

アオウキクサ《*Lemna*》を利用した環境モニタリングの基礎研究 ——アオウキクサによる重金属取り込み——

釘本 完*・那須 裕*

緒 言

Lemna は実験用高等植物として扱いが簡便で手軽に実験に供する事が出来るという利点を有するが、それに加えて様々な環境条件に鋭敏に反応するという特質を併せ持っている。従って環境問題、特にそのモニタリングを指向する実験を行なうに当たっては、最も使い易い生物の一つという事が出来る。

本分担研究者は *Lemna* を水質汚染の指標生物として利用する為の基礎研究を行っており、これまでに各種の水質汚染物質、特に重金属に対する *Lemna* の反応についての考察を行ってきた。*Lemna* は水中に在る多くの有害物質に対し、それが微量であっても反応する事が明らかとなり、特に重金属に鋭敏である事が示された。

50 ml 三角フラスコに重金属の入った液体培地を 25 ml 入れ、そこへ *Lemna* を 1 colony 植えて一週間育成すると混入している重金属の種類・濃度によって、増殖阻害を始めとする様々な現象が見られる。その時、培地の栄養塩濃度、pH、生育温度、他種重金属混在等の生育条件の違いにより、増殖阻害が明確に生じる重金属濃度の異なる事が明らかとなった。これまでの検討では Bonner-Devirian's Medium, Sucrose 1% 添加、pH 6.1、25~30℃ という条件が、低濃度重金属に対しても増殖阻害を生じ得る最良の条件で、ここでは Cd^{++} 0.1 ppm、 Zn^{++} 1 ppm、 Cu^{++} 0.1 ppm、 Mn^{++} 1 ppm、 Cr^{6+} 0.5 ppm、 As^{++} 1 ppm の濃度で、*Lemna* は 50% 前後の増殖阻害を生じる。他種重金属混在により増殖阻害の度合は更に大きくなり、従って、重金属汚染が問題となる汚水の指標に *Lemna* が有用である事が明らかとなった。

次の課題としては、*Lemna* が示すこの様な現象が、どのようなメカニズム、過程を経て示されるのかを明らかにする事が考えられよう。これによって指標生物としての *Lemna* の応用を更に深く幅広いものとする事が可能になると思われる。

又、*Lemna* には、Hillman が述べている様に、指標生物としての応用以外に、特に重金属に対する感受性が大きいという事から、多量の重金属を取り込む能力のある事が考えられ、このことから重金属を含む廃水の効率の高い生物処理法への応用が考えられる。

従って *Lemna* の重金属の取り込み過程を明らかにする

事は今後最も必要とされる課題の一つである。既に瀬戸らは *Lemna gibba* G3 を用いて Cd^{++} の蓄積を検討し、栄養塩類等により吸収量が左右される事を明らかにしている。

本研究は、日本にも広く分布している *L. paucicostata* の一系統である *L. paucicostata* 6746 (本 *Steiracis* はカリフォルニア産) を用いた実験である事、重金属の取り込みと *Lemna* の指標性との関連を明らかにする事、*Lemna* による重金属取り込み能力が、重金属含有廃水の浄化に役立ち得るか否かの検討を行なう事等を特色とするが、ここでは第一に重金属取り込みの速度、量と、それらを左右する要因についての検討を行ない、それを実地に応用する為の方策検討の基礎データを求める事を目的とする。

材料・方法

今回実験に供した *Lemna* は、*Lemna paucicostata* 6746 である。重金属中、特に *Lemna* が低濃度で反応し得るものとして、カドミウムを選定し、カドミウムの *Lemna* への取り込みについての検討を行なった。実験用 *Lemna* は、予め $1/2$ Hutner's Medium (EDTA を 250 $\mu g/l$ 含む) で 10~12 日間培養したものの中から、出来る限り均一な大きさ、型の colony (3-frond colony と呼ぶ処の、大中小三枚の葉状体から成る若い colony) を選び出して用いた。

実験はガラスキャップつき 50 ml 三角フラスコに 25 ml 培地を入れ、*Lemna* を 1 colony 植え込む方法で行なった。従って“結果”の項で述べられている“frond 数”、“Wet Weight”、“ Cd^{++} の総量”等はすべて、50 ml 三角フラスコ 1 個当たりでの数値である。培地は、Bonner-Devirian's Medium に 1% Sucrose を添加し、10 分間 1.2 気圧 120℃ で高圧滅菌したものをを用いた。従って *Lemna* 植え込みはすべて無菌的に行なった。*Lemna* の育成は 25℃ 6000 lux 全日照明の恒温室で行なった。

Lemna 中 Cd^{++} 濃度測定手順は次の通りである。

Sampling した *Lemna* を、蒸留水 → 1% EDTA → 蒸留水の順に 10 分間づつ浸して攪拌洗滌し、水気を切って Wet Weight を計測する。次に HNO_3 を 250 μl 加え、この試料を加熱溶解して、 HNO_3 を蒸発させた後、

* 信州大学医学部

蒸留水を加え、最終的に蒸留水で20-100倍に希釈して、原子吸光分光光度計PERKIN-ELMER4000により濃度測定を行なった。*Lemna*は一回の測定に最低5 colony必要なので、増殖の見られない植え込み後48hr以内での測定等には、一回の測定のために5-10個の三角フラスコを用意し各々から採取した*Lemna*を一緒にして用いた。又、一つの実験区につき4-6回の繰り返しを行なった。

Cd^{++} 試薬として $CdCl_2 \cdot 2\frac{1}{2}H_2O$ 、 Cu^{++} には $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 、 Zn^{++} には $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ を、 Se^{4+} には $Na_2SeO_3 \cdot 5H_2O$ をそれぞれ用いた。濃度はいずれもWet Weight 当たりで表わした。

結 果

I. 一週間育成後の *Lemna* による Cd^{++} 取り込み

1) *Lemna* の増殖

50 mlの三角フラスコ 25 ml培地当たりの一週間目の増殖状況を図1に示す。

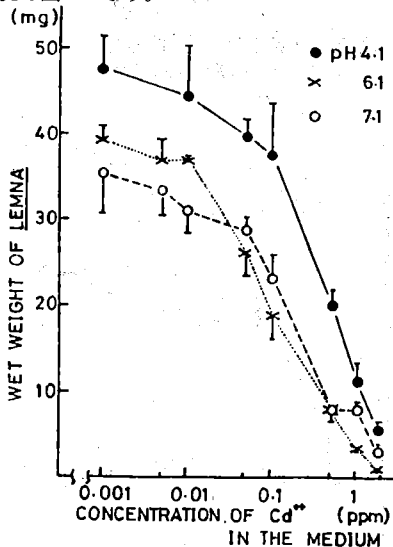


図1. 7日間育成後の *Lemna* 増殖量

培地 pH を 4.1, 6.1, 7.1 とし、 Cd^{++} 濃度を 0.001, 0.005, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0, 2.0 に各々設定した。ここではWet Weight を用いて表示しているが、frond (葉状体) 数によっても、同様な図を描くことが出来る。*Lemna*の重金属による増殖阻害はpHにより著しく影響を受け、 Cu^{++} , Mn^{++} , Cr^{6+} , Zn^{++} においてその傾向は特に大きい。 Cd^{++} はこれらに比してpHの影響は比較的小さいのだが、この場合もpH 4.1とpH 6.1, 7.1における増殖状況の間には明らかな差が見られる。0.1 ppmの Cd^{++} 培地ではpH 4.1において対照(Cd^{++} 0 ppm)の80%の増殖を示すのに、pH 6.1では50%を下廻り、明らかな増殖抑制が見られる。

2) *Lemna* 増殖後の *Lemna* 中 Cd^{++} 濃度

*Lemna*を7日間各種pH, Cd^{++} 濃度の培地で育成後、それぞれの実験区における*Lemna*中の Cd^{++} 濃度を測定した。(図2)。植え込み時の培地 Cd^{++} 濃度の高いもの程、*Lemna*中 Cd^{++} 濃度は大きくなっているが、1 ppm前後で頭打ちとなり下降してゆく。この辺の培地 Cd^{++} 濃度では著しい増殖阻害のみならず枯死を生じている事の結果で、増殖阻害程度の最も著しいpH 6.1区において顕著に示されている。

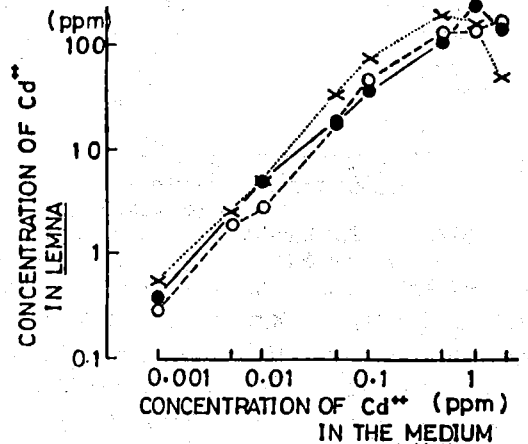


図2. 7日間育成後の *Lemna* 中 Cd^{++} 濃度

3) *Lemna* への Cd^{++} 取り込み量

図1に示された7日間育成後の増殖した*Lemna*のWet Weightに図2の*Lemna*中 Cd^{++} 濃度を掛けるとフラスコ1個当たりの*Lemna*が取り込んだ Cd^{++} の総量が計算される。(図3)。更にフラスコ中の培地25 ml中に

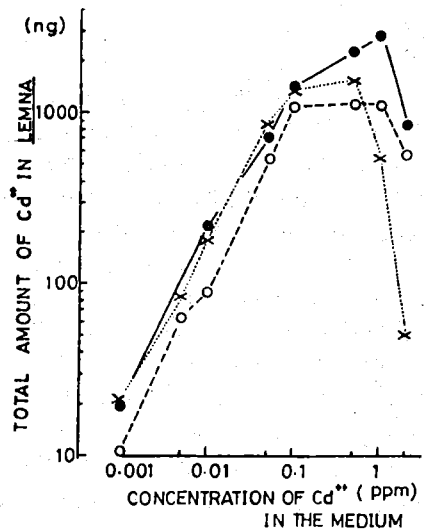


図3. 7日間育成後の *Lemna* による Cd^{++} 取り込み量

含まれている Cd^{++} の内向%が *Lemna* に移行したかを計算した結果を図4に示す。

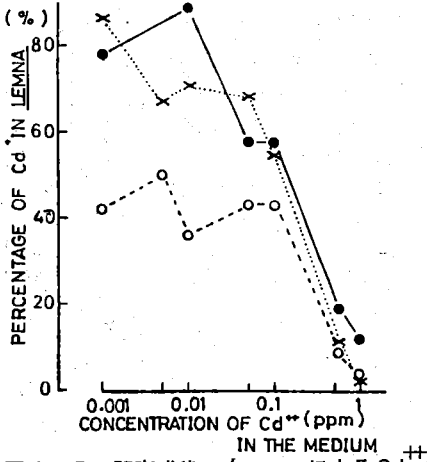


図4. 7日間育成後の *Lemna* による Cd^{++} 取り込み割合

培地濃度が 0.1 ppm までは、*Lemna* により取り込まれる Cd^{++} 量は培地の Cd^{++} 濃度に比例して大きくなる傾向にある。またそれは増殖量の異なる pH 4.1 区において最大である。pH 7.1 において最小になるのは増殖量が最も低い故と思われる。培地 Cd^{++} 濃度が 0.5 ppm を越えると一週間育成後も *Lemna* に取り込まれる Cd^{++} は総量中の 20% 以下となる。培地 Cd^{++} 濃度 0.001 - 0.01 ppm では、pH 4.1 - 6.1 であれば Cd^{++} は 70 - 80% が *Lemna* に取り込まれ、0.1 ppm でも約 50% が *Lemna* に移行する。

以上より、*Lemna* の増殖を著しく阻害しない条件下であれば、一週間で多量の Cd^{++} が *Lemna* によって濃縮される事が示された。

II. *Lemna* による Cd^{++} 取り込みの経日変化

Lemna を Cd^{++} 濃度 0.01, 0.1, 1.0 ppm に設定した B.D. medium で育成する時、その増殖は図5の様なカーブを描く。この各々の phase における *Lemna* 中 Cd^{++} 濃度を測定し、図6に示した。1 ppm 培地では植え込み後 24 時間で培地濃度の 100 倍に *Lemna* 中に濃縮され、0.1 ppm 培地では 200 倍、0.01 ppm では 500 倍にまでなる。24 時間以降は、*Lemna* 増殖と培地中 Cd^{++} 濃度変化との影響で *Lemna* 中 Cd^{++} 濃度は様々に変化する。0.01 ppm 培地では培地中 Cd^{++} 濃度の急激な Cd^{++} 取り込みによる低下と、コンスタントな増殖により、*Lemna* 中 Cd^{++} 濃度は植え込み後 2 - 3 日をピークとして (約 8 ppm) 漸次下降線をたどる。これに対して 1 ppm 培地では増殖量がきわめてわずかで、しかも培地中 Cd^{++} 濃度が非常に高い為に、*Lemna* 中 Cd^{++} 濃度は上昇してはいるが 7 日目では下降も見られ、これは枯死による影響と思われる。

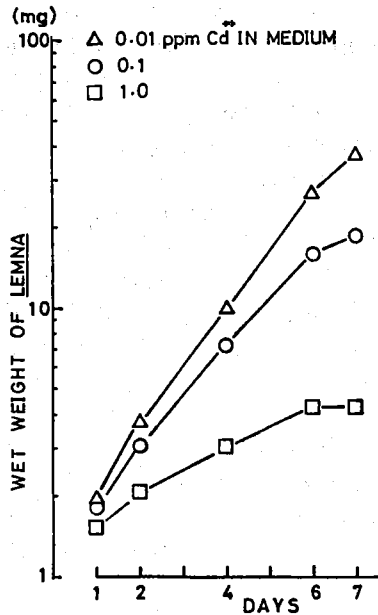


図5. 各種濃度 Cd^{++} 培地での *Lemna* 増殖の経過変化

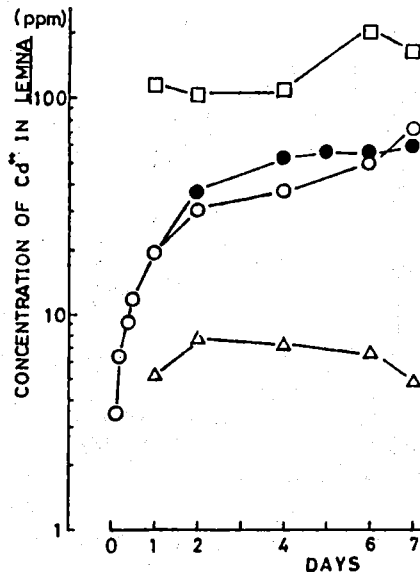


図6. *Lemna* 中 Cd^{++} 濃度の経日変化

0.1 ppm においてはゆるやかに上昇しており、24 時間で 20 ppm、1 週間目では 70 ppm となる。0.1 ppm 培地で 24 時間毎に培地更新を行ない培地中栄養塩類濃度、 Cd^{++} 濃度の変化を回避させると、黒丸で示す様な *Lemna* 中 Cd^{++} 濃度が見られる。又、0.1 ppm 培地では 24 時間内の Cd^{++} 濃度変化をもプロットしている。この図から、

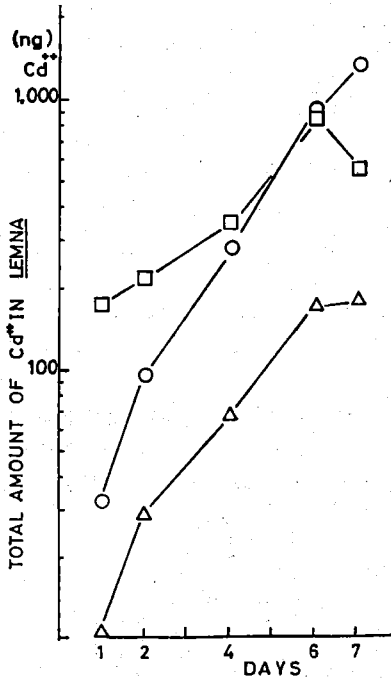


図7. *Lemna* による Cd^{++} 取り込み量の経日変化

Lemna による Cd^{++} の取り込みは 24 時間内に最も急激に行なわれる事が明らかである。図5と図6とから、*Lemna* の Cd^{++} 取り込み総量の経日変化を求めると、図7を描く事が出来る。植え込み後一週間を経て、0.01 ppm 培地では培地中 Cd^{++} の 70% が、0.1 ppm では 50%、1 ppm では 2% が *Lemna* に移行する。植え込み後 24 時間内の培地濃度変化を無視するならば、24 時間目の Cd^{++} 取り込み総量を、各 Cd^{++} 濃度培地における *Lemna* 1 colony の Cd^{++} 取り込み能力と推定する事も可能である。すなわち 0.01 ppm 培地では約 10 ng、0.1 ppm で 30 ng、1 ppm で 170 ng の Cd^{++} を、1 colony の *Lemna* は 24 時間で取り込む事が出来る。

III. 24 時間目の Cd^{++} 取り込み濃度を用いての各種育成条件の比較

1) 24 時間の Cd^{++} 吸収がその後の *Lemna* 増殖に及ぼす影響。

Cd^{++} 濃度 0.1 ppm の B. D. medium (pH 6.1, Sucrose (+) 25 ml に 1 colony の *Lemna* を植えると、24 時間で約 30 ng の Cd^{++} が取り込まれる。この取り込まれた Cd^{++} がその後の *Lemna* 生育・増殖に及ぼす影響に関する検討を行なった。

$1/2$ Hutner's Medium で 10 - 12 日間育成し、植え込み用 colony のそろった処で、 Cd^{++} を 0.1 ppm 含む

B. D. medium (pH 6.1, Sucrose (+) 25 ml に 1 colony ずつ植え込み、一方 Cd^{++} を含まない B. D. medium 25 ml にも 1 colony ずつ植え込んで 25 °C, 6000 lux 全日照明下で 24 時間育成した。(pre-culture)

次に pre-culture した Cd^{++} (+) *Lemna* と Cd^{++} (-) *Lemna* とを各種培地に植え込み 6 日間育成し、増殖状況を調べた。図8は、pre-culture した *Lemna* を各種濃度の Cd^{++} 培地に植え込んだ結果である。左図は、frond 数、右図は Wet Weight で増殖度の比較を行なっている。

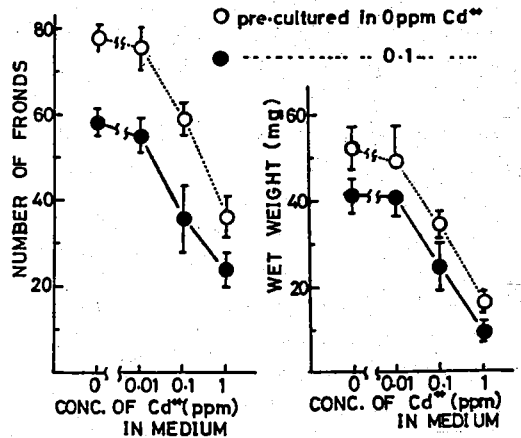


図8. 24 hr、 Cd^{++} 取り込みの影響 (1)

Cd^{++} 培地で 24 時間 pre-culture した *Lemna* の増殖は Cd^{++} (-) 培地で pre-culture したものに比べ明らかに増殖度が低い。殊に frond 数比較に於ては、 Cd^{++} (+) pre-culture の後 Cd^{++} 0 ppm 培地で育成した実験区と Cd^{++} (-) pre-culture の後 Cd^{++} 0.1 ppm 培地で育成した区とが、ほぼ等しい数の増殖をしている事が注目される。但し同じ実験区同志を Wet Weight で比較すると Cd^{++} (-) pre-culture → Cd^{++} 0.1 ppm の区の方が増殖度は低い。

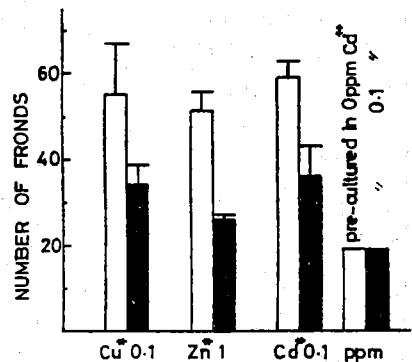


図9. 24 hr、 Cd^{++} 取り込みの影響 (2)

次にCd⁺⁺(+) pre-cultureの影響が他の重金属含有培地に植えた場合どのように現れるかを図9に示した。ここでも明らかにCd⁺⁺(+) pre-cultureによる増殖抑制が見られる。

従って24時間の*Lemna*による30 ngのCd⁺⁺取り込みはその後少くとも6日間までは増殖に影響を及ぼしている事が明らかである。

2) 培地のpHがCd⁺⁺取り込みにもたらす効果

pHが*Lemna*の重金属感受性に大きな影響をもたらす事はI-1)で述べた。pH値が高い程重金属による増殖阻害度が大きくなる理由として、重金属取り込み速度の違い、又は重金属の*Lemna*体内での作用の違いのいずれかが考えられる。

各種pHに設定したCd⁺⁺ 0.1 ppm培地で24時間後の*Lemna*中Cd⁺⁺濃度を比較し、図10を得た。pH 4.1ではpH 6.1の1/2以下の濃度でしかCd⁺⁺を取り込んでいない。pH値が高い程、24時間目のCd⁺⁺取り込み濃度が大きくなる結果が示されており、Cd⁺⁺の急激な取り込みが*Lemna*のその後の増殖を抑制している事を示唆している。

図10. 培地pHと*Lemna*中Cd⁺⁺濃度

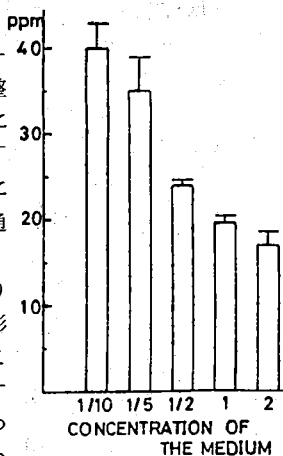


図11. 栄養塩濃度と*Lemna*中Cd⁺⁺濃度

3) 培地栄養塩濃度の効果

培地栄養塩類の組成と濃度も重金属感受性に関連を持つ。ここではB. D. mediumの全体としての濃度を1/10, 1/5, 1/2, ppm, 1, 2倍に各々設定し、Sucrose 1%添加しpH 6.1に調整しCd⁺⁺ 0.1 ppmとした培地に*Lemna*を植え、24時間後のCd⁺⁺濃度を調べた。結果を図11に示す。培地濃度1/10に於ては通常培地の約2倍の濃度にCd⁺⁺を取り込んでいる。Cd⁺⁺の取り込み速度が培地栄養塩濃度の影響を受ける事を示しており、これは又、*Lemna*のCd⁺⁺に対する感受性を左右する条件の一つである事の裏づけともなっている。

4) 他種重金属の混在

二種の重金属が培地中に混在する時、一種のみの場合よりも大きな増殖阻害が示される。一週間目のCd⁺⁺取り込み濃度を、Cd⁺⁺ 0.1 ppm培地に、Cu⁺⁺ 0.1 ppm, Zn⁺⁺ 1 ppm, Se⁴⁺ 2 ppm 各々混在させた場合に比較

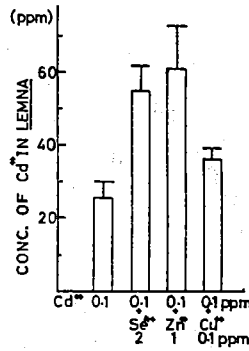


図12. 他種重金属混在による*Lemna*中Cd⁺⁺濃度の変化(7日後)

すると図12のようになる。この時のWet Weightすなわち一週間目の増殖量を比較したのが図13である。三角フラスコ一個当たりの*Lemna*の取り込んだCd⁺⁺総量は三角フラスコ全体でのCd⁺⁺量の何%に当たるかで比較したのが、図14である。他種重金属が混在すると*Lemna*が一週間で取り込むCd⁺⁺総量は減少する。

この条件で24時間後のCd⁺⁺濃度を測定した結果を図15に示す。他種重金属の種類・濃度により差はあるが、ここに挙げた濃度でのSe⁴⁺, Cu⁺⁺, Zn⁺⁺は、いずれも*Lemna*のCd⁺⁺取り込みを抑制する効果を持つ事が明らかとなった。

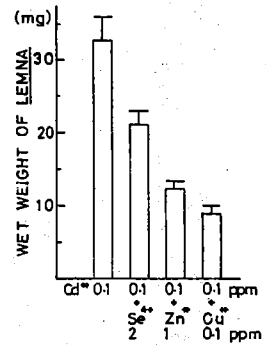


図13. 他種重金属混在による増殖量変化(7日後)

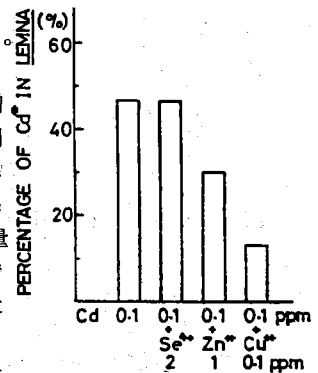


図14. 他種重金属混在によるCd⁺⁺取り込み割合の変化(7日後)

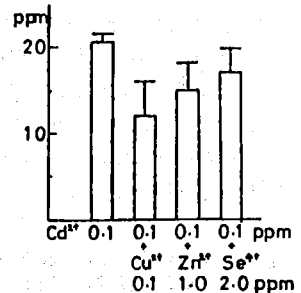


図15. 他種重金属混在によるCd⁺⁺取り込み濃度の変化(24 hr後)

VI 短期間での*Lemna*によるCd⁺⁺除去の予備実験

IIにおいて0.1 ppm培地で1 colonyの*Lemna*が24時間で取り込むCd⁺⁺量は30 ngと計算できる事を示した。0.1 ppm Cd⁺⁺培地25 mlにはCd⁺⁺が2,500 ng含まれている。そこで多数のcolonyを植え込む事により、大部分の培地中Cd⁺⁺を、24時間内に*Lemna*により除去する事

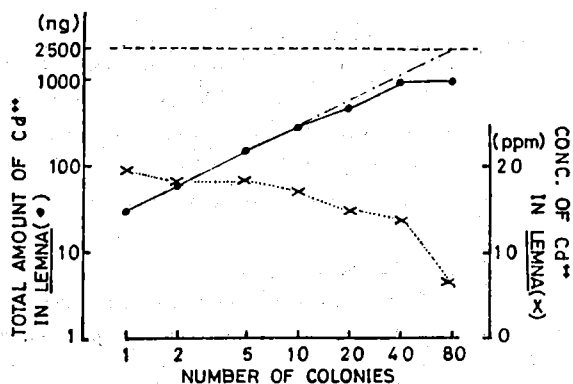


図 16. 植え込み colony 数による Cd⁺⁺ 取り込み量、取り込み濃度の変化 (24 hr 後)

も可能との想定の下に、25 ml 中に植え込む colony 数を増して、Cd⁺⁺ 取り込み効率の変化を検討した。

25 ml 培地に *Lemna* colony を 1, 2, 5, 10, 20, 40, 80 個 植え込み、24 時間後の *Lemna* 中 Cd⁺⁺ 濃度と、*Lemna* に取り込まれた Cd⁺⁺ 総量とを描いたのが図 16 である。80 colony 植え込みと、単純計算すれば 80 × 30 ng = 2,400 ng の Cd⁺⁺ が取り込まれる筈である。結果は、植え込み colony 数が増すに従い *Lemna* 中 Cd⁺⁺ 濃度は漸次低下し、特に 40 → 80 colony での変化が著しく、80 colony では 1 colony の 35% にまで低下している。当然、*Lemna* により取り込まれる Cd⁺⁺ 総量は colony 増に従って期待値を下廻る様になり、殆んどの培地中 Cd⁺⁺ が *Lemna* に取り込まれる計算となる 80 colony 植え込み培地では、35% の Cd⁺⁺ が取り込まれるに止った。これは 40 colony 植え込みの場合と殆んど同じ数値である。

Lemna により短期間で Cd⁺⁺ を取り込ませる為には、培地中の Cd⁺⁺ 及び栄養塩濃度、培地量、培地表面積や更に他の生育条件をも考え併せて、最も効率の良い(多量の Cd⁺⁺ を取り込む事の出来る) colony 数が考えられる筈で、更に検討を進める事によりその様な数値も設定可能と考えられる。

考 察

環境問題を、人間と生物と環境の三要素の平衡関係として考える時、従来ややもするといずれかの要素に重点を置き過ぎ、他の側面がなおざりにされるきらいがあった。今日必要なのは、三要素を総合的かつ動的に把握し問題提起・問題解決を行なう姿勢であろう。

一方、個々の面での基礎データ積み重ねを、環境科学の如き境界領域に関係のないもの、既存の専門分野におけるワンパターンもしくは学問的興味本位のデータ集積に過ぎぬものとして無視する事も望ましい方向とは思わ

れない。生物指標化等の研究に於て生物を利用してその実際化を試みる側と、生物そのものを研究する側との連携不十分の為、十分な学問的基礎を持たぬままに企画進行がなされ、その結果中途半端のままで見捨てられ省られずにある事例も少くない。

あらゆる基礎的な専門分野の研究に於て、環境問題、人間生態系への還元・応用の指向を念頭に持つ方向性を有する事が必要で、更にそれらをダイナミックに統合する事の可能な研究体制の在り方が望まれる。

Lemna に関する研究は、Hillman によって多方面での応用が考えられており、様々な研究分野を結ぶ要の一つになり得るものと思われる。

前述の如く、瀬戸らは *L. gibba* G3 を用いてカドミウムの吸収実験を行なっており、岸川らは富栄養化の判定に *Lemna* を用いる試みを発表している。更に水質指標・水質改善に *Lemna* を初めとする浮漂植物を利用する試みは増加の一途をたどっている。食糧問題に浮漂植物を取り込む試みも農林省により開始されている。

本研究もこれ等の一端を荷うものとして、植物生理学の基礎を重視しつつ、各方面への応用を考慮した継続研究を行なっている。

今回は重金属中カドミウムのみを取り上げて検討を行なった。他種重金属に関する考察が更に継続して行なわれねばならないが、ここで明らかになった事は他の重金属に関しても応用可能であり、又重金属以外の物質について考慮する際の目安にもなると思われる。

第一に、*Lemna* が指標生物として有望であるのは比較的低濃度の汚染物質に対し鋭敏な反応を示す——すなわち短期間で増殖阻害等の現象となって現れる——事によるものであるが、これはその汚染物質の急激な取り込みによるものである事が推察された。カドミウムの場合、24 時間で培地濃度の 100 - 500 倍に濃縮して取り込み、しかも 24 時間内の取り込みの効果がかなり持続する事も示された。どの程度の量、或いは濃度の取り込みが、*Lemna* のその後の生育・増殖に影響を与えるかは、今後の検討に待たねばならないが、現在までの段階では、20 ppm の *Lemna* 中濃度で、確実に増殖阻害を生じている事は明らかである。しかし、増殖阻害、枯死と *Lemna* 中カドミウム濃度との間には複雑な因子のからみ合いが有ると想像され、更に詳細な実験を行なう必要がある。

Lemna が早期に多量の重金属を取り込む事が明らかになった事により、より多くの重金属をより早く取り込ませ得る様な条件の検索が容易になった。今回はこれまでの検討で *Lemna* の重金属指標性を左右する要因である事が明らかになっている pH、培地栄養塩濃度について検討し、指標性を高くする条件(高 pH, 低栄養塩濃度)

程, 24時間での取り込み量が大きい事を示した。光条件, 温度条件も感受性に影響を与える要因と思われ, これ等についての考察も今後行なわねばならない。

一方, 他種重金属混在によって, カドミウム取り込みは抑えられる傾向があり, しかも一週間育成時の増殖量が一種のみの場合より低下する事が明らかであるので, ここで作用するのはカドミウム取り込み量のみでなく, もう一種の重金属との複雑な競合作用を考慮すべきと思われる。

第二に, *Lemna* の重金属取り込み能力は, 指標生物として以外の応用にも可能性を持つ事が示された。

0.01 ppm カドミウム培地で一週間育成増殖させた *Lemna* は, 培地カドミウムの70%を, 0.1 ppm培地では50%を, 体内に濃縮蓄積する。又植え込み後24時間でも, 植え込み colony 数を40個にすると, 0.1 ppmカドミウム培地のカドミウムの30%が *Lemna* 側に移行する。より効率の良いカドミウムの *Lemna* による取り込み条件の検討, 除去方法の考察によって, 実地の利用の為の具体的方策も明確になるものと考えられる。

参 考 文 献

- Hillman, W. S. : Experimental control of flowering in *Lemna*.
I. General methods of medium composition in *L. perpusilla* 6746.
Amer. Jour. Bot. 46, 489 (1959a)
- Hillman, W. S. : Experimental control of flowering in *Lemna*.
II. Some effects of medium composition, chelating agents, and high temperature on flowering in *L. perpusilla* 6746.
Amer. Jour. Bot. 46, 489 (1959b)
- Hillman, W. S. : The Lemnaceae, or duck weeds. A review of the descriptive and experimental literature.
Bot. Rev. 27, 221 (1961).
- Hillman, W. S. : *Lemna perpusilla* Torr., strain 6746. In : The Induction of flowering. Edited by L. T. Evans, p : 186 - 204. Macmillan of Australia, Melbourne, (1969).
- Hillman, W. S. : Biological rhythms and physiological timing.
Ann. Rev. Plant Physiol. 27, 159 (1976).
- Nasu, Y. and M. Kugimoto
: *Lemna* (Duckweed) as an indicator of water pollution. I. The sensitivity of *Lemna paucicostata* to heavy metals. Archives of Environmental Contamination and Toxicology (in print)
- Takimoto, A. and O. Tanaka
: Effects of some SH-inhibitors and EDTA on flowering in *Lemna perpusilla* 6746.
Plant Cell Physiol. 14, 1133 (1973)
- 生嶋 功 : 生物指標としての水草
環境と生物指標 2 90, 共立出版 (1975)
- 岸川昭夫・徳永隆司 : アオウキクサによる淡水域富栄養化の判定. 第15回日本水処理生物学会講演要旨集 (1978)
- 岸川昭夫・徳永隆司・村田敦子 : アオウキクサによる淡水域富栄養化の判定. 第7回環境保全・公害防止研究発表会講演集 (1978)
- 佐藤治雄 : レムナ・テスト. 図説 環境汚染と指標植物 22. (1979)
- 瀬戸昌之・高橋義明・中島忠広・田崎忠良
: カドミウムによる *Lemna gibba* の黄化枯死と栄養塩類の濃度との関係
陸水雑 40 : 61 - 65. (1979)
- 達山和紀・江川 宏・山本広基・中村美弥子
: ホテイアオイによる重金属の収着について
——収着に影響を及ぼす二・三の要因——
雑草研究 24 : 260 - 263 (1979)
- 釘本 完・那須 裕 : アオウキクサ (*Lemna*) を利用した環境モニタリングの基礎研究——水中重金属とアオウキクサの増殖——
昭和54年度特定研究・信州の自然環境モニタリングと環境科学の総合化に関する研究 (1980)