

赤潮鞭毛藻に関する研究—Ⅶ  
1978年伊勢湾に出現した *Prorocentrum*  
*micans*(*levantinoides* Type)\*

岩崎 英雄・岩佐 清和\*\*

三重大学水産学部

Studies on the Red Tide Flagellates—Ⅶ  
*Prorocentrum micans* (*levantinoides* Type) Appeared in Ise Bay, in 1978

Hideo IWASAKI and Kiyokazu IWASA\*\*

Faculty of Fisheries, Mie University

Extensive bloom of *Prorocentrum micans* (*levantinoides* type) occurred in Ise Bay, in June 1978. The bloom spread out almost all over the bay and continued for a month in accompanying an offensive odor and mortality of many marine life. The organism was isolated from the water and obtained in axenic culture by micropipette washings.

*P. micans* was euryhaline and preferred higher salinity compared with other neritic red tide flagellates. The optimal salinity for growth was 31.0 ‰ S. The organism could tolerate a wide range of pH changes, and grew moderately well at pH 7.0–9.0. Nitrate, ammonium salt, urea, glycine, asparagine were utilized as N-sources and both inorganic and organic phosphate were utilized as P-sources. *P. micans* needed only vitamin B<sub>12</sub> for growth. Thiamine accelerated the growth in presence of B<sub>12</sub>. The critical concentration of B<sub>12</sub> for growth was 10 ng/l in presence of thiamine, and 20 ng/l without thiamine. The growth was stimulated with organic substances such as adenine, methylcytosine, thymine, uracil, yeastolate, trypticase, yeast extract, thioton, DNA, and sucrose.

Enrichment of the seawater (Ise Bay) with nitrate and phosphate had relatively little effect, however, with nitrate, phosphate, and vitamin B<sub>12</sub> enhanced the growth, moreover the addition of chelated iron or acid extract (at pH 3.0) of the marine mud greatly increased the growth. It is probable, therefore, that B<sub>12</sub>, organometallic compounds, and organic substances play a significant role in blooming of the organism

\* 本研究は文部省科学研究費補助金，課題番号 00448057，水産庁受託研究費による研究の一部である。

\*\* 現在，愛知県三谷水産高等学校 (Miya Fisheries High School, Aichi Pref.).

in Ise Bay.

**keywords;** *Prorocentrum*, dinoflagellates, nutrition of algae, red tide

本研究は、本邦の沿岸、内湾に赤潮として出現する鞭毛藻を分離、培養して、その生理、生態を明らかにするとともに、無菌培養実験によって特に栄養生理の面から、赤潮の発生機構を解明しようとして試みられているものである。

本紙では、1978年6月に伊勢湾で悪臭を伴う空前の大規模な赤潮を形成した渦鞭毛藻 *Prorocentrum micans* (*levantinoides* type) に関する実験結果について述べる。

この生物は、当初、鳥海により *Prorocentrum levantinoides* と同定されたが、異論もあったので STEIDINGER の同定に従い *Prorocentrum micans* とし、*levantinoides* type として扱う。

#### 材料および方法

1978年6月に伊勢湾で採集した *Prorocentrum micans* (*levantinoides* type) を単一種に分離し、保存ならびに実験用の培養液について検討を行なった。その結果、栄養添加海水では SWEENEY の培養液 (SWEENEY 1954)、人工海水培養液では PROVASOLI の ASP<sub>12</sub>液 (IWASAKI 1961)

Table 1. Composition (w/v) of culture media.

	SWEENEY'S medium	ASP <sub>12</sub> (modified)
Filtered seawater	750 ml	
Redistilled Water	250 ml	1000 ml
NaCl		28 g
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O		7 g
MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O		4 g
KCl		700 mg
Ca (as Cl <sup>-</sup> ; prepared from CaCO <sub>3</sub> +HCl)		400 mg
NaNO <sub>3</sub>		100 mg
KNO <sub>3</sub>	202 mg	
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	35 mg	
K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>		10 mg
Na <sub>2</sub> -glycerophosphate		10 mg
Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> · 9H <sub>2</sub> O		10 mg
Fe (as Fe-EDTA)	1 mg	
Mn (as Mn-EDTA)	75 μg	
P   metals*		10 ml
S2 metals**		10 ml
Vitamin B <sub>12</sub>		0.2 μg
Biotin		1 μg
Thiamine		0.1 mg
"Tris"	1 g	1 g
pH	8.0	8.0

\* One ml of P|| metals contains: EDTA 1 mg, B (as H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>) 0.2 mg, Fe (as Cl<sup>-</sup>) 10 μg, Mn (as Cl<sup>-</sup>) 40 μg, Zn (as Cl<sup>-</sup>) 5 μg, Co (as Cl<sup>-</sup>) 1 μg.

\*\* One ml of S2 metals contains: Br (as Na<sup>+</sup>) 1 mg, Sr (as Cl<sup>-</sup>) 0.2 mg, Rb (as Cl<sup>-</sup>) 20 μg, Li (as Cl<sup>-</sup>) 20 μg, Mo (as Na<sup>+</sup>) 50 μg, I (as K<sup>+</sup>) 1 μg.

が好適であることがわかったので、塩分ならびに pH の耐性試験には SWEENEY の培養液を、栄養要求に関する実験には ASP<sub>12</sub> 液 (Table 1) を基本培養液として使用した。P. micans は、SWEENEY の無菌培養液中で無菌のマイクロピペットによる洗浄を繰り返すことによって無菌にされた。細菌検査には、ST 3 (IWASAKI 1965) の液体と寒天の半固体培地が使用され、検査は各実験ごとに行なわれた。培養実験には 10ml の培養液を含む 10×125mm の PYREX のねじふた付試験管を用い、これに試験栄養物質欠除の上記基本培養液で 10~14 日間予備培養を行なった藻細胞を接種し、20±1°C、約 3500 lux (明暗交替 12 時間) の条件下で培養を行ない、一定期間後に計数して増殖量を求めた。

なお、培養容器などのガラス器具は、完全洗浄後、250°C で 1 時間加熱してから使用された。

### 研究結果

**塩分濃度と増殖** 本実験では、貯蔵海水 (1977 年 8 月尾鷲湾で採水) を 70°C に加熱、ろ過したもの、再蒸留水に栄養物質を SWEENEY の培養液の処方 (Table 1) に従って添加し、両液を一定の割合に混合して、塩分濃度だけが異なる培養液を作製した。これに実験生物を接種して 14 日後の増殖量を調べた。実験結果を Fig. 1 に示す。

Fig. 1 から明らかなように、P. micans は 30.6‰ S (16.94‰ Cl) の塩分濃度で最もよく増殖し、塩分濃度の低下とともに増殖量は次第に減少して 13.5‰ S (7.46‰ Cl) では最高増殖量の約半分となり、3.5‰ S (1.92‰ Cl) では全く増殖しなかった。この実験結果から、P. micans は広塩性であるが比較的高塩分濃度を好み、増殖に好適な塩分濃度範囲は 13.5‰ S (7.5‰ Cl) ~ (34.0)‰ S (18.82‰ Cl) といえることができる。

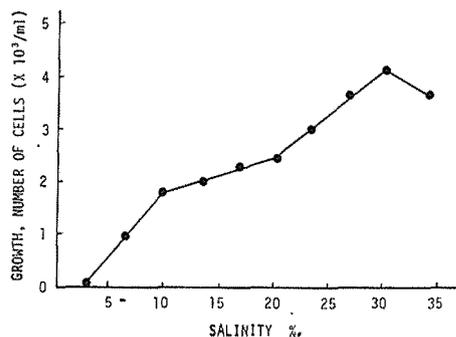


Fig. 1. Growth of *Prorocentrum micans* at the various salinities.

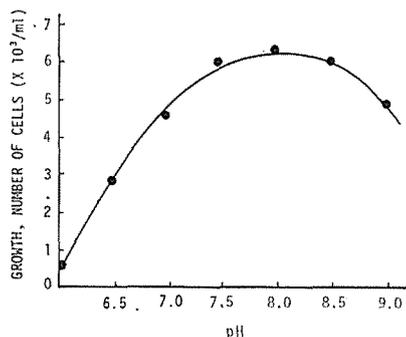


Fig. 2. Effect of pH upon the growth of *Prorocentrum micans*.

**環境水の pH と増殖** 同じ栄養条件下で pH だけが異なる場合の P. micans の増殖量を Fig. 2 に示す。図から明らかなように、P. micans は pH 8.0 で最もよく増殖した。pH 7.5~8.5 の範囲では増殖に大差は見られなかったが、pH 6.7 以下では増殖量は最高値の半分以下となった。このように P. micans は pH の変化に強い耐性を有し、pH 6.7~(9.3) でよく増殖することがわかった。

**窒素、リン源と増殖** 窒素源としては硝酸塩、アンモニウム塩、尿素、グリシン、アスパラギン、およびグルタミン酸の 6 種類の窒素源について実験を行なった。P. micans はグルタミン酸

を除く他の窒素源をいずれも有効に利用した。最大増殖量を示す濃度は、他の環境条件および窒素源の種類によっても異なるが、*P. micans* の窒素源としては、硝酸塩、尿素、アンモニウム塩、グリシンの順によく、高い増殖量を示した。尿素およびアンモニウム塩では、3 mg-N/l 以上の濃度で増殖阻害作用を示し、これ以上の濃度では窒素源としてグリシンを使用した培養で尿素、アンモニウム塩を使用した培養よりも高い増殖を示した。

リン源については、無機態のリン酸塩および有機態のグリセロリン酸塩、アデニル酸、グアニル酸の4種類について実験を行なった。*P. micans* はこれらのリン酸塩をいずれも利用したが、リン源としては無機態のリン酸塩が最もすぐれ、最高の増殖量を与えた。最高の増殖量を示すリンの濃度は、無機態のリン酸塩で低く、有機態のリン酸塩では高い値を示した。

**ビタミン要求** 現在までに研究された赤潮鞭毛藻のほとんどすべてが増殖にビタミン B<sub>12</sub> を必要とし、種類によっては、このほかにチアミンやビオチンを要求することが知られている(IWASAKI 1979)。この知見に基づいて、ここでは上記の3種類のビタミン要求に関する実験が行なわれた。実験の結果を Table 2 に示す。

Table 2. Vitamin requirements of *Prorocentrum micans*.

Vitamins	Growth number of cells/ml (After 20 days)
None added	30
Biotin (1 µg/l)	20
Thiamine (100 µg/l)	50
Vitamin B <sub>12</sub> (0.2 µg/l)	2,280
Vitamin B <sub>12</sub> +biotin	3,030
Vitamin B <sub>12</sub> +thiamine	3,750
Vitamin B <sub>12</sub> +biotin+thiamine	3,750

実験結果によると、*P. micans* はビタミン B<sub>12</sub> が存在する場合にのみ増殖し、チアミン、ビオチンだけの存在では増殖しなかった。しかし、ビタミン B<sub>12</sub> が存在すると、チアミンの添加によって増殖が増大する傾向が認められた。

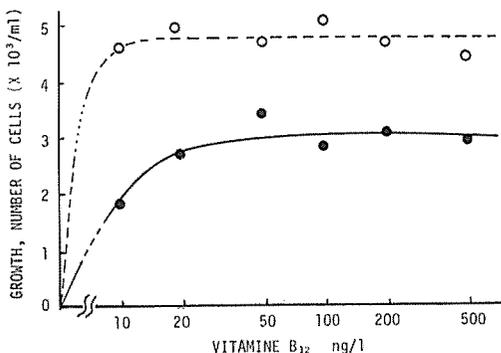


Fig. 3. Growth response of *Prorocentrum micans* to vitamin B<sub>12</sub>. —●—●— in vitamin B<sub>12</sub> only. —○—○— in the presence of thiamine (100 µg/l).

ビタミン B<sub>12</sub> の濃度と *P. micans* の増殖量との関係を Fig. 3 に示す。図から明らかなように、本種の増殖に対する B<sub>12</sub> の臨界濃度は、B<sub>12</sub> 単独の場合には 20 ng/l 附近で、それ以上の濃度ではほぼ一定の増殖量を与えた。一方、チアミンが共存する場合には、B<sub>12</sub> が単独で存在する場合よりも常に高い増殖を示すと同時に、B<sub>12</sub> の臨界濃度は 10 ng/l に低下した。

**微量元素の要求と増殖** *P. micans* は鉄、硼素、マンガン、亜鉛、銅、およびコバルトなどの微量元素が存在するとよく増殖する。また、この生物は鉄、マンガンのいずれ

か一方の存在によって増殖が著しく促進された。その他の微量金属は、培養液の主要構成成分である NaCl,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ,  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  などに混入する微量で十分であるようで、その要求については明らかにすることができなかった。

**有機物と増殖** 研究された赤潮鞭毛藻のすべてが auxotrophy であり、各種の有機物の存在によって増殖が促進されることが知られている (IWASAKI 1979)。ここでは有機物としてプリン類、ピリミジン類、酵母の自己消化物 (yeastolate) ならびに抽出物 (yeast extract), 蛋白分解物 (trypticase), 動物組織の消化分解物 (thiotone), デオキシリボ核酸 (DNA), 蔗糖, 土壌抽出物などの添加実験を行なった。実験の結果を Table 3 に示す。

Table 3. Growth response of *Prorocentrum micans* to organic substances.

Organic substances	mg/l	Growth number of cells/ml (After 20 days)
None added		6,650
Adenine	0.3	8,340
Guanine	0.3~1.0	—*
Xanthine	0.3~1.0	—
Hypoxanthine	0.3~1.0	—
-----		
Cytosine	0.3~1.0	—
Methylcytosine	0.3	—
	1.0	8,650
Thymine	0.3	8,720
	1.0	10,100
Uracil	0.3	9,550
	1.0	8,200
-----		
Yeastolate	20	14,130
	100	18,100
Trypticase	20	9,130
	100	11,200
Yeast extract	10	9,620
	30	10,420
Thiotone	30	13,510
DNA	0.3	10,400
	1.0	10,400
Sucrose	0.3	10,210
	1.0	8,380
Soil extract (land)	(1 ml)	13,060
	(5 ml)	10,800

\* No effect.

この生物はビタミンB<sub>12</sub>、チアミンが存在すると他の有機物がなくともかなりよく増殖するが、特定の有機物の存在によって増殖が促進された。すなわち、adenine, methylcytosine, thymine, uracil などのプリン・ピリミジン類, yeastolate, trypticase, yeast extract, thiotone, DNA,

sucrose および土壌抽出物などの存在によって増殖が刺激された。*P. micans* の特徴は、特に後者の分子量の比較的大きい有機物によって増殖がより高められることである。

***P. micans* の増殖に及ぼす各種栄養物質の相対的効果** 以上の実験結果に基づいて、天然環境における各種栄養物質の *P. micans* の増殖に対する相対的な影響度、換言すると、伊勢湾においては、*P. micans* は外部からどのような栄養物質の添加、もしくは供給によってよく増殖するかについて検討するための実験が行なわれた。本実験には三重県白子沖で採水した海水をグラスファイバーろ紙 (Whatman, GF/F) でろ過したものを基本液として使用し、各種の栄養物質を Table 4 に示すように添加して培養実験を行なった。底泥抽出物は次のような3種類の処理によって準備された。すなわち、1) 50g の海底泥に 100 ml の再蒸溜水を加え、24時間冷暗所に放置後グラスファイバーろ紙でろ過したもの (無処理)、2) 同じく、再蒸溜水とともに1時間高温処理 (121°C, 1気圧) 後ろ過したもの、3) 同じく、再蒸溜水を添加後、弱塩酸で pH を 3.0 に下げ、24時間冷暗所に放置後、弱水酸化ナトリウム液で pH8.0 に調整し、グラスファイバーろ紙でろ過したもの (酸処理) である。実験の結果を Table 4 に示す。

Table 4. Growth of *Prorocentrum micans* in Ise Bay seawater enriched with various nutrients.

				Growth number of cells/ml (After 22 days)
Filtered seawater (Ise Bay)				1,390
Additions				
NaNO <sub>3</sub> (10 mg/l) + Na <sub>2</sub> -glycerophosphate (10 mg/l)				1,800
〃	+	〃	+ Vitamin mix. I <sup>a)</sup> . (10 ml/l)	2,780
〃	+	〃	+ Fe-EDTA (50 µg-Fe/l)	6,150
〃	+	〃	+ Marine mud extract <sup>b)</sup> (5 ml/l)	2,490
〃	+	〃	〃 (10 ml/l)	2,400
〃	+	〃	+ Marine mud extract <sup>c)</sup> (5 ml/l)	2,030
〃	+	〃	+ Marine mud extract <sup>d)</sup> (10 ml/l)	8,100

<sup>a)</sup> One ml of vitamin mix. I contains: vitamin B<sub>12</sub> 20 ng, biotin 100 ng, thiamine 10 µg.

<sup>b), c), d)</sup> show cool water extract, hot water extract, and acid water (pH 3.0) extract respectively.

この結果によると、ろ過海水+N+Pでは無添加のものに比べ僅かに高い増殖 (約1.3倍) を示すに留ったが、ろ過海水+N+P+vitamin mix. Iでの増殖量は約2倍となり、さらに可溶性の鉄、底泥の酸性抽出物によって増殖は著しく促進された。すなわち、無添加の対照に比し、前者では約4.5倍、後者では約5.8倍の増殖量を示した。これらの結果から、伊勢湾では、本種の大増殖は、水温、塩分濃度の好適な組み合わせの下で、ビタミンB<sub>12</sub> と可溶性の鉄 (もしくはマンガン) の供給によって惹き起こされる可能性の強いことが察知できる。

## 考 察

*P. micans* のような光合成鞭毛藻にとって光と温度は重要な環境因子であるが、本研究では設備の都合上その相互関係について明らかにすることができなかった。わが国の内湾では、*P. micans* による赤潮は水温17.5°~29.0°C で観察されており (飯塚・駒木 1974; 藤田ら 1976; 三重県伊勢

湾水試 1978), 培養実験による最適水温は, カリフォルニア沿岸種で 25°C (BARKER 1935), また, オスロー峡湾種では 20°C (BRAARUD 1961) と報告されている。したがって, この生物は 20°C 以上の水温でよく増殖すると考えてよいようである。

塩分濃度と増殖との関係についてみると, 本種の赤潮としての出現時の塩分濃度は, 噴火湾では 25.1~33.7‰ S (飯塚・駒木 1974), 気仙沼湾および伊勢湾では 30.6~33.0‰ S (藤田ら 1976; 三重県伊勢湾水試 1978) となっている。このように本種は, 他の沿岸性鞭毛藻に比し比較的高塩分濃度で bloom をおこし, 本実験による最適塩分濃度 30.6‰ S とよく符合している。

以上のような *P. micans* の生理, 生態的知見から, 本種の増殖は水温 20°~25°C で, 塩分濃度が 30~33‰ S の時期に起こりやすいといえることができる。

MAHONEY and McLAUGHLIN (1977) は, 赤潮の発生と都市下水との関連を検討する目的で *P. micans* を含む 2, 3 の赤潮鞭毛藻の増殖に及ぼす各種有機物の影響について実験を行なっている。その結果によると, *P. micans* は, 実験された 3 種類の無機態窒素, 16 種類の有機物のなかで, 全無機態窒素と尿素を利用したが, 尿素は利用されなかったこと, および 14 種類のアミノ酸のうち 11 種類が利用され, 増殖に対しては  $\text{NO}_3\text{-N}$ ,  $\text{NO}_2\text{-N}$ ,  $\text{NH}_4\text{-N}$ , メチオニン, セリンの順に有効であったと報告している。この結果は本実験結果と一部異なり, 両株間にはアミノ酸に対する選択に差違がみられ, 特に尿素の代謝機能に大きな差がみられる。

また, *P. micans* のリン酸の利用について, MAHONEY and McLAUGHLIN (1977) はリン酸源として 10 種類の有機態リン酸について実験を行ない, riboflavin-5'-phosphate を除く, 他のリン酸はいずれも有効に利用され, 比較的高濃度 (500  $\mu\text{g-P/l}$ ) で特に有効であったとしている。このように, *P. micans* による有機態窒素およびリンの利用は, この生物の大増殖を考える上で留意すべきことと思われる。

本実験では, *P. micans* の増殖に対する窒素, リンの制限濃度については実験を行っていないが, BARKER (1935) の培養実験結果によると, おのおの 10  $\mu\text{g/l}$  以下とされている。三重県伊勢湾水産試験場の調査によると, 1978 年の本種による大規模赤潮の発生直前の無機態全窒素およびリンの濃度は, それぞれ 33~252  $\mu\text{g-N/l}$  (2.3~18  $\mu\text{g}\cdot\text{atom/l}$ ), 1.6~8.1  $\mu\text{g-P/l}$  (0.05~0.26  $\mu\text{g}\cdot\text{atom/l}$ ) で, 予想外に少なかった。また, 伊勢湾海水+N+Pにおける *P. micans* の増殖量は無添加のそれに比べて僅かにまさる (約 1.3 倍) 程度であった。これらの培養実験ならびに調査結果を総合して考えると, *P. micans* の大増殖には高濃度の無機態の N, P を必要としないことがわかる。

*P. micans* の増殖は, プリン, ピリミジンの一部, また, 各種生物体の分解中間産物のあるものによって促進されることが明らかにされた。この促進効果は比較的分子の大きい有機物の方でより顕著にみられた。この事実は, *P. micans* はこれらの有機物を直接栄養源として利用できることを示唆するものである。

KAIN and FOGG (1960) は, *P. micans* の培養で, 適切なキレーターを供給することは生物にとって極めて重要であり, EDTA もかなりよかったが, グリシルグリシンはさらによかったことを報告している。しかし, キレーターの増殖促進作用が毒性の軽減によるのか, それとも微量金属の利用性を高めることによるのか明らかではない。本城 (1974) は, 海底泥の酸性処理物が *Chattonella* sp. (= *Heterosigma* sp.) の増殖を促進させることを見いだしている。本実験では, 伊勢湾底泥の冷水および熱水抽出物の *P. micans* に対する増殖促進効果は顕著ではなかったが, 酸性抽出物の添加によって増殖は著しく (5.8 倍) 促進された。この促進作用について, 本城

はアミンやアミノ酸などの有機物による金属のキレート化を示唆している。また、岡市 (1977) は、海底泥の水抽出物中にチミン、ウラシルなどの存在を認め、酸性抽出物中にもこの可能性が高いことを指摘している。この酸性抽出物中の増殖促進物質の本体については、現在実験検討中であるが、抽出物中の腐植性物質の直接的作用 (栄養源または代謝作用の刺激) とともに、キレート微量金属 (特に Fe, Mn) を考えたい。

次に、この生物の大増殖の原因について考察を加える。前述のように、本種は N, P 源として無機物質ばかりでなく有機物も利用することができ、増殖には高濃度の N, P を必要としないことは明らかである。伊勢湾海水を使用した栄養物質添加実験の結果 (Table 4) では、海水にビタミン B<sub>12</sub> と可溶性の鉄の添加により、または B<sub>12</sub> と底泥の酸性抽出物の添加によって増殖は著しく促進された。これらの結果から、伊勢湾海水では、B<sub>12</sub> と可溶性の Fe (または Mn) の添加もしくは供給によって、栄養的には *P. micans* の大増殖の条件が整備されることになり、ある種の有機物の存在によって増殖が加速されることになる。したがって、伊勢湾では、20°C 以上の期間に、高鹹、底酸素の底層水の浮上、その他によって上記の物質が補給されると、この生物が大増殖する可能性は極めて高いといえることができる。

最後に、本生物種を同定して戴いた Dr. K. STEIDINGER ならびに伊勢湾の海洋観測資料を御提供戴いた三重県伊勢湾水産試験場に深く感謝する。

## 文 献

- BARKEE, H. A., 1935. The culture and physiology of the marine dinoflagellates. *Arch. Mikrobiol.*, 6: 157-181.
- BIRBAARUD, T., 1961. Cultivation of marine organisms as a means of understanding environmental influences on populations. M. SEARS (Ed.), *Oceanography, Amer. Assoc. Adv. Sci.*, Washington D. C., 271-298.
- 藤田則孝・五十嵐輝夫・渡辺誠樹, 1976. 昭和49年気仙沼湾に発生した赤潮 *Prorocentrum micans* について. 宮城県気仙沼水試研報, No. 2: 66-75.
- 本城凡夫, 1974. 博多湾における赤潮発生機構に関する研究一Ⅳ. 赤潮発生期の内湾環境と発生要因. 東海水研研報, No. 79: 77-121.
- 飯塚 篤・駒木 成, 1974. 1973年9月噴火湾の豊浦沿岸で発生した *Prorocentrum* 赤潮について. 北海道水研研報, No. 40: 60-66.
- IWASAKI, H., 1961. The life-cycle of *Porphyra tenera* in vitro. *Biol. Bull.*, 121 (1), 173-189.
- IWASAKI, H., 1965. Nutritional studies of the edible seaweed *Porphyra tenera* I. The influence of different B<sub>12</sub> analogues, plant hormones, purines and pyrimidines on the growth of *Conchocelis*. *Plant. Cell Physiol.*, 6: 325-336.
- IWASAKI, H., 1979. Physiological ecology of red tide flagellates. M. LEVANDOWSKY & S. H. HUTNER (Ed.), *Biochemistry and Physiology of Protozoa Vol. 1.*, Academic Press, New York, London, 357-393.
- KAIN, J. M. and G. E. FOGG, 1960. Studies on the growth of marine phytoplankton III. *Prorocentrum micans* EHRENBERG. *J. Mar. Biol. Assoc. U. K.*, 39: 33-50.
- MAHONEY, J. B. and J. J. A. McLAUGHLIN, 1977. The association of phytoflagellate bloom in lower New York Bay with hypertrophication. *J. exp. mar. Biol. Ecol.*, 28: 53-65.
- 岡市友利, 1977. 底泥の有機物の赤潮鞭毛藻促進作用. 特定研究「瀬戸内海中中部海域における漁場悪化現象の解明」, 昭51., 報告書 32-43.
- SWEENEY, B. M., 1954. *Gymnodinium splendens*, a marine dinoflagellate requiring vitamin B<sub>12</sub>. *Amer. J. Bot.*, 41: 821-824.