潮現象を理解する上で, 前述した個々の赤潮原因種の尿素を窒素源とした場合の増殖能のみならず, それぞれの種を取り込みの動力学を併せて調べることが極めて重要である. しかし, これまで尿素の取り込み動力学については, 渦鞭毛藻および珪藻の一部の種について検討されているにすぎない(Antia et al. 1991, Horrigan & McCarthy 1981).

そこで本研究では, 代表的赤潮原因プランクトンによるアンモニア, 硝酸および尿素を窒素源とした場合の増

殖能を現場海中の尿素濃度範囲も含めたさまざまな濃度条件で明らかにし, かつこれまで尿素に関する取り込み動力学が検討されていない種について, その取り込み動力学をアンモニア, 硝酸のものと併せて調べた. これらの結果を基に, 赤潮原因種の尿素利用特性を明らかにし, 沿岸海域に存在している尿素が赤潮の発生に対し寄与しているか否かについて明らかにしようとした.

方 法

供試生物と培養 珪藻 *Skeletonema costatum* (Greville) Cleve NIES-323 株および NIES-324 株, 渦鞭毛藻 *Karenia mikimotoi* (Miyake et Kominami ex Oda) G. Hansen et Moestrup ax-2 株, *Prorocentrum minimum* (Pavillard) Schiller NIES-237 株, ラフィド藻 *Chattonella antiqua* (Hada) Ono NIES-1 株, *Fibrocapsa japonica* Toriumi et Takano NIES-605 株および *Heterosigma akashiwo* (Hada) Hada NIES-6 株, 計 6 種 7 株の無菌クローン株を供した. *K. mikimotoi* は山口峰生氏(瀬戸内海区水産研究所)から, その他のすべての株は国立環境研究所から譲受した.

S. costatum, *K. mikimotoi*, *P. minimum* および *H. akashiwo* の培養には, 天然海水を 1% 含有する人工海水培地(Ishimaru et al. 1989)を, *Chattonella antiqua* および *Fibrocapsa japonica* の培養には天然海水ベースの SWM-3 培地(Imai et al. 1996)を基礎培地として用いた. いずれの培地にも, 植物プランクトンの増殖を促進させるセレン(Na_2SeO_3)を最終濃度 15~17 nM になるように添加した(Ishimaru et al. 1989). また, 植物プランクトンの尿素利用に必須と考えられるニッケル($\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)を最終濃度 100 nM になるように添加した(Oliveira & Antia 1986). 培養は水温 20°C, 光強度 120 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, L:D=14 h:10 h の明暗サイクルで行った. 細胞数は検鏡による直接計数により, *in vivo* クロロフィル *a* 蛍光量は Turner Designs 10-AU Fluorometer (Sunnyvale CA, USA) により求めた.

増殖能試験 試験には, アンモニア, 硝酸および尿素をそれぞれ唯一の窒素源として, 濾過滅菌により最終濃度 0, 1, 3, 5, 10, 30, 50, 100, 250, 500, 1,000 および 10,000 $\mu\text{M-N}$ となるように調製した培地を用いた. あらかじめ, 各試験藻を窒素不含培地で 10~15 日間培養した. これらを, 前述した各種窒素化合物含有培地あるいは窒素不含培地に接種して培養した. この際, 接種に伴う窒素の持込量を最小限にし, かつ試験藻が増殖能を失わないように, 初期細胞密度として, *S. costatum* では

10,000 cells ml⁻¹, *K. mikimotoi*, *P. minimum*, *C. antiqua*, *F. japonica* および *H. akashiwo* では 2,000~3,000 cells ml⁻¹ に設定した。経時的にクロロフィル *a* 量を測定し、得られた最大収量により硝酸、アンモニアおよび尿素をそれぞれ窒素源とした場合の増殖能を判定した。

尿素の取り込み動力学 前述の試験において、それぞれ異なる増殖能を示した *K. mikimotoi* および *H. akashiwo* を供試藻に用いた。これらの保存プランクトンを、唯一の窒素源としてアンモニア、硝酸および尿素を含有したそれぞれの培地（最終濃度 20 μM-N）それぞれに接種し、定常期かつ培地中の窒素源が枯渇（アンモニア < 0.1 μM-N, 硝酸 < 0.1 μM-N, 尿素 < 0.1 μM-N）するまで前培養した。藻細胞を含む本培養液 100 ml を 300 ml 容三角フラスコに分注し、一つの窒素源について総計 20 本調整した。このうち 10 本は直ちに濾過した（GF/F フィルター：Whatman）。あらかじめ濾過滅菌した前培養と同じ窒素源を、この濾液に最終濃度 2.5, 5, 10, 20 および 30 μM-N となるようにそれぞれ 2 本立てで添加した。これら濾液中の窒素濃度を後述する方法で測定し、得られた窒素濃度を初期窒素濃度 (*S*) とした。残りのフラスコ 10 本にも同様に窒素源を 2 本立てで添

加した後、20°C、明条件、光強度 120 μmol m⁻² s⁻¹ において 30 分間培養した。その後、速やかに培養液の一部を濾過し、濾液中の窒素濃度 (*S*_i) を測定した。窒素の取り込み速度 (*V*) は、培養液中の細胞密度 (*N*) ならびに消費された窒素濃度により次式で求めた。

$$V = (S - S_i) / N$$

さらに、反復計算アルゴリズムを用いて取り込み速度 (*V*) と初期窒素濃度 (*S*) の値を以下の Michaelis-Menten 式にあてはめ、最大取り込み速度 (*V*_{max}) および半飽和定数 (*K*_s) を求めた。

$$V = V_{max} \cdot S / (K_s + S)$$

尿素濃度は、Newell et al. (1967) のジアセチルモノオキシム比色法を改良した松永・西村 (1972) の方法に準じて測定した。また、アンモニアおよび硝酸濃度はオートアナライザー TRAACS-800 (BRAN+LUEBBE) を用いて測定した。

結 果

増殖能試験 試験した赤潮プランクトンの各濃度段階におけるアンモニア、硝酸および尿素を窒素源とした場合

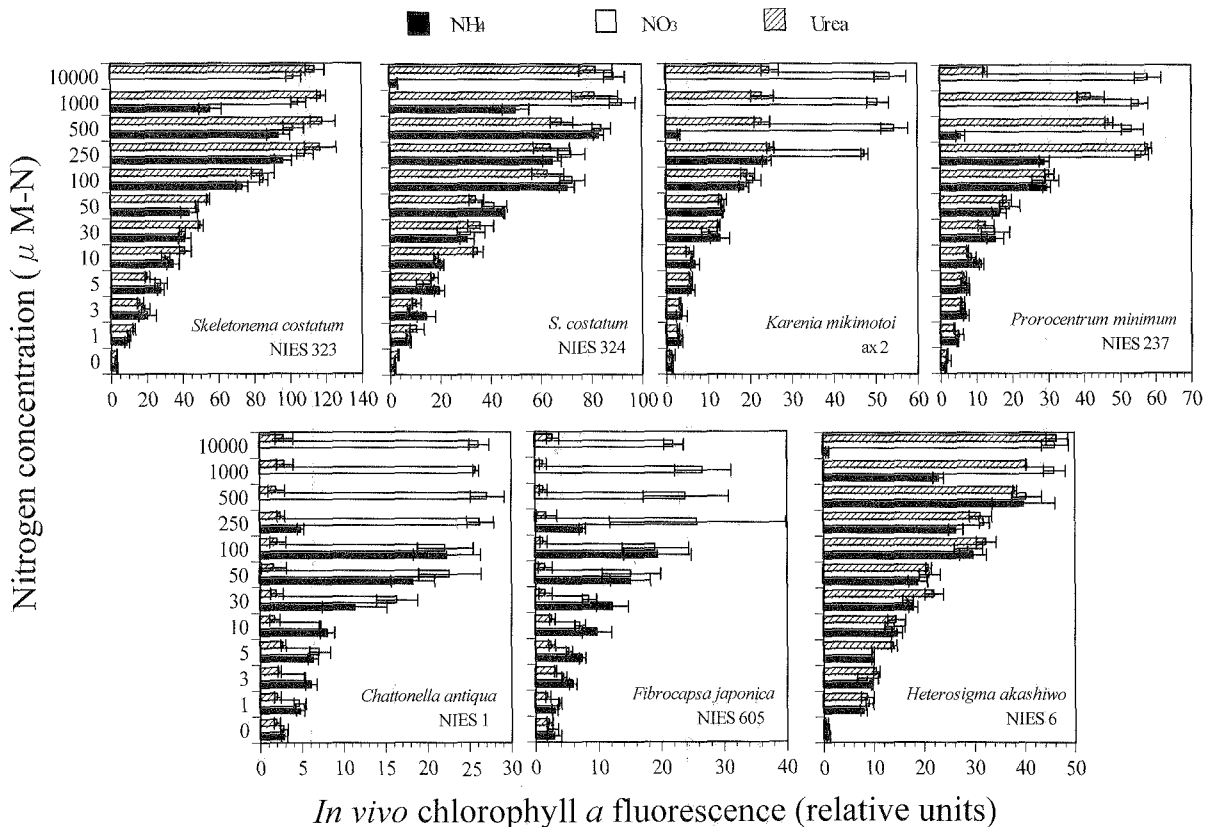


Fig. 1. Growth yields of the red tide phytoplankters obtained at each concentrations of ammonium, nitrate and urea. Bars represent the standard deviation.

の増殖能を Fig. 1 に示す。硝酸を窒素源とした場合、いずれの種も硝酸濃度に依存して細胞収量は増大し、250 $\mu\text{M-N}$ 以上で概ね飽和した。アンモニアを窒素源とした場合、いずれの種も 100 $\mu\text{M-N}$ 程度までは硝酸と同程度に増殖したものの、それ以上の濃度では収量が低下した。尿素を増殖に利用した種は、*S. costatum*, *K. mikimotoi*, *P. minimum* および *H. akashiwo* の4種であった。これら4種の収量は、尿素濃度 100 $\mu\text{M-N}$ 以下ではその濃度に依存して増大し、30 $\mu\text{M-N}$ 以下の比較的低濃度であっても、アンモニアおよび硝酸を窒素源とした場合とほぼ同等の収量まで増殖可能であった。このうち *S. costatum* および *H. akashiwo* の収量はいかなる尿素濃度においても硝酸で得られた収量とほぼ同程度であったが、*K. mikimotoi* および *P. minimum* の収量は、尿素濃度がそれぞれ 250 $\mu\text{M-N}$ および 500 $\mu\text{M-N}$ 以上で硝酸よりも低かった。このように、増殖可能な尿素濃度の上限は種によって異なることがわかった。一方、*C. anti-qua* および *F. japonica* は、濃度に関係なく尿素を窒素源として増殖できなかった。

尿素的取り込み動力学 *K. mikimotoi* および *H. akashiwo* のアンモニア、硝酸および尿素的取り込み速度は、いずれの窒素源においてもその基質濃度に依存し、それらの関係はいずれも決定係数 (r^2) が 0.73 以上で Michaelis-Menten 式に良く適合した (Fig. 2)。本式より算出された各種窒素の最大取り込み速度 (V_{\max}) および半飽和定数 (K_s) は、Table 1 に示されている。*K. mikimotoi* の V_{\max} は尿素を窒素源とした場合が最も高く、2.89 $\text{pmol-N cell}^{-1} \text{h}^{-1}$ であり、アンモニアのもの (2.31 $\text{pmol-N cell}^{-1} \text{h}^{-1}$) と大差は見られなかった。硝酸では 0.62 $\text{pmol-N cell}^{-1} \text{h}^{-1}$ であり前2者の窒素源に比べかなり低かった。各種窒素源の取り込みに対する K_s は、硝酸で 1.56 $\mu\text{M-N}$ 、アンモニアで 8.17 $\mu\text{M-N}$ ならびに尿素で 16.5 $\mu\text{M-N}$ と見積もられた (Table 1)。現場尿素濃度範囲 (十数 $\mu\text{M-N}$ 以下) における本藻の尿素的取り込み速度は、アンモニアの取り込み速度よりは若干劣るものの硝酸の取り込み速度より圧倒的に高くなった

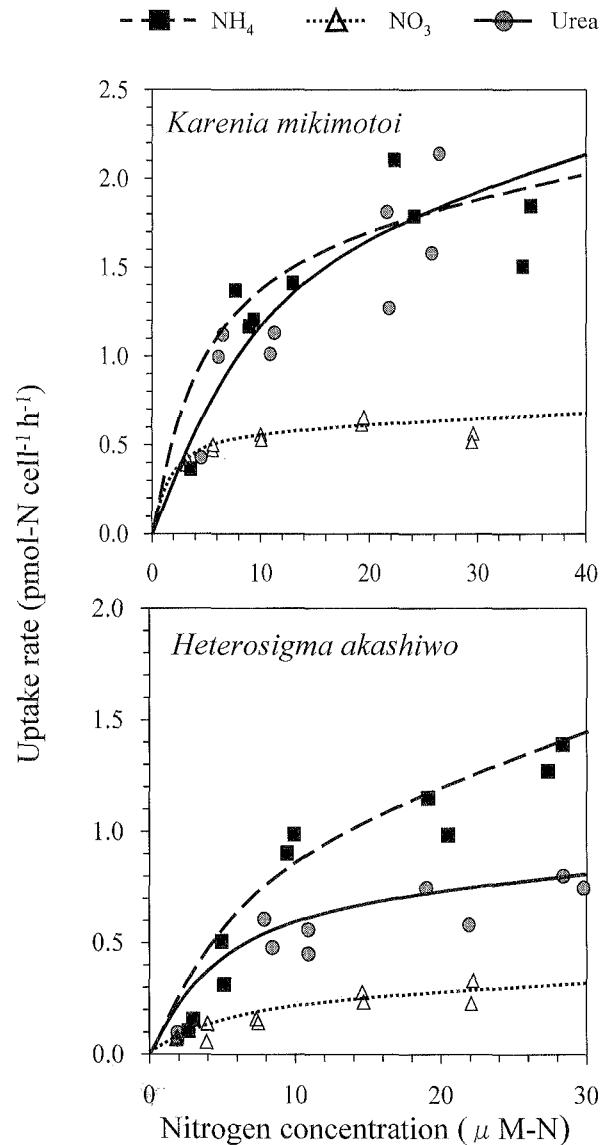


Fig. 2. Uptake kinetics for ammonium, nitrate and urea of *Karenia mikimotoi* (Top) and *Heterosigma akashiwo* (Bottom). The curves were fitted to the observed values using a non-linear least square method.

Table 1. Parameters of uptake kinetics for ammonium, nitrate and urea of *Karenia mikimotoi*, *Heterosigma akashiwo*, and other phytoplankton species. Maximum uptake rate (V_{\max}) and half-saturation constant (K_s) were obtained from Michaelis-Menten equation.

Phytoplankton species	V_{\max} ($\text{pmol-N cell}^{-1} \text{h}^{-1}$)			K_s ($\mu\text{M-N}$)			References
	NH_4	NO_3	Urea	NH_4	NO_3	Urea	
<i>Karenia mikimotoi</i>	2.31	0.62	2.89	8.17	1.56	16.5	This study
<i>Heterosigma akashiwo</i>	2.24	0.46	1.03	19.3	13.4	10.1	This study
<i>Prorocentrum minimum</i>	1.23	0.12	0.15	2.48	5.18	1.82	Fan et al. (2003b)
<i>Alexandrium catenella</i>	0.66	0.021-0.32	0.40	2.00	0.6-28.1	28.4	Collos et al. (2004)

(Fig. 2). 一方, *H. akashiwo* の V_{\max} は, アンモニアを窒素源とした場合が最も高く $2.24 \text{ pmol-N cell}^{-1} \text{ h}^{-1}$ であった. 尿素および硝酸の V_{\max} は, それぞれ $1.03 \text{ pmol-N cell}^{-1} \text{ h}^{-1}$ および $0.46 \text{ pmol-N cell}^{-1} \text{ h}^{-1}$ であった. これらの K_s は, アンモニアで $19.3 \mu\text{M-N}$, 尿素で $10.1 \mu\text{M-N}$ ならびに硝酸で $13.4 \mu\text{M-N}$ と見積もられた (Table 1). いずれの濃度段階においても, 本藻の窒素取り込み速度はアンモニアで高く, 次いで尿素, 硝酸の順に低かった (Fig. 2).

考 察

赤潮多発海域における尿素濃度について, 広島湾およびその周辺海域では $0 \sim 5.01 \mu\text{M-N}$ 程度であり (山本ほか 1994), 高知県浦ノ内湾海水中ではときに $20 \mu\text{M-N}$ 以上になるが, 概ね $0 \sim 8.16 \mu\text{M-N}$ であることが明らかとなっている (深尾ほか 2006). 他の沿岸海水中においても, 検出できない濃度から十数 $\mu\text{M-N}$ の範囲で推移すると報告されていることから (Remsen et al. 1974, Mitamura & Saijo 1975, Kaufman et al. 1983, Cho et al. 1996, Tada et al. 1998), 沿岸海水中の尿素濃度は概ね $0 \sim 10 \mu\text{M-N}$ 程度と考えられる. 本試験結果が示すように, このような現場尿素濃度であっても, 尿素を窒素源として増殖できる赤潮プランクトンは DIN と同程度の細胞収量にまで達することが可能である. したがって, 尿素が多く含まれる有機汚濁の進行した沿岸水中では, Table 2 に示す尿素を窒素源として利用可能な種は, 利用できない種よりも卓越して増殖しうるものと推察され, 生態学的に有利であると考えられる.

本試験で新たに得られた *K. mikimotoi* および *H. akashiwo* の尿素の最大取り込み速度 (V_{\max}) を, 既報の他赤潮プランクトン種 *P. minimum* (Fan et al. 2003b) および *Alexandrium catenella* (Collos et al. 2004) の V_{\max} と併せて見ると, いずれも尿素の V_{\max} は硝酸の V_{\max} よりも大きい (Table 1). このように, 基質飽和時におけるこれらの赤潮プランクトンの尿素取り込み速度は相当に高いとみなせる. しかし, 現場沿岸海域において, 尿素の取り込みが DIN と同程度であるか否かを明らかにするには, V_{\max} にのみ基づいた評価では不十分であり, 現場濃度範囲における取り込み速度についても考慮することが重要と考えられる. Fig. 2 が示すように, *K. mikimotoi* および *H. akashiwo* 2 種のアンモニア, 硝酸および尿素の各取り込み速度を現場濃度の範囲の十数 $\mu\text{M-N}$ 以下において比較してみると, これら 2 種はアンモニアには劣るものの, 硝酸よりも尿素を速く取り込むことが

概ね可能である. また, すでに報告のある *P. minimum* および *A. catenella* についても同様に尿素を硝酸より速く取り込む. これらのことから, 現場海水中において, 赤潮プランクトンのなかには窒素源として DIN と同様に尿素を速やかに取り込み, 増殖可能な種が存在すると考えられる.

浦ノ内湾海水の場合年間を通した平均尿素濃度は $2.87 \mu\text{M-N}$ であり, さらに各態窒素の濃度やその比率が大きく変動していることが明らかとなっている (深尾ほか 2006). このような有機汚濁海域では, 含まれる窒素源の種類や濃度が特定種の選択的増殖に大きく関与している可能性が考えられる.

本試験で用いた赤潮プランクトンのうち, *F. japonica* を除く 5 種の尿素を窒素源とした場合の増殖能については, これまでの試験で設定された基質濃度に差異は見られるものの, 増殖能を有するあるいは有しないという点でこれまでの報告と概ね一致するものである (Table 2). しかしながら, 山口 (1994) は *S. costatum* が尿素を窒素源とした場合, 増殖能を有しないことを報告しており, 本試験において用いた *S. costatum* 2 株により得られた結果とは合致しない. このように, 同種かつ無菌の赤潮プランクトンであるにもかかわらず増殖能に違いが見られることは, *A. catenella* および *Emiliania huxleyi* についても報告されている (Table 2). 現時点において尿素利用能の有無が何に起因するかは明確でないが, 株間におけるウレアーゼ産生能の差異に起因している可能性も考えられる. 今後, 同じ種における複数の無菌株のウレアーゼ活性を検討することも重要であると考えられる.

以上のことから, 赤潮プランクトンのなかには尿素を窒素源として有効に増殖できる種と増殖できない種が存在し, 増殖可能な種は, 海水中に含まれる尿素を速やかに取り込み, 無機態窒素と変わらない収量まで増殖可能なことがわかった. よって, 有機汚濁が進行した沿岸海域における特定種の選択的増殖過程において, 尿素利用能を有する赤潮原因種は, 生態学的に有利な窒素利用特性を発揮できるものと考えられる.

謝 辞

本研究をとりまとめるにあたり, 多くの有益なご助言をいただきました高知大学大学院黒潮圏海洋科学研究科, 深見公雄教授に感謝いたします.

引用文献

Antia, N. J., B. R. Berland, D. J. Bonin & S. Y. Maestrini 1977.

Table 2. Urea utilizing abilities of various phytoplankton.

	Ranges of the tested urea conc. ($\mu\text{M-N}$)	Reference
Urea utilizable class		
Bacillariophyceae		
<i>Achnantes brevipes</i>	500–20,000	Oliveira & Antia (1986)
<i>Chaetoceros curvisetus</i>	33	山田ほか (1983)
<i>Chaetoceros gracilis</i>	500–20,000	Oliveira & Antia (1986)
<i>Chaetoceros simplex</i>	100	Carpenter et al. (1972)
<i>Coscinodiscus watlesii</i>	500	西川・堀 (2004b)
<i>Phaeodactylum tricoratum</i>	1,180	Lourenco et al. (2002)
<i>Eucampia zodiacus</i>	33	山田ほか (1983)
<i>Skeletonema costatum</i>	0–12,500	Carpenter et al. (1972), Antia et al. (1977) 山田ほか (1983), Oliveira & Antia (1986) Lourenco et al. (2002), This study
<i>Thalassiosira pseudonana</i>	0–12,500	Antia et al. (1977)
<i>Thalassiosira weissflogii</i>	500–20,000	Oliveira & Antia (1986), Fan et al. (2003a), Lomas (2004)
<i>Thalassiosira nordenskioldii</i>	500–20,000	Oliveira & Antia (1986)
Cryptophyceae		
<i>Hillea</i> sp.	1,180	Lourenco et al. (2002)
<i>Rhodomonas lens</i>	0–12,500	Antia et al. (1977)
Chlorophyceae		
<i>Chlorella minutissima</i>	1,180	Lourenco et al. (2002)
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	1,180	Lourenco et al. (2002)
<i>Tetraselmis gracilis</i>	1,180	Lourenco et al. (2002)
Chrysophyceae		
<i>Aureococcus anophagefferens</i>	882	Fan et al. (2003a)
Dinophyceae		
<i>Amphidinium carterae</i>	500–20,000	Oliveira & Antia (1986)
<i>Karenia mikimotoi</i>	0–10,000	山口 (1994), This study
<i>Prorocentrum micans</i>	100	Uchida (1976)
<i>Prorocentrum minimum</i>	0–10,000	Lourenco et al. (2002), Fan et al. (2003a, b), This study
<i>Alexandrium catenella</i>	20–50	Dyhrman & Anderson (2003), Collos et al. (2004)
<i>Alexandrium fundyense</i>	50	Dyhrman & Anderson (2003)
Haptophyceae		
<i>Emiliania huxleyi</i>	0–12,500	Antia et al. (1977)
Prymnesiophyceae		
<i>Hymenomonas elongata</i>	500–20,000	Oliveira & Antia (1986)
<i>Isochrysis galbana</i>	1,180	Lourenco et al. (2002)
<i>Pavlova lutheri</i>	500–20,000	Oliveira & Antia (1986)
<i>Prymnesium parvum</i>	500–20,000	Oliveira & Antia (1986)
Raphidophyceae		
<i>Heterosigma akashiwo</i>	0–10,000	Watanabe et al. (1982), Zhang et al. (2006), This study
<i>Olisthodiscus luteus</i>	500–20,000	Oliveira & Antia (1986)
Urea non-utilizable class		
Bacillariophyceae		
<i>Chaetoceros didymum</i> var. <i>protuberans</i>	0–500	山口 (1994)
<i>Cyclotella cryptica</i>	0–12,500	Antia et al. (1977)
<i>Ditylum brightwellii</i>	0–500	山口 (1994)
<i>Skeletonema costatum</i>	0–500	山口 (1994)
<i>Thalassiosira</i> sp.	0–500	山口 (1994)
<i>Eucampia zodiacus</i>	500	西川・堀 (2004a)
Chlorophyceae		
<i>Chlamydomonas palla</i>	0–12,500	Antia et al. (1977)
Dinophyceae		
<i>Alexandrium catenella</i>	250	松田ほか (1999)
<i>Heterocapsa circularisquama</i>	250	Yamaguchi et al. (2001)
Haptophyceae		
<i>Emiliania huxleyi</i>	100	Carpenter et al. (1972)
Raphidophyceae		
<i>Chattonella antiqua</i>	0–300	Nakamura & Watanabe (1983), This study
<i>Chattonella subsalsa</i>	25–50	Zhang et al. (2006)
<i>Fibrocapsa japonica</i>	0–10,000	This study

- Effects of urea concentration in supporting growth of certain marine microplanktonic algae. *Phycologia* **16**: 105-111.
- Antia, N. J., P. J. Harrison & L. Oliveira 1991. The role of dissolved organic nitrogen in phytoplankton nutrition, cell biology and ecology. *Phycologia* **30**: 1-89.
- Carpenter, E. J., C. C. Remsen & S. W. Watson 1972. Utilization of urea by some marine phytoplankters. *Limnol. Oceanogr.* **17**: 265-269.
- Cho, B. C., M. G. Park, J. H. Shim & F. Azam 1996. Significance of bacteria in urea dynamics in coastal surface waters. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **142**: 19-26.
- Collos, Y., C. Gagne, M. Laabir, A. Vaquer, P. Cecchi & P. Souchu 2004. Nitrogenous nutrition of *Alexandrium catenella* (Dinophyceae) in cultures and in Thau Lagoon, southern France. *J. Phycol.* **40**: 96-103.
- Dyhrman, S. T. & D. M. Anderson 2003. Urease activity in cultures and field populations of the toxic dinoflagellate *Alexandrium*. *Limnol. Oceanogr.* **48**: 647-655.
- Fan, C., P. M. Glibert, J. Alexander & M. W. Lomas 2003a. Characterization of urease activity in three marine phytoplankton species, *Aureococcus anophagefferens*, *Prorocentrum minimum* and *Thalassiosira weissflogii*. *Mar. Biol.* **142**: 949-958.
- Fan, C., P. M. Glibert & J. M. Burkholder 2003b. Characterization of the affinity for nitrogen, uptake kinetics, and environmental relationships for *Prorocentrum minimum* in natural blooms and laboratory cultures. *Harmful Algae* **2**: 283-299.
- 深尾剛志・故西島敏隆・深見公雄・足立真佐雄 2006. 汚濁海域浦ノ内湾における植物プランクトンの発生に対する尿素の寄与. 日本プランクトン学会報 **53**: 77-86.
- Glibert, P. M., C. A. Heil, D. Hollander, M. Revilla, A. Hoare, J. Alexander & S. Murasko 2004. Evidence for dissolved organic nitrogen and phosphorus uptake during a cyanobacterial bloom in Florida Bay. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **280**: 73-83.
- Horrigan, S. G. & J. J. McCarthy 1981. Urea uptake by phytoplankton at various stages of nutrient depletion. *J. Plankton Res.* **3**: 403-414.
- Imai, I., S. Itakura, Y. Matsuyama & M. Yamaguchi 1996. Selenium requirement for growth of a novel red tide flagellate *Chattonella verruculosa* (Raphidophyceae) in culture. *Fish. Sci.* **62**: 834-835.
- Ishimaru, T., T. Takeuchi, Y. Fukuyo & M. Kodama 1989. The selenium requirement of *Gymnodinium nagasakiense*. p. 357-360. In: *Red Tides, Biology, Environmental Science and Toxicology* (eds. Okaichi, T., D. M. Anderson & T. Nemoto). Elsevier, New York.
- Kaufman, Z. G., J. S. Lively & E. J. Carpenter 1983. Uptake of nitrogenous nutrients by phytoplankton in a Barrier Island Estuary: Great South Bay, New York. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* **17**: 483-493.
- Lomas, M. W. 2004. Nitrate reductase and urease enzyme activity in the marine diatom *Thalassiosira weissflogii* (Bacillariophyceae): interactions among nitrogen substrates. *Mar. Biol.* **144**: 37-44.
- Lourenco, S. O., E. Barbarino, J. Mancini-Filho, K. P. Schinck & E. Aidar, 2002. Effects of different nitrogen sources on the growth and biochemical profile of 10 marine microalgae in batch culture: an evaluation for aquaculture. *Phycologia*. **41**: 158-168.
- 松田篤志・西島敏隆・深見公雄 1999. 有毒渦鞭毛藻 *Alexandrium catenella* の増殖に及ぼす窒素・リン栄養塩の影響. 日水誌 **65**: 847-855.
- 松永勝彦・西村雅吉 1972. 水中尿素定量法の改良法の検討. 分析化学. **21**: 1387-1389.
- 松山幸彦・内田卓志・米田 実・森山貴光 1998. 浦ノ内湾における新型赤潮プランクトンの消長と環境要因の関係. p. 45-51. 渦鞭毛藻・ラフィド藻等新型赤潮の発生機構と予測技術の開発に関する研究. 平成9年度瀬戸内水研報.
- Mitamura, O. & Y. Saijo 1975. Decomposition of urea associated with photosynthesis of phytoplankton in coastal waters. *Mar. Biol.* **30**: 67-72.
- Nakamura, Y. & M. M. Watanabe 1983. Growth Characteristics of *Chattonella antiqua*. Part 2. Effects of nutrients on growth. *J. Oceanogr. Soc. Japan.* **39**: 151-155.
- Newell, B. S., B. Morgan & J. Cundy 1967. The determination of urea in seawater. *J. Mar. Res.* **25**: 201-202.
- 西島敏隆・山砥稔文・畑 幸彦 1990. 赤潮珪藻 *Skeletonema costatum* の栄養要求と AGP 試験に供試するための調製法. 水質汚濁研究 **13**: 173-179.
- 西川哲也・堀 豊 2004a. ノリの色落ち原因藻 *Eucampia zodiacae* の増殖に及ぼす窒素, リンおよび珪素の影響. 日水誌 **70**: 31-38.
- 西川哲也・堀 豊 2004b. ノリの色落ち原因藻 *Coscinodiscus wailesii* の増殖に及ぼす窒素, リンおよび珪素の影響. 日水誌 **70**: 872-878.
- Oliveira, L. & N. J. Antia 1986. Nickel ion requirements for autotrophic growth of several marine microalgae with urea serving as nitrogen source. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **43**: 2427-2433.
- Paasche, E. & S. Kristiansen 1982. Nitrogen nutrition of the phytoplankton in the Oslofjord. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* **14**: 237-249.
- Remsen, C. C., E. J. Carpenter & B. W. Schroeder 1974. The role of urea in marine microbial ecology, p. 286-304. In: *Effects of the ocean environment on microbial activities* (eds. Colwell, R. R. & Morita, R. Y.). Univer. Park Press, Baltimore, MD.
- Tada, K., M. Tada & Y. Maita 1998. Dissolved free amino acids in coastal seawater using a modified fluorometric method. *J. Oceanogr.* **54**: 313-321.
- Takahashi, M. & N. Fukazawa 1982. A mechanism of "Red-Tide" formation. II. Effect of selective nutrient stimulation on the growth of different phytoplankton species in natural water. *Mar. Biol.* **70**: 267-273.
- Uchida, T. 1976. Excretion of ammonia by *Prorocentrum micans* Ehrenberg in urea-grown culture. *Jap. J. Ecol.* **26**: 43-44.
- 山田真知子・新井義昭・鶴田新生・吉田陽一 1983. 海産植物プランクトンの有機態窒素化合物利用能. 日水誌 **49**: 1445-1448.
- 山口峰生 1994. *Gymnodinium nagasakiense* の赤潮発生機構と発生予知に関する生理生態学的研究. 南西水研報 **27**: 251-394.
- Yamaguchi, M., S. Itakura & T. Uchida 2001. Nutrition and growth kinetics in nitrogen- or phosphorus-limited cultures of the 'novel red tide' dinoflagellate *Heterocapsa circularisquama* (Dinophyceae). *Phycologia* **40**: 313-318.
- 山本民次・山崎 徹・藤森 聡・松田 治 1994. 広島湾, 江田内湾, 周防灘北東部海域および大田川における尿素の濃度

- について. 広島大学生物生産学部紀要 **33**: 51-58.
- 山本民次・橋本俊也・辻けい子・松田 治・樽谷賢治 2002. 1991~2000年の広島湾海中における親生物元素の時空間的変動, 特に植物プランクトン態C:N:P比からの乖離. 沿岸海洋研究 **39**: 163-169.
- Watanabe, M. M., Y. Nakamura, S. Mori & S. Yamochi 1982. Effect of physico-chemical factors and nutrients on the growth of *Heterosigma akashiwo* HADA from Osaka Bay, Japan. *Jap. J. Phycol.* **30**: 279-288.
- Zhang, Y., F.-X. Fu, E. Whereat, K. J. Coyne & D. A. Hutchins 2006. Bottom-up controls on a mixed-species HAB assemblage: A comparison of sympatric *Chattonella subsalsa* and *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae) isolates from the Delaware Inland Bays, USA. *Harmful Algae* **5**: 310-320.