総　説

安定同位体利用技術

海洋物質循環の研究における安定同位体トレーサ法の利用

濱　健夫，柳　勝美

Reprinted from
RADIOISOTOPES, Vol.56, No.9
September 2007

Japan Radioisotope Association
http : //www.jrias.or.jp/

RADIOISOTOPES, **56**, 543-551 (2007)

総　説

安定同位体利用技術

海洋物質循環の研究における安定同位体トレーサ法の利用†

濱　健夫，柳　勝美*

筑波大学生命環境科学研究科
305-8572　茨城県つくば市天王台 1-1-1
*九州産業大学工学部
813-8503　福岡県福岡市東区松香台 2-3-1

Key Words：stable isotope, tracer method, biogeochemical cycle, marine environment, carbon-13, nitrogen-15

1. はじめに

表面の約 7 割を海洋により覆われる地球は，「水惑星」として太陽系においても極めて特殊な惑星である。この水により満たされる海洋には多種多様な生物が生活し，その生物の営む種々の代謝により，海洋に存在する諸物質の分布やフラックスが決定されている。海洋中を循環する元素の中で，特に炭素と窒素は有機物を構成する主要な元素として，それらの動態の研究は活発に行われてきている。

海水に多量に溶存する炭酸物質や無機窒素・リンなどの栄養塩は，植物プランクトンの光合成により有機物へと変換され，更にその有機物は食物連鎖を通して，動物プランクトン，魚及びバクテリアなどの従属栄養生物へと移行する。この間，呼吸により有機物の大半は無機化され，炭素は再度溶存態の炭酸物質として，また窒素・リンは共に栄養塩として，再び海水中へと溶存化する。また，有機物の一部は無機化されることなく，海洋表層から海洋の中・深層へと沈降してゆく（図 1）。海洋におけるこのような物質の循環は，大気から海洋への二酸化炭素の吸収などの過程とも関連し，地球環境と大きく関わっている。

海洋における微生物活動量の評価のため，炭素，窒素等の同位体をトレーサとする手法が広く用いられてきている。例えば，物質循環の基幹をなす植物プランクトンによる光合成生産量の測定や，バクテリアによる有機物の分解量の測定などには，放射性炭素同位体(^{14}C)トレーサ法が適用されている。しかしながら，我が国においては，野外における放射性同位体の使用が困難なことから，近年は安定同位体(^{13}C)の利用が一般的となりつつある。一方，窒素に関しては，放射性同位体である^{13}Nの半減期が 10 分程度と短く，実用的ではないため，安定同位体の^{15}Nが比較的古くから用いられてきている。

安定同位体トレーサ法には，検出感度が低いこと，自然に存在する安定同位体が無視できないなど，放射性同位体トレーサ法に比較して劣

† "Applications of Stable Isotopes in Life Sciences". Application of Stable Isotope Tracer Methods to the Study of Biogeochemical Cycle in Marine Environments.
Takeo HAMA and Katsumi YANAGI*: Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba, 1-1-1, Tennodai,Tsukuba-shi, Ibaraki Pref. 305-8572, Japan, *Faculty of Engineering, Kyusyu Sangyo University, 2-3-1, Matsukadai, Higashi-ku, Fukuoka-shi, Fukuoka Pref. 813-8503, Japan.

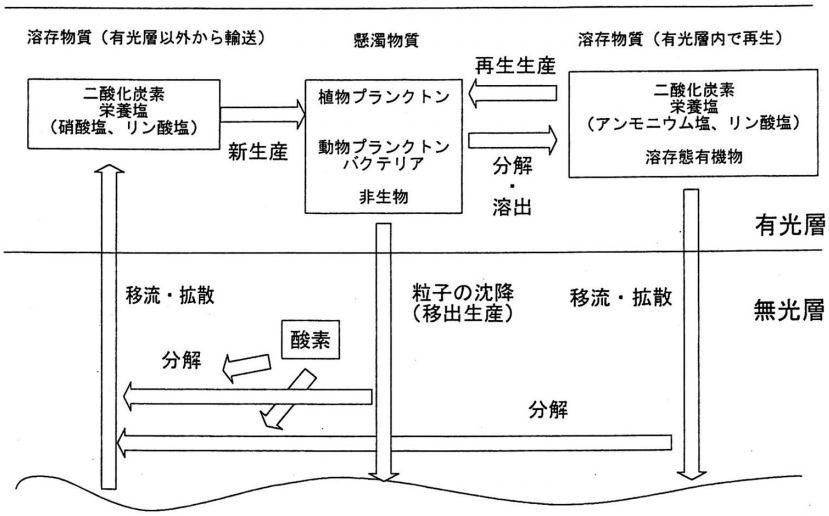

図1　海洋における物質循環の模式図

った点もある。しかし，一方では，種々の分離機器と質量分析計との組み合わせにより，有機分子種ごとの解析が可能になる点など，優れた点も有している。本稿では，海洋の炭素及び窒素循環の研究において用いられている安定同位体トレーサ法について概説する。

2.　炭素循環に関する研究

2･1　光合成生産量の測定

植物プランクトンの光合成による有機物生産は，海洋における有機物の流れの出発点にあたり，海洋の物質循環における最大のステップである。内湾など植物プランクトン現存量の大きい富栄養海域においては，光合成に伴い発生する酸素濃度の変化により，光合成量を測定することが可能である。しかしながら，生産量が少ない場合には，溶存酸素濃度の変化が少ないため，この酸素法による測定は困難となる。放射性同位体(^{14}C)をトレーサとして用いた生産量の測定法は，現在から五十余年を遡る1952年に，デンマークのSteeman Nielsenにより始めて自然植物プランクトン群集に適用された[1]。ほぼ同時期に，我が国においても市村及び西条のグループにより，独自に^{14}Cを用いる手法についての検討が進んでおり，我が国近海及び湖沼の生産量に関する研究も開始された[2),3)]。ちなみに1952年からの20年間で出版された海洋の植物プランクトンの生産量に関する論文の数では，我が国はアメリカ合衆国，旧ソビエト連邦，デンマーク，英国に続いて5番目に位置している[4)]。1970年には^{14}C法を用いてそれまで得られた個々の測定データをもまとめることにより，全海洋の光合成生産量の分布図が提唱されるに至った[5)]。

我が国を除いた諸外国においては，この^{14}C法は現在においても海洋の光合成生産量の基準測定法として用いられており，発表される研究成果の多くは本法を用いたものである。しかしながら我が国においては，野外での^{14}Cの使用が不可能な状況となり，1960年代から1980年代にかけて，海洋・湖沼の一次生産量の測定はほとんど行われなかった。このため，^{14}Cに代わり安定同位体である^{13}Cをトレーサとして用いる^{13}C法の開発が試みられた[6)]。^{13}Cトレーサ法による生産量の測定は，植物プランクトンを含む懸濁態有機炭素(POC)の濃度及び^{13}C atom%，培養瓶中の溶存態無機炭素の^{13}C atom%の情報から，(1)式に従って算出することが可能である[6)]。

表1　四国沖の測点 A13 の深度 10 m 及び 70 m の試水を用いて得られた，^{13}C 法及び ^{14}C 法による光合成生産量の測定結果。培養は疑似現場法により実施した[6]

試料		相対光量子密度	^{14}C 法	^{13}C 法
			（μgC（μg クロロフィル）$^{-1}$　h^{-1}）	
測点 A13	10m	4	2.20	2.17
		20	10.6	10.9
		100	19.6	19.2
	70m	4	3.95	3.82
		20	8.75	8.91
		100	1.30	1.56

$$\text{生産量}\ (\mu\text{gC}\cdot\text{L}^{-1}) = (a_{is} - a_{ns})/(a_{ic} - a_{ns}) \times [\text{POC}] \qquad (1)$$

a_{is}：培養試料 POC の ^{13}C atom%
a_{ns}：自然試料（非培養試料）POC の ^{13}C atom%
a_{ic}：溶存態無機炭素の ^{13}C atom%
［POC］：培養試料 POC の濃度（μgC・L^{-1}）

このうち，a_{is}，a_{ns}，POC 濃度は，元素分析計（EA）を前処理装置として備えた同位体比質量分析計（IRMS）により測定することが多い。また，a_{ic} については，通常は，トレーサ添加後の atom%を実測せずに，海水中の全炭酸濃度と ^{13}C の添加量から計算によって求められている。

高感度で測定が可能な ^{14}C 法に比較して，^{13}C 法は感度が低いため，^{14}C 法よりも多量の試料が必要となる。しかしながら，^{13}C 法においても，生産量が低い外洋域であっても，500 mL 程度の試料量での測定が十分可能であることが確認された。また，^{14}C 法との測定値の比較も精力的に実施され，全体的には両者の測定値は一致する結果が得られている（表1）[6),7)]。これらから，実用的には大きな問題は少なく，我が国において，基準法として広く用いられるようになってきている[8)−10)]。

^{14}C 法を実施する場合，我が国では，実験室内での実施が基本となるため，海中に試料瓶を吊下して培養する現場法と呼ばれる実験は不可能である。実験室内で現場を模して行う方法（疑似現場法）では，深度と共に変化する光量及び波長組成を正確に再現するのは困難である。このため，それぞれの深度における植物プランクトンの光合成量を正確に求めるためには，現場法の実施が最良の方法である。

^{13}C 法の導入により，我が国においても現場法の実施も可能となった。また，現在は ^{14}C 法の利用が一般的な諸外国においても，野外での放射性同位体の使用が制限される方向にある国もある。現在では，我が国のみで使用されている ^{13}C 法であるが，今後は諸外国においてもその利用が広がるものと予想される。

^{14}C トレーサ法が持つ放射能汚染の可能性は，^{13}C トレーサ法には無い。しかしその一方で，^{13}C トレーサ法の実施においては，留意しなければならない点もある。近年，炭素自然同位体比（δ^{13}C）を用いた生態系の解析が急速に進行しつつある[11)]。この自然同位体比を用いた解析では，0.001 ～ 0.01 atom%程度の差（δ^{13}C 値として約 1 ～ 10‰）を用いることが多い。一方，トレーサ実験においては，海水中の全炭酸は通常 10 atom%程度に標識され，また培養後の植物プランクトン細胞は，数 atom%に達することもしばしばである。このため，仮にトレーサ実験試料がごく少量でも自然同位体比測定のための試料に混入した場合には，正確な自

然同位体比の測定は不可能となる。近年の海洋観測において，トレーサ実験による光合成生産量と種々の海洋試料の自然同位体比は，両者とも基本的な測定項目として定着しつつある。船舶等を用いた観測に際しては，両実験系の場所的な隔離や，使用器具等の併用を厳密に避けるなどに十分留意すべきである。

2･2　溶存態有機炭素の生産

植物プランクトンは光合成により生産した有機物の一部を，溶存態有機物として体外に排出することが知られている[12),13)]。これは細胞外生産物と呼ばれ，時によっては無視できない量の有機物が放出される。^{14}C 法の場合，酸性下での曝気によりトレーサとして添加した放射性の溶存態無機炭素を培養液中から除くことにより，培養液中には放射能を含む溶存態有機物のみが残される。この残存する放射能を測定することにより，細胞外に排出された生産物を見積もることが可能である。一方，^{13}C 法では有機物を燃焼した後に生ずる二酸化炭素の質量を，IRMS により測定する必要がある。一般に海水中の溶存態有機炭素の濃度は，1 ～ 5 mgC/L 程度であるため，質量分析計による同位体比の見積もりに要する数十 μgC 量を得るためには，10 ～ 50 mL 程度の海水試料が必要となる。すなわち，培養液の濃縮が必要となってくる。しかしながら，海水試料には多量の無機塩が含まれることから，そのまま濃縮することは不可能である。このため，濃縮前に海塩を除く作業が必要となる。Hama と Yanagi は海水中の無機塩を電気透析により脱塩することにより，試料の濃縮を試みた。更に，濃縮液をガラス繊維濾紙に添加・乾燥することにより，溶存態有機炭素の同位体比を，EA–IRMS により測定する方法を開発した[14)]。ここで得られた結果は，従来 ^{14}C 法で得られた結果とほぼ同様の値であり，細胞外生産物量の測定法としても，^{13}C トレーサ法は十分適用可能であると考えられる。しかしながら，濃縮を必要としない^{14}C 法による測定に対し，濃縮作業が必須となる^{13}C 法による測定は，より多くの労力を必要とする。更に，濃縮前に脱塩が必要な海水試料の場合は，更に多くの時間を要することとなる。このため，細胞外生産量を測定する手法として，^{13}C 法は^{14}C 法に比較して，簡便さの点で劣っていると言わざるを得ない。しかし一方で，細胞外生産物に含まれる有機物組成の解明など，質的な評価を伴う場合には，以下に述べるように，ガスクロマトグラフィーなどと組み合わせることにより，安定同位体トレーサ法の利点を発揮することが可能となる。

2･3　有機分子レベルの解析

植物プランクトン細胞を構成する有機物の組成は，生育する環境の変化により大きく変動することが知られている。珪藻の一種である *Skeletonema costatum* の培養種を用いた実験では，栄養塩の供給状態の違いにより有機物組成を示す指標として用いられる炭素/窒素比（C/N 比）が，5 ～ 30 まで大きく変動することが報告されている[15)]。このような有機物組成の大幅な変動は，高等植物には余り見られず，植物プランクトン特有の現象の一つと考えられる。また，上述のように環境要因により有機物組成が大きく変化することから，有機物組成を用いて，植物プランクトンの成長を制御している環境要因や，ある環境下での植物プランクトンの生理的な状態を推定できる可能性がある。細胞の有機物組成は，光合成により取り込まれた炭素の各有機物への分配様式に依存していると考えることができるため，数時間から数日の時間スケールにおける，炭素の分配様式の研究が実施されてきた。

このような炭素分配様式の研究においても，^{14}C 法が一般的な手法として用いられてきている。この方法では，トレーサ実験により得られた^{14}C を含む植物プランクトン細胞有機物を，クロロホルム–メタノール，TCA などによる抽出を基本としている。これにより，^{14}C を

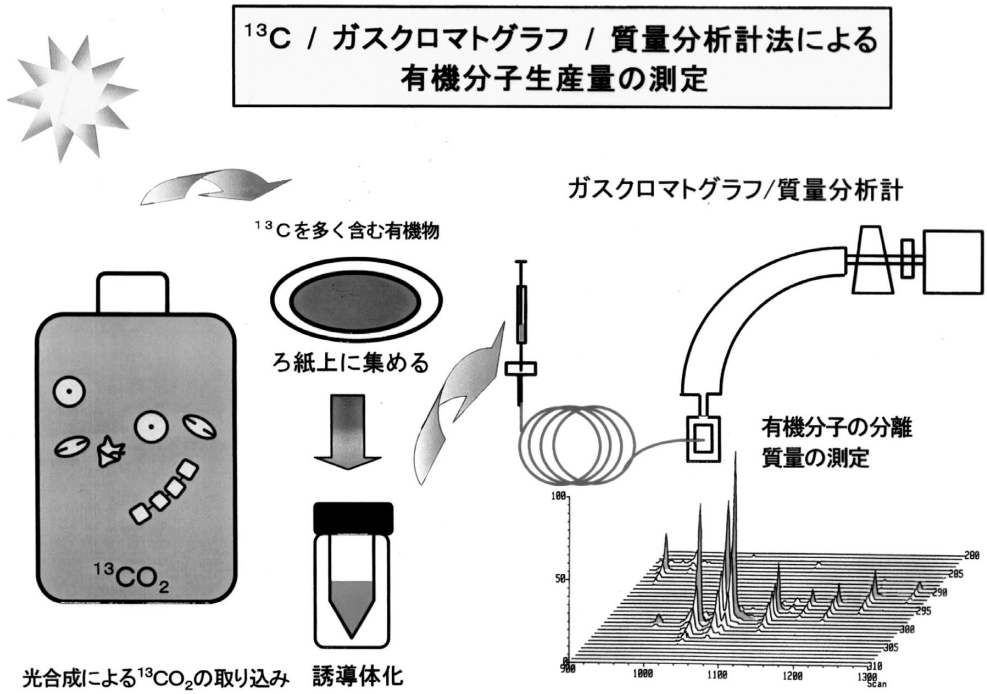

図 2　^{13}C 法とガスクロマトグラフ/質量分析計（GC/MS）を併用した，植物プランクトンの光合成産物の測定

含む有機物を脂質，炭水化物及び蛋白質などの有機物グループに分別することが可能である。この手法を適用することにより，南極海での多量の脂質の生産などが見いだされた[16]。

^{13}C 法を用いても，上述したような有機物グループへの分画は可能である。更に，安定同位体の検出装置として用いられる質量分析計を分離装置（クロマトグラフ）と一体化したシステムを用いることにより，有機物グループレベルより更に詳細な有機分子レベル情報を得ることが可能となる。この手法は液体クロマトグラフ/質量分析計（LC/MS）を分離，検出装置として用いて，生物代謝の研究に初めて適用された[17]。Kouchi は，ガスクロマトグラフ/質量分析計（GC/MS）を用いて，化学イオン化法により得られた質量スペクトルから，光合成産物中の単糖類の^{13}C atom%を算出する方法を提案した[18]。この手法を用いて，植物プランクトンの光合成産物をアミノ酸，単糖レベルで解析することが可能となった（図 2）[19]。

その後の種々の環境下における研究を通し，光合成産物の組成が環境条件の変化により変動することが分子種レベルで明らかになった[20),21]。特に，海洋の亜表層から表層への流れが生ずる湧昇域では，湧昇が生じてからの時間経過の少ない無機窒素をはじめとする栄養塩類が豊富である「若い」湧昇域と，栄養塩が使い尽くされた「老いた」湧昇域では，植物プランクトンにより生産される有機物組成に大きな違いがあることがわかる。「若い」湧昇域では，窒素を含む蛋白質を構成する各種アミノ酸，及び炭水化物を構成する各種単糖類がバランス良く生産されていた。それに対し，栄養塩類が枯渇した「老いた」湧昇域では，アミノ酸の生産量は低く，炭水化物，特に貯蔵性グルカンの構成分であるグルコースが極めて大きい割合で生産され，バランスの崩れた生産が行われていることが明らかとなった[20]。これらは，バランスのとれた生産が植物プランクトンの健全な生理状態を示す指標となること，更に栄養塩供給が不十分にな

った際には，生産される有機物の組成が大きく変化し，健全な成長には結びつかないことを示している。植物プランクトンの光合成と生長との間の関係については，多くの議論が行われてきているが[22]，両者を結びつけるためには元素レベルの情報を用いた量的評価だけでは不十分であり，有機物の組成を含めた質的な評価が必要であると考えられる。

植物プランクトンにより細胞外へ排出される有機物の組成についても，^{13}C/GC/MS 法が適用され，細胞外生産物の炭水化物の解析が行われた[14]。細胞内と合わせた全炭水化物の生産量に対する細胞外生産量の割合を算出することにより，生産された炭水化物の糖類は，多くが細胞内に保有され細胞外へ出される割合は低い糖と，全生産量の半分近くが細胞外へ出される糖の二つのグループに大別することができた。この中で，後者は植物プランクトンの細胞を取り囲み，細胞の微環境の保護や物質の取り込みなどの機能を果たしているとされる Extracellular Polymeric Substance（EPS）[23]を構成する粘性多糖類に含まれる糖であることが示唆される。質的な情報を得ることにより，植物プランクトンから溶存態有機物への炭素フラックスの情報のみではなく，細胞外に排出される有機物の機能の推定などが可能となってきている。

これらの GC/MS を用いた解析は，質量分析において得られた質量スペクトルの同位体ピーク強度の変化を利用している。この方法に加えて，近年開発されたガスクロマトグラフ/燃焼/同位体比質量分析計（GC/C/IRMS）を用いた解析が試みられるようになった[24]。この機器では，ガスクロマトグラフにより分離された有機分子に含まれる炭素が，燃焼装置により二酸化炭素に変えられた後，連続的に IRMS に導入される。IRMS では測定する質量数が限られていることなどから，広質量範囲を走査する MS よりも同位体比の測定を精度高く行うことが可能である。この手法は物質循環におけるバクテリアの寄与を明らかにするために近年適用され，成果を上げつつある。この手法では，分離カラムから溶出する有機物は，全て二酸化炭素に変えられて MS に導入されるため，質量分析の段階では有機分子の構造等に関する情報を得ることができない。このため，目的とする有機分子のピークが他のピークと重なっていないこと，ベースラインに起因する有機物量が少ないこと，などの制約がある。しかしながら，GC/C/IRMS の持つ分析感度・精度の高さを考えると，本機器と安定同位体トレーサ法の併用は，海洋物質循環の解明にも大きな成果を生み出すものと期待される[25]。

3. 窒素循環

3･1 窒素取り込み速度の測定

窒素には生物代謝を解析するのに適した放射性同位体が無いことから，比較的古くから安定同位体である^{15}N が海洋の物質代謝，物質循環の研究に用いられてきた。海水中に存在する溶存態無機窒素化合物としては，アンモニウム塩，亜硝酸塩及び硝酸塩の 3 種類がある。この中で，亜硝酸塩の濃度は通常は低く，植物プランクトンが主として利用しているのはアンモニウム塩と硝酸塩の 2 種類である。Dugdale と Goering は^{15}N で標識されたアンモニウム塩と硝酸塩とを用いて，植物プランクトンによるこれらの無機窒素化合物の取り込み速度の測定法を確立した[26]。この手法を用いることにより，海水中に存在している無機窒素化合物のどちらを好んで植物プランクトンが利用しているかなど，植物プランクトンの窒素代謝に関する重要なパラメーターの測定が可能となった[27),28]。

この^{15}N 法では，^{13}C 法と同様に，EA/MS が用いられる。この機器では，同一試料に含まれる窒素と炭素の同位体比を連続的に測定することが可能である。EA/MS を利用することにより，^{15}N トレーサと^{13}C トレーサとを同時に使用する二重標識法が試みられた[29),30]。炭素取り込み量の測定を^{14}C 法で行う場合は，窒素取り込み量の測定とは異なった実験系を設定せねば

ならない。一方，トレーサとして炭素・窒素共に安定同位体を用いる方法では，同一の実験系で両元素の取り込み量を測定することができる。炭素・窒素両元素の動態を知るためには，優れた方法といえよう。

3･2　溶存態有機窒素の生産

^{13}C 法において言及したように，植物プランクトンの細胞外生産物にも，有機窒素化合物が含まれると考えられる。しかしながら，炭素量の測定に比較して，窒素量の測定例は極めて少ない。その原因として最も大きいのは，トレーサとして添加した^{15}N を含む無機窒素化合物を，培養液から除くことが困難であることがあげられる。この操作を行うことにより，培養液中の^{15}N を含む窒素化合物としては，新たに生産され，細胞外に排出された有機窒素化合物のみとすることが可能となる。有機炭素の測定においては，酸性化した培養液を曝気することにより，溶存態無機炭素化合物を完全に除くことが可能であるのに対し，無機窒素化合物については，このような簡便な手法は無い。これまで報告された例では，トレーサ実験を終えた試料について，陽イオン及び陰イオン交換樹脂を通すことにより，添加したトレーサを除き，溶出液中の^{15}N を含む溶存態有機窒素化合物を回収する方法が用いられている[31]。小澤ら（投稿予定）は，先に述べた電気透析装置による脱塩により，添加した^{15}N–NO_3 や^{15}N–NH_4 が完全に除去されることを確認しており，本法が植物プランクトンによる溶存態有機窒素の生産量測定において，有効であることを確認している[32]。海洋物質循環における溶存有機炭素の研究が，この 10 年程で急速に発展しているのに対し，溶存態有機窒素に関する我々の知識はまだまだ乏しい。今後の溶存態有機窒素の動態の解明に向けて，^{15}N トレーサ法を用いた研究は，大きく貢献するものと考えられる。

3･3　新生産と再生生産

Dugdale と Goering (1967) は^{15}N トレーサ法を紹介した論文において，上述した植物プランクトンの生理学に関する理解に必要な方法を提供したことに加え，新生産と再生生産という，海洋の物質循環における新たなパラメーターについて言及した。この新生産と再生生産とは，海洋の有光層（植物プランクトンの光合成量が呼吸量を上回る層。通常，相対光量子密度が海表面の 1% に相当する深度までをさす）において植物プランクトンが利用する元素が，有光層以深から有光層へ供給されたものか，有光層内で有機物の分解により供給されたものか，により区別される（図 1)。植物プランクトンが利用する主要な元素である炭素及びリンの両者は，無光層から供給される場合と，有光層での分解により供給される（栄養塩の再生）場合とでは，化学形態が同一である。このため，これらの元素を用いた手法では，新生産と再生生産を区別することは不可能である。一方，窒素は有光層において分解により供給される形態はアンモニウム塩であるのに対し，無光層から有光層へと供給される無機窒素の形態は硝酸塩である。これは，亜硝酸から硝酸への硝化をつかさどる硝酸菌の硝化活性が，光により抑制されるため，硝酸の生成が無光層に限られることによる。このため，硝酸塩を用いた生産は，無光層から有光層へ供給された物質を用いた生産と見なすことが可能であり，これが新生産と定義される。一方，アンモニウム塩を用いた生産は，有光層における有機窒素の分解により生じた物質を用いた生産と見なされ，これは再生生産と定義される[26]。

この新生産と再生生産に関する議論は，1970 年代から活発化したセジメントトラップを用いた有機物の鉛直輸送量の測定と相まって，海洋表層と中・深層との物質の移動に関する我々の理解を大きく進めることとなった[33]。植物プランクトンの新生産量が，有機物の有光層から下方への輸送量（移出生産量）とほぼ等しくなる

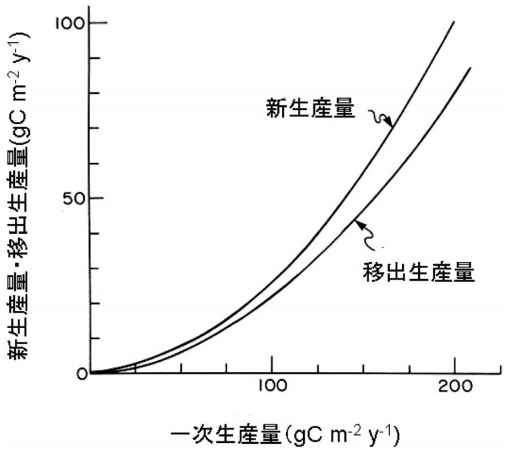

図3 海洋の一次生産量と，新生産量（有光層における植物プランクトンによる硝酸塩の取り込み量から測定）及び移出生産量（セジメントトラップにより得られた有光層から下方への有機炭素輸送量）との関係[33]

ことも，これまでの実験・観測結果から明らかとなってきている（図3）。たかだか数十 μm の微細な植物プランクトンの生理学的現象と，数千 m に及ぶ海洋の鉛直的な物質輸送とが密接に関係していることを，Dugdale と Goering は ^{15}N 法を通して明快に示したと言える。大気二酸化炭素の増加に伴う地球温暖化の解決にあたり，海洋における物質循環過程の解明が求められているが，その解明の基礎となる生物地球化学的な概念を具体的に示した研究として特筆されるべきであろう。

4. おわりに

同位体をトレーサとして用いることにより，海洋に生息する微生物群集の代謝に関する種々のパラメーターが蓄積されてきた。これらの研究により，海洋での微生物の生命活動の理解が大きく進んだと考えられる。その一方で，海洋における物質の循環，更には大気を含めた地球表層での物質循環において，海洋の微生物活動が極めて重要な役割を持つことも明らかになりつつある。温室効果ガスの大気中濃度の増加に起因する地球環境変化を解析する際には，海洋生物が保有する物質量，また生物が動かす物質量を含めて考えなければならない。このような生物地球化学的地球像を明らかにするにあたり，炭素，窒素をはじめとする生元素の同位体の利用は，大きな成果をもたらすものと期待される。

文　献

1) Steeman Nielsen, E., *J. Cons. Int. Explor. Mer.*, **18**, 117-140 (1952)
2) Ichimura, S., *Bot. Mag. Tokyo*, **69**, 219-226 (1956)
3) Saijo, Y. and Ichimura, S., *J. Oceanogr. Soc. Japan*, **20th Anniv. Vol.**, 687-693 (1962)
4) Williams, P. J. LeB., Thomas, D. N. and Reynolds, C. S., Phytoplakton Productivity, Blackwell Science, Oxford (2002)
5) Koblentz-Mishke, O. J., Volkovinsky, V. V. and Kabanova, J. G., Plankton primary production of the world ocean, Scietific Exploration of the South Pacific, National Academy of Science, Washington, DC (1970)
6) Hama, T., Miyazaki, T., Ogawa, Y., Iwakuma, T., Takahashi, M., Otsuki, A. and Ichimura, S., *Mar. Biol.*, **73**, 31-36 (1983)
7) Slawyk, G., Minas, M., Collos, Y., Legendre, L. and Roy, S., *J. Plankton Res.*, **6**, 249-257 (1984)
8) Kanda, J., Saino, T. and Hattori, A., *J. Oceanogr. Soc. Japan*, **41**, 373-380 (1985)
9) Hama, T., *Deep-Sea Res.*, **39** (Suppl. 1), S279-S293 (1992)
10) Shiomoto, A. and Matsumura, S., *J. Oceanogr.*, **48**, 105-115 (1992)
11) 南川雅男, 吉岡崇仁, 生物地球化学, 培風館 (2006)
12) Hellebust, J. A., *Limnol. Oceanogr.*, **10**, 192-206 (1965)
13) 濱　健夫, 濱　順子, 月刊海洋, **10**, 87-92 (1996)
14) Hama, T. and Yanagi, K., *Limnol. Oceanogr.*, **46**, 1945-1955 (2001)
15) Myklestad, S., *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **6**, 199-207 (1977)
16) Smith, A. E. and Morris, I., *Limnol. Oceanogr.*, **25**, 865-872 (1980)
17) Gordon, A. E. and Frigerio, A., *J. Chromatogr.*, **73**, 401-417 (1972)
18) Kouchi, H., *J. Chromatogr.*, **241**, 305-323 (1982)

19) Hama, T., Handa, N. and Hama, J., *Limnol. Oceanogr.*, **32**, 1144-1153 (1987)
20) Hama, T., *Deep-Sea Res.*, **35**, 91-110 (1988)
21) Hama, J. and Handa, N., *Mar. Biol.*, **112**, 175-181 (1992)
22) Platt, T., *Can. Bull. Fish. Aquat. Sci.*, **210** (1981)
23) Hoagland, K. D., Rosowski, J. R., Gretz, M. R. and Roemer, S. C., *J. Phycol.*, **29**, 537-566 (1993)
24) Boschker, H. T. S., Nold, S. C., Wellsbury, P., Bos, D., de Graaf, W., Pel, R., Parkes, R. J. and Cappenberg, T. E., *Nature*, **392**, 801-805 (1998)
25) Boschker, H. T. S. and Middelburg, J. J., *FEMS Microbiology*, **40**, 85-95 (2002)
26) Dugdale, R. C. and Goering, J. J., *Limnol. Oceanogr.*, **12**, 196-206 (1967)
27) Harrison, W. G. and Wood, L. J. E., *Limnol. Oceanogr.*, **33**, 468-475 (1988)
28) Kanda, J., Ziemann, D. A., Conquest, L. D. and Bienfang, P. K., *Estuar. Coast. Shelf Sci.*, **17**, 483-495 (1990)
29) Collos, Y. and Slawyk, G., *J. Phycol.*, **15**, 186-190 (1979)
30) Kanda, J., Saino, T. and Hattori, A., *Limnol. Oceanogr.*, **30**, 987-999 (1985)
31) Bronk, D. A. and Glibert, P. M., *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **96**, 291-299 (1993)
32) 小澤寿子，柳　勝美，北山貴世，濱　健夫（投稿予定）
33) Eppley, R. W. and Peterson, B. J., *Nature*, **282**, 677-680 (1979)