

ノリ幼芽と植物プランクトン 3 種に及ぼす緩衝剤の影響

久野勝利・川村嘉応

Effect of Buffer Agent on the Growth of Nori Spores and Three Phytoplankton Species in Culture

Katsutoshi KUNO and Yoshio KAWAMURA

In order to determine the suitable buffer agent and its concentration in the mixed culture of Nori (*Porphyra yezoensis*) and phytoplankton, effects of six buffer agents (Tris, HEPES, Bicine, Tricine, TAPS and EPPS) on the growth of Nori spores, Tricine on the growth of three phytoplankton species (*Fibrocapsa japonica*, *Skeletonema costatum* and *Chaetoceros* sp.) were examined in vitro. The occurrence rate of abnormal buds and the growth of Nori thalli, the phytoplankton growth, and the change in pH value of the culture medium suggest that 10mM of Trichine was a suitable buffer agent. However, the above experiments should be conducted on a case to case basis, in order to determine the suitable buffer agent and its concentration for each age of Nori thalli and/or each phytoplankton species.

はじめに

近年、有明海では、珪藻、鞭毛藻類などの赤潮がノリ養殖期間に発生し、ノリの生長不良や色落ちなどを引き起こし、ノリの生産を不安定にしている。そのため、色落ちなどの対策を検討するためには、ノリの生育と赤潮生物である植物プランクトンの増殖との関連を明らかにすることが重要な課題であると考えられる。

ノリ葉体は、養殖漁場において、植物プランクトンだけでなく、他のいくつもの要因によりその生育が左右されている。従って、ノリ葉体と植物プランクトンの両種が良好に増殖する室内実験系での混合培養は、両種の競合関係などを把握できる有効な方法と考えられる。しかし、この方法は、両種が良好に増殖できる培養液、水温、照度などの培養条件を事前に検討する必要がある。特に、緩衝剤の選択は重要であり、培養によるpHの変化が小さく、両種の生体自体への負の影響が少ないことが条件となる。しかし、ノリ葉体と植物プランクトンとの混合培養を前提として、室内培養により緩衝剤を比較検討した報告はない。

そこで、本研究では、ノリ幼芽の生長と植物プランク

トン 3 種の増殖に及ぼす各種緩衝剤の影響について検討したので、以下に報告する。

材料および方法

実験 1 各種緩衝剤によるノリ幼芽の培養

基本海水は、有明海佐賀県海域中央部で採水し、ポリプロピレンフィルター (TCW, 孔径 $1\mu\text{m}$) でろ過し暗所保管した海水をオートクレーブしたものを用いた (以下、基本海水と記す)。この基本海水に補強栄養塩として改変SWM3¹⁾を加え、各種緩衝剤を既定濃度となるように添加し培養海水とした。

供試ノリ葉体は、採苗後 1 日経過したスサビノリ (*Porphyra yezoensis*: 品種名 新佐賀 1 号) の幼芽期葉体を用いた。その作成法について以下に示す。フリー糸状体をカキ殻に穿孔させて、 18°C 、 $20\mu\text{mol}/\text{sec}/\text{m}^2$ 、明暗周期12L:12Dで3ヶ月、および 26°C 、 $15\mu\text{mol}/\text{sec}/\text{m}^2$ 、明暗周期13L:11Dで3ヶ月間静置培養した。さらに、 18°C 、 $80\mu\text{mol}/\text{sec}/\text{m}^2$ 、明暗周期12L:12D、7日間、通気培養により糸状体の成熟を進め殻胞子を放出させ、煮沸滅菌した5cmビニロン単糸に採苗した。単糸は1日通気培養後、葉体 (1~2細胞) の着生数を確

認し用いた。なお、ノリ葉体の作出に関する一連の培養海水は、基本海水を煮沸滅菌したものを用いた。また、実験時のノリ葉体（単糸）からの雑藻混入を軽減化するため、カキ殻糸状体の凹凸の除去と18°C成熟培養における糸状体のブラッシング、滅菌海水洗浄および培養海水の換水を毎日行った。

試験は、以下に示す緩衝剤と添加濃度で3試験を行った。①：横尾ら²⁾、吉川³⁾および佐々木ら⁴⁾の報告からTris(2-Amino-2-hydroxymethyl-1, 3-propanediol, 和光純薬社製), HEPES (N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid, シグマ社製)について検討した。添加濃度は、Trisは2.06, 4.13mM, HEPESは0.42, 0.70mMとした。②：Alfred⁵⁾の報告から、グッド緩衝剤でpH7.5~8.5に酸解離定数(pKa)をもつBicine (N, N-Bis(2-hydroxyethyl) glycine, 和光純薬社製), Tricine (N [Tris (hydroxymethyl) methyl] glycine, 和光純薬社製), TAPS (N-Tris (hydroxymethyl) methyl-3-aminopropanesulfonic acid, 和光純薬社製) およびEPPS (3-[4-(2-Hydroxyethyl) -1-piperazinyl] propanesulfonic acid, 和光純薬社製) について検討した。添加濃度は、それぞれ2.0, 5.0mMとした。③：②の試験でノリ幼芽の生長が良好であったBicineとTricineそれぞれについて、培養液添加濃度を6.0~10.0mMの間で1.0mM毎に設定し、比較検討した。なお、①~③の試験は、すべてpHを8.0±0.1に調整し、緩衝剤を添加しない培養海水を対照とした。培養は、培養海水をそれぞれガラス製試験管(φ21×200mm)に20mℓ分注し、ノリ葉体が付着した単糸を2本ずつ投入し行った。なお、①~③で用いた単糸のノリ幼芽の平均着生密度は、2mm単糸あたりそれぞれ7.6, 5.2, 8.0個であった。培養条件は18°C, 90μmol/sec/m² (③は、70μmol/sec/m²), 明暗周期12L:12D, 120回/min振とう培養とし、培養は10日間(①は12日間)行った。

測定は、以下に示す項目において培養終了後直ちに行った。ノリ幼芽の異常芽の出現状況は、単糸上の全葉体を顕微鏡下で観察し、くびれ、肥厚などの変形葉体および死細胞を含む葉体を異常芽として計数し、全芽数に対する割合から異常芽出現率として表した。また、葉体の生長は、単糸2本に付着している葉体のうち、それぞれ大きい方から10番目までの葉長と最大葉幅を測定し、平均葉長と平均葉幅で表した。なお、葉長幅比は、葉長/葉幅で算出し、測定した20個体の平均値で示した。各培養液のpHは、常法により測定した。

実験2 Tricineによる植物プランクトンの培養

基本海水は、先の試験と同じものを用いた。実験は、先の試験結果から、この基本海水に補強栄養塩として改変SWM3, 緩衝剤として既定濃度となるようTricineを添加した培養海水を用いた。

供試プランクトンは、有明海佐賀県海域で採集、単離した*Fibrocapsa japonica* (2000年11月に採集), *Skeletonema costatum* (2001年7月に採集), *Chaetoceros* sp. (*S. costatum*と同じ)の培養株3種とした。なお、実験には、これらの株を予めBuffer無添加培養海水で18°C (*F. japonica*は20°C), 70μmol/sec/m², 明暗周期12L:12D, 10~14日間静置培養し、それぞれのプランクトンを一定量接種した。

試験は、Tricineの培養海水添加濃度を1.0~10.0mMの間で1.0mM毎に設定し、無添加の対照区とあわせた11試験区とした。それぞれの培養海水のpHは、すべて8.0±0.1に調整した。なお、本試験は、先に示したプランクトン3種それぞれについて行った。培養は、培養海水をそれぞれガラス製試験管(φ21×200mm)に20mℓ分注し、プランクトンを接種後、18°C (*F. japonica*は20°C), 70μmol/sec/m², 明暗周期12L:12D, 静置培養とした。

培養は、*F. japonica*が16日後、*S. costatum*が18日後、*Chaetoceros* sp.が15日後で終了した。細胞数は、プランクトン計数板 (Matsunami glass Co. ltd) を用いて計数した。また、各培養液のpHは、培養終了後直ちに常法により測定した。

結 果

実験1 各種緩衝剤によるノリ幼芽の培養

Tris, HEPESにおけるノリ幼芽の異常芽出現率(以下、出現率と記す)、葉長および葉長幅比をFig. 1に示した。培養12日後の出現率は、対照で24.3%, Tris2.06, 4.13mMで98.6, 93.0%, HEPES0.42, 0.70mMでも100.0%であった。対照の出現率は、採苗後1日しか経過していない幼芽で無通気培養であったことから、培養12日後で24.3%と高めであった。しかし、試験区の出現率は対照と比べ明らかに高い値を示した。出現した異常芽は肥厚、くびれ、死細胞であり、肥厚の出現割合が高かった。特に、Tris, HEPESでは肥厚が顕著で、Fig. 2に示すように葉体全体の細胞が肥大し、葉形が凸凹した葉体がほとんどであった。また、葉体の中程から根様糸細胞の出現も多くみられた。試験区では、培養1日後には色調不良や肥大した細胞がみられ、培養6~8日後に

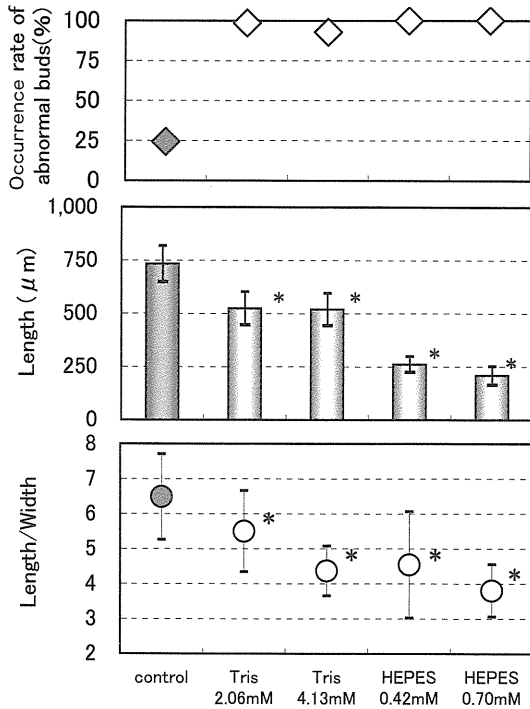


Fig. 1 Occurrence rate of abnormal buds, length and length : width ratio of Nori thalli after the culture for twelve days in Tris and HEPES buffer. Length, length/width value represents the mean \pm SD. Upper, occurrence rate of abnormal buds ; Middle, length ; Under, length : width ratio ; *, significantly different at $p < 0.05$ (*U-test*) from control.

は全葉体の半分程度が異常芽であった。培養12日後の葉長は、対照で733.5 μ m, Tris2.06, 4.13mMで525.0, 520.0 μ m, HEPES0.42, 0.70mMで262.0, 209.0 μ mであった。対照との葉長差についてMann-WhitneyのU-検定(以下, 検定と記す)を行った結果, すべての試験区で有意差がみられ($p < 0.05$), 特に, HEPESで生長の遅れが顕著であった。葉長幅比は, 対照で6.4, Tris2.06, 4.13mMで5.3, 4.3, HEPES0.42, 0.70mMで4.3, 3.7であった。また, 培養終了時のpHは, 対照で7.96, Tris2.06, 4.13mMで7.98, 8.00, HEPES0.42, 0.70mMで8.01, 7.94であり, 対照を含めたすべての試験区で培養前後のpHの大きな変化はみられなかった。

Bicine, Tricine, TAPS, EPPSの各種緩衝剤におけるノリ幼芽の異常芽出現率, 葉長および葉長幅比をFig. 3に示した。培養10日後の出現率は, 対照で23.4%, Bicine2.0, 5.0mMで22.2, 20.9%, Tricine2.0, 5.0mMで26.1, 26.9%, TAPS2.0, 5.0mMで26.7, 28.6%, EPPS2.0, 5.0mMで43.6, 66.1%であった。対照の出現率は, 先の試験とほぼ同レベルであり, 出現した異常芽も肥厚, くびれで同様な種類であった。試験区の出現率は, Bicine < Tricine < TAPS < EPPSの順に高くなっており, 特に, EPPSは対照と比べ明らかに高い値を示した。出現した異常芽は肥厚, くびれ, ねじれ, 死細胞であり, 先の試験同様に肥厚の出現割合が高かった。特に, EPPSでは肥厚が顕著で, Fig. 4に示すように葉体の根本を中心として細胞が肥大し, Tris, HEPESと同様に葉体中程から出現した根様糸細胞もみられた。また, この傾

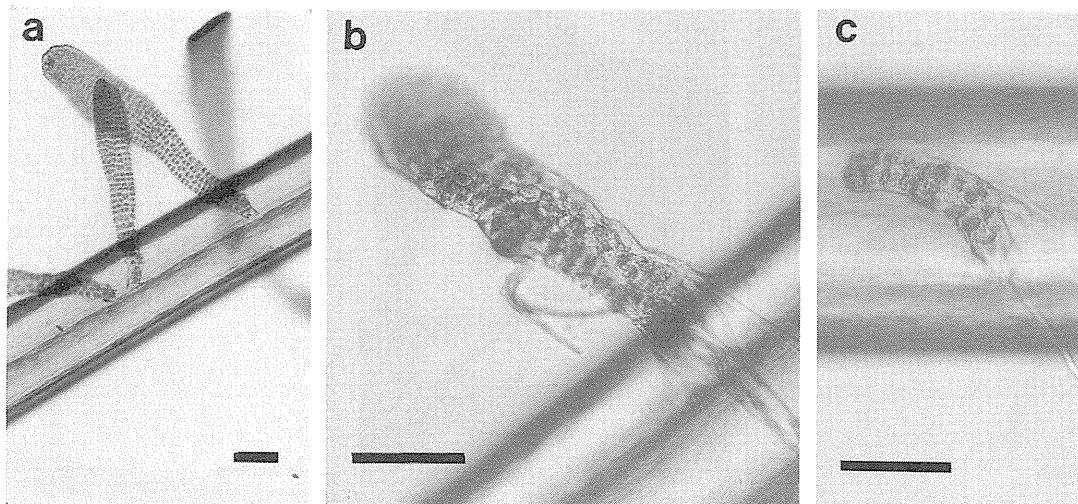


Fig. 2 Micrographs of abnormal buds of Nori thalli after the culture for twelve days in Tris and HEPES buffer. a, control (normal buds) ; b, Tris (tumour of bud by cell hypertrophy) ; c, HEPES (tumour of bud by cell hypertrophy). Scale bars indicate 100 μ m.

向は、EPPSのように多くはないがTAPSでもみられた。培養10日後の葉長は、対照で699.0 μm 、Bicine2.0, 5.0 mMで708.0, 727.5 μm 、Tricine2.0, 5.0mMで717.5, 749.0 μm 、TAPS2.0, 5.0mMで702.0, 673.5 μm 、EPPS2.0, 5.0mMで524.0, 460.0 μm であった。出現率が高かったEPPSで生長の遅れが顕著で、対照との葉長さの検定の結果、有意差がみられた ($p < 0.05$)。葉長幅

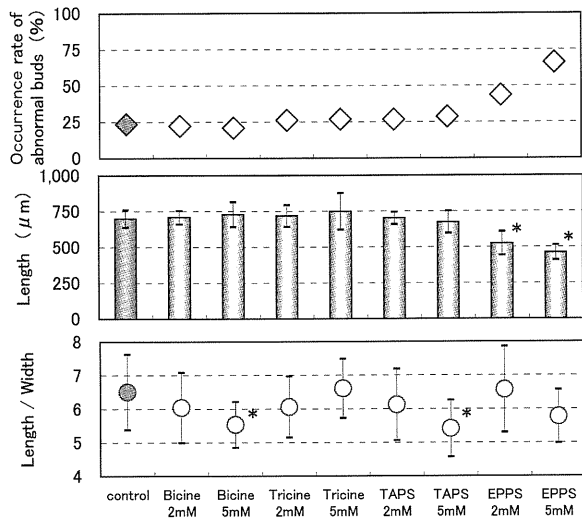


Fig. 3 Occurrence rate of abnormal buds, length and length : width ratio of Nori thalli after the culture for ten days in Bicine, Tricine, TAPS, and EPPS buffer. Length, length / width value represents the mean \pm SD. Upper, occurrence rate of abnormal buds ; Middle, length ; Under, length : width ratio ; *, significantly different at $p < 0.05$ (U -test) from control.

比は、対照で6.5、Bicine2.0, 5.0mMで6.0, 5.5、Tricine2.0, 5.0mMで6.1, 6.6、TAPS2.0, 5.0mMで6.1, 5.4、EPPS2.0, 5.0mMで6.6, 5.8であった。Bicine, TAPSは、対照と比べ太葉傾向を示し、検定の結果、Bicine5.0mM, TAPS5.0mMで有意差がみられた ($p < 0.05$)。特に、Bicineでは、Fig. 4に示すように太葉傾向に加え、根本細胞が細い傾向もみられ、単糸から脱落し培養液中に浮遊した状態の葉体(以下、「脱落葉体」と記す)が他の試験区に比べ多く確認された。培養終了時のpHは、対照で8.06、Bicine2.0, 5.0mMで8.11, 8.03、Tricine2.0, 5.0mMで8.10, 7.98、TAPS2.0, 5.0mMで8.10, 8.00、EPPS2.0, 5.0mMで8.07, 8.00であり、対照を含めたすべての試験区で培養前後のpHの大きな変化はみられなかった。

Bicine, Tricineの各添加濃度におけるノリ幼芽の異常芽出現率、葉長および葉長幅比をFig. 5に示した。培養10日後の出現率は、対照で25.9%、Bicine6.0~10.0mMで5.0~14.8%、Tricine6.0~10.0mMで7.7~14.3%であった。試験区での出現率は、いずれも対照より低く、添加濃度が高くなれば低くなる傾向がみられた。また、出現した異常芽はくびれ、肥厚、ねじれ、死細胞であり、先の実験と違い全体的にくびれの出現割合が高かった。培養10日後の葉長は、対照で401.0 μm 、Bicine6.0~10.0 mMで488.0~555.0 μm 、Tricine6.0~10.0mMで582.5~641.5 μm であった。すべての試験区が対照と比べ生長が良く、対照との葉長さの検定の結果、すべての試験区で有意差がみられた ($p < 0.05$)。また、Bicineで

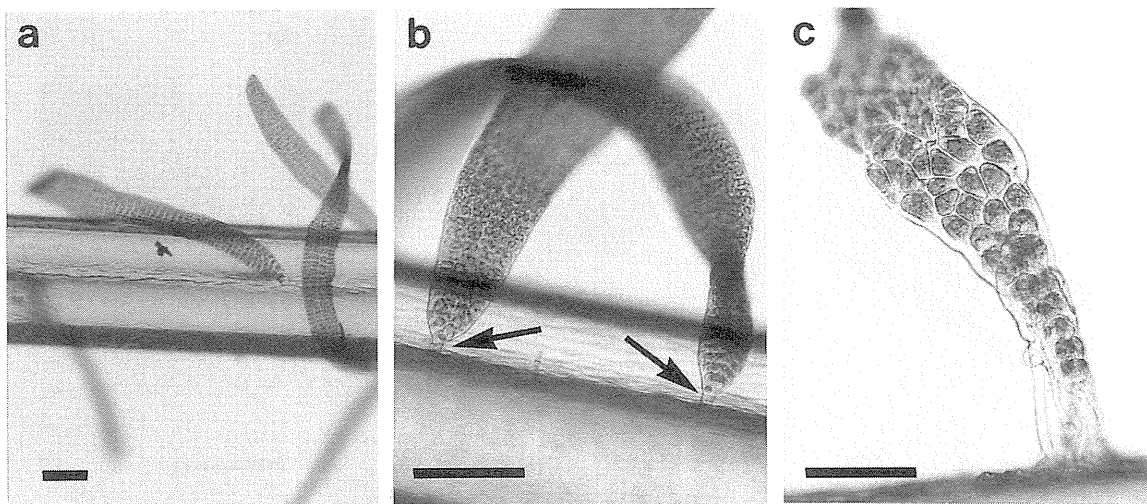


Fig. 4 Micrographs of Nori thalli after the culture for ten days in Bicine and EPPS buffer. a, control (normal buds) ; b, Bicine (arrows indicate narrow bud at the root) ; c, EPPS (tumour of bud by cell hypertrophy). Scale bars indicate 100 μm .

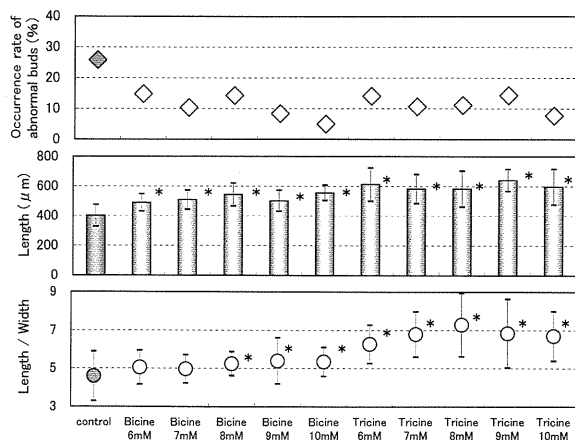


Fig. 5 Occurrence rate of abnormal buds, length and length : width ratio of Nori thalli after the culture for ten days in Bicine and Tricine buffer. Length, length/width value represents the mean \pm SD. Upper, occurrence rate of abnormal buds ; Middle, length ; Under, length : width ratio ;*, significantly different at $p < 0.05$ (U -test) from control.

は添加濃度が高くなれば生長も良くなる傾向がみられ、全体的にBicineよりTricineの方が生長が良好であった。葉長幅比は、対照で4.6, Bicine6.0~10.0mMで5.0~5.4, Tricine6.0~10.0mMで6.3~7.3であった。すべての試験区が対照と比べ葉長幅比は高く、対照との葉長差の検定の結果、Bicine6.0mMと7.0mMを除くすべての試験区で有意差がみられた ($p < 0.05$)。また、Bicineは、先の試験同様、Tricineより全体的に太葉で根本細胞が細い傾向がみられ、脱落葉体も多く確認された。培養終了時のpHは、対照で7.95, Bicine6.0~10.0mMで7.90~8.03, Tricine6.0~10.0mMで7.90~8.00であり、先の試験同様、対照を含めたすべての試験区で培養前後のpHの大きな変化はみられなかった。

なお、実験1すべてにおいて、低栄養塩下でみられる色調低下や細胞間隙が広く、液胞肥大した葉体は観察されなかった。

実験2 Tricineによる植物プランクトンの培養

Tricineを用いた*F. japonica*, *S. costatum*および*Chaetoceros* sp.の培養における終了時の細胞密度およびpHをFig. 6に示した。*F. japonica* (培養16日後)の細胞密度は、対照で 2.04×10^4 cells/ml, Tricine 1.0~10.0 mMで $1.68 \times 10^4 \sim 4.00 \times 10^4$ cells/mlとなり、Tricine濃度が高くなれば大きくなる傾向を示した。pHは、対照で8.58, Tricine1.0~10.0mMで8.93~8.25となり、Tricine濃度が高くなればpH上昇が小さくなる傾向を

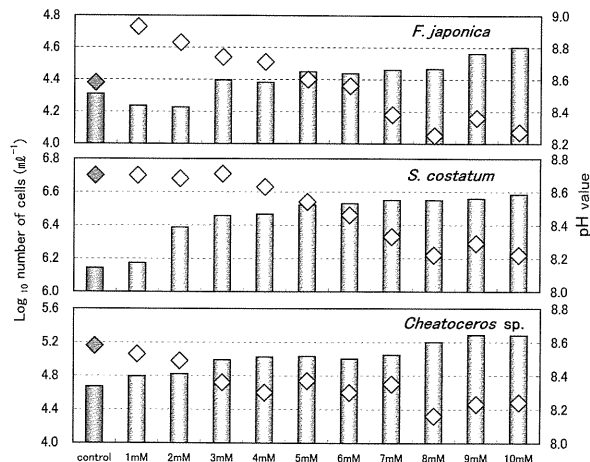


Fig. 6 Cell density of three phytoplankton and pH value of culture medium at the finish of experiment in Tricine buffer. Upper, *F. japonica* (after the culture for sixteen days) ; Middle, *S. costatum* (after the culture for eighteen days) ; Under, *Chaetoceros* sp. (after the culture for fifteen days) ; \square , cell density ; \diamond , pH value.

示した。なお、対照のpH最大値は、培養9日目の8.85(細胞密度 1.64×10^4)であった。*S. costatum* (培養18日後)の細胞密度は、対照で 1.39×10^6 cells/ml, Tricine1.0~10.0mMで $1.49 \sim 3.85 \times 10^6$ cells/mlとなった。pHは、対照で8.70, Tricine 1.0~10.0mMで8.71~8.22となった。*Chaetoceros* sp. (培養15日後)の細胞密度は、対照で 4.69×10^4 cells/ml, Tricine 1.0~10.0mMで $6.22 \sim 19.25 \times 10^4$ cells/mlとなった。pHは、対照で8.58, Tricine1.0~10.0mMで8.49~8.16となった。*S. costatum*と*Chaetoceros* sp.は、いずれも、細胞密度ではTricine濃度が高くなれば大きくなり、pHではTricine濃度が高くなればpH上昇が小さくなる。*F. japonica*と同様な傾向を示した。

考 察

従来から海産藻類の培養においては、pHの変化を小さくするためにTRISなどの緩衝剤が培養液に添加されている^{1,6)}。しかし、緩衝剤によっては生体系への負の影響が報告⁷⁻⁹⁾されており、培養実験における緩衝剤の選定は重要である。特に、ノリ幼芽と植物プランクトンとの混合培養では、両者が十分に増殖する培養条件を設定する必要があり、本試験では、両種の混合培養を前提とした緩衝剤の選定とその添加濃度について検討した。

実験1の対照における異常芽出現率は、供試ノリ葉体

が採苗後1日経過した早期の幼芽であったことや無通気培養(振とう培養)であったことから、23.4~25.9%の高めであった。しかし、Tris、HEPESおよびEPPSは、明らかに対照や他の緩衝剤に比べ出現率は高く、特に肥厚葉体の出現が顕著であった。肥厚は対照を含め全試験区でみられており、緩衝剤に起因する特有の異形芽とは考えにくい。また、ノリ葉体への高pHの影響に関して、須藤¹⁰⁾は、pHが高まれば利用可能な炭酸塩が著しく減少して光合成を低下させ、pH8.4を超えると生長が遅れるとしている。さらに、渡辺ら¹¹⁾は、pH8.5以上の海水に浸漬されたノリ葉体は酸化的なリン酸反応と共役していない異常呼吸が出現し、細胞透過性フィコエリスリン等が変化することから、pH8.5以上でノリの生理に負の影響があるとしている。実験1では、pHは7.90~8.11を示し、対照を含むすべての試験区で安定しており、pH上昇の影響は考えられない。従って、Tris、HEPESおよびEPPSの出現率が顕著であったことは、この3つの緩衝剤が肥厚を助長させる細胞への負の影響が他の緩衝剤より大きいと考えられた。緩衝剤が生化学、生物学的反応において負の影響を及ぼす報告⁷⁻⁹⁾は多数あり、藻類培養において多用されているTrisでも、反応系の生物相に蓄積しやすく、植物のミトコンドリアのイソクエン酸脱水素酵素を阻害する⁸⁾としている。いずれにしても、ノリの細胞障害が何に起因するかは不明であり、今後、幼芽の異常芽の発生環境についても検討する必要があると思われる。

室内におけるノリ葉体の生長に関して、川村ら¹²⁾は培養10日後で葉長670~720 μ m、葉長幅比10.9~12.0としている。実験1の対照は、培養10~12日後で葉長401.0~733.5 μ m、葉長幅比4.6~6.4となり、先の知見と比べ太葉傾向であるが、本試験が培地容量20mlの試験管で無通気培養(振とう培養)であることを考慮すれば、本実験の培養方法はノリの生長に関して問題はないと考えられた。試験区は、出現率が高かったTris、HEPESおよびEPPSで生長の遅れが顕著で、逆に出現率が低いBicineとTricineで生長は良好となり、細胞への障害の度合いが生長に反映される結果となった。また、BicineとTricineは、添加濃度が高くなれば対照に比べさらに出現率が低くなり生長も良くなった。pH上昇が試験全体で大きくないことから、この両緩衝剤の高濃度添加によってノリ細胞に対するプラス要因が增強されたと考えられた。しかし、Bicineは、単孢子放出が多くなく、太葉で根細胞が細い傾向を示し、他の試験区に比べ脱落葉体も多くみられた。また、TAPSはTris、HEPES、

EPPS程ではないが、BicineやTricineに比べ根本細胞の肥大傾向が目立った。従って、実験1では、Tricine6.0~10.0mM添加がノリ幼芽の培養において有効と考えられた。

室内実験系における植物プランクトンの培養は、培養条件にもよるが、一般的にその増殖の速さからpHは大きく上昇しやすい。また、緩衝剤の種類によっては、プランクトンの増殖を阻害する報告⁶⁾もある。従って、植物プランクトンの培養液に使用する緩衝剤の選択とその添加濃度の設定は重要である。実験2の結果では、供試したプランクトン3種すべて、Tricine低濃度添加区でpH上昇が大きく増殖不良を示し、逆に高濃度添加区ではpH上昇が小さく増殖は良好となる傾向がみられた。本実験では、Tricine緩衝剤自体のプランクトン細胞への直接的な影響は明らかではないが、pH上昇の差がその増殖に反映された結果となった。プランクトンの増殖とpHに関する報告¹³⁻¹⁶⁾で、その増殖至適pHについては、種によって差はあるが、総じてpH7.8~8.5の範囲にあるものが多い。今回の試験結果でも、3種のプランクトンの増殖がいちばん良好であったTricine10.0mM添加区では、pHは8.2~8.3の範囲にあった。また、前述したノリ葉体への高pHの影響に関する報告^{10,11)}から、混合培養では、プランクトン増殖により培養液のpHが8.4以上に上昇することは、ノリ幼芽の生長に対して負の影響が大きいと考えられる。従って、実験2では、Tricine10.0mMを添加した場合、ノリに負の影響がないpH域で安定し、3種プランクトンの増殖にもいちばん良好になると考えられた。

以上のことから、ノリ幼芽と植物プランクトン(*F. japonica*, *S. costatum*および*Chaetoceros* sp.)との混合培養における培養液の緩衝剤およびその添加濃度は、Tricine10.0mMが適当と考えられた。しかし、プランクトン種によっては緩衝剤による増殖速度に差がみられる報告⁵⁾もあり、*Akashiwo sanguinea*をTricine10.0mMで培養した別の試験では増殖が不良であった(未発表)。また、幼芽期のノリ葉体を用いた通気培養や幼葉期のノリ葉体を用いた無通気培養において、Tris添加培養液で十分なノリの生長がみられた報告^{3,4)}もある。従って、混合培養試験では、ノリ葉体の葉齢、植物プランクトンの種類および通気等の培養条件によっては、本試験で用いた6種の緩衝剤やそれ以外の緩衝剤について、添加濃度も含めその都度検討する必要があると考えられた。

文 献

- 1) 伊藤克彦・今井一郎 (1997) : 赤潮生物研究指針, ラフィド藻, 日本水産資源保護協会, 304-473.
- 2) 横尾一成・三根崇幸・荒巻 裕・川村嘉応 (2003) : ノリ保存株から分離したクローン株の素材評価, 佐有水研報, (21), 105-110.
- 3) 吉川浩二 (1987) : 赤潮 *Heterosigma inlandica* HADA, *Hemientreptia antiqua* HADA がノリ幼芽に与える影響について - I, 南西海区水産研究所研報, (7), 111-122.
- 4) 佐々木和之・宇野史郎 (1988) : アサクサノリとの混合培養における6種の珪藻プランクトン増殖率の比較, Bulletin of Plankton Society of Japan, 35(1), 57-65.
- 5) Alfred R. Loblich III (1975) : A Seawater Medium for Dinoflagellates And The Nutrition of *Cachonina niei*, *J. Phycol.*, (11), 80-86.
- 6) 岩崎英雄 (1967) : 微細藻類の分離と培養, 日本水産資源保護協会, 17-39.
- 7) 今村寿明・斉藤幹彦 (1976) : グッド緩衝剤-新しいpH緩衝剤の開発と発展-. 化学の領域, 南江堂, 79-90.
- 8) D.D.ペリン・B.デンプシー (1981) : 緩衝液の選択と応用-水素イオン・金属イオン (辻啓一訳), 講談社, 61-63.
- 9) Keitaro Kiyosawa (1992) : Toxicities of pH buffer solutions to *Chara internodalcells*, *Jpn. J. Phycol.*, 40, 215-227.
- 10) 須藤俊造 (1961) : アサクサノリの大量培養について, 農産加工技術研究会誌, 8 (1), 52-59.
- 11) 渡辺 競・加藤 盛・阿部和夫・成沢正二・鈴木健三 (1968) : 宮城県下のノリ養殖漁場における白グサレ病の発生機構に関する研究, 宮城県水産試験場研報, (4), 57-64.
- 12) 川村嘉応・鷺尾真佐人・北嶋博卿 (1996) : 室内の傾斜水温条件におけるアマノリの生長, 佐有水研報, (17), 29-31.
- 13) 飯塚昭二 (1986) : 藻類の生態, 植物プランクトンの異常増殖, 内田老鶴圃, 209-249.
- 14) 岩崎英雄 (1979) : 藻類研究法, 赤潮構成鞭毛藻の培養による研究法, 共立出版, 223-240.
- 15) S. Khan, O. Arakawa and Y. Onoue (1996) : Growth Characteristics of a Neurotoxin-Producing Chloromonad *Fibrocapsa japonica* (Raphidophyceae), *Journal of The World Aquaculture Society*, 27(3), 247-253.
- 16) 阿知波英明・岩崎英雄 (1990) : 有毒渦鞭毛藻 *Alexandrium tamarense* の増殖特性, *Jpn. J. Phycol.*, 38(1), 51-59.