総説

Jpn. J. Toxicol. Environ. Health
衛生化学 (1994)
40 (6) 479-485

—Reviews—

環境修復における光合成微生物の利用
—微細藻類による重金属の除去を中心に—

永瀬裕康, DUANGRAT INTHORN, 宮本和久
大阪大学薬学部環境生物薬学専攻

The Use of Photosynthetic Microorganisms in Bioremediation

HIROYASU NAGASE, DUANGRAT INTHORN and KAZUHISA MIYAMOTO
*Faculty of Pharmaceutical Sciences, Osaka University, 1-6 Yamadaoka,
Suita, Osaka 565, Japan*

The microorganisms play an important role in selfpurification of water and soil environment as decomposers in the ecosystem. Microbial technologies, such as a activated sludge or oxidation pond processes, have been extensively applied to the treatment of industrial and domestic sewages to break down organic wastes. Another type of treatment is based on their ability to remove specific substances such as phosphorus, nitrates and heavy metals. The environmental pollution by toxic metals, especially Pb, Hg, Cd, is a potential hazard to the health and welfare of mankind. Many people in Japan suffered from diseases caused by pollution of heavy metals, such as ache-ache disease and Minamata disease. We feel misgivings about the similar environmental pollution in the developing countries, for the rapidly growing industrial operations would release heavy metals and those metals even at very low concentrations would be concentrated biologically through natural food chains.

Microalgae can concentrate metals and transform them into less hazardous forms, and the use of microalgal biomass would offer a potential alternative to conventional methods for detoxification and for recovery of toxic or valuable metals. This review summarizes an information on physiological relations between heavy metals and microorganisms, especially microalgae, and presents some applications of algal biotechnology that has been developed to use microalgal biomass for bioremediation of heavy metals.

Keywords — bioremediation ; heavy metal ; microalga ; bioreactor ; water pollution

1. はじめに

細菌や菌類さらに藻類や原生動物まで含めた微生物は、生態系における分解者として互いに役割を分担しつつ、水及び土壌環境の自浄作用 (selfpurification) の推進役を務めてきた。このような微生物の優れた機能を積極的に利用した技術が、活性汚泥法や酸化池法などの水処理技術として確立されている。近年、産業の急速な発展に伴って、合成高分子、農薬、洗剤など、さまざまな化学物質が人為的に環境に負荷されるようになり、これら有害化学物質の分

解までも微生物に負わされるようになっている。さらに、ヒトの健康に重篤な障害を与える “big three” と称される重金属 (Pb, Hg, Cd) の汚染が世界的に広がっている。金属精錬工場、化学工場、石炭焚発電所、廃棄物処理場などの固定発生源や自動車などの移動発生源から、環境中に放出された重金属は、水や土壌の生態系に蓄積されると、広範囲の生物種の生命を損なう結果になる。わが国では、イタイイタイ病や水俣病に代表される、重金属が原因である深刻な公害を経験したが、経済成長の著しい開発途

上国において、わが国の悲劇が繰り返される懸念がある。

多くの金属は、原核、真核を問わず、生物の生育に必須である。しかし、生物学的な意義が見出されず、ときには極めて低濃度でも非常に有毒な水銀やカドミウムなどの重金属も存在する。本稿では、環境中における重金属と微生物、特に微細藻類との生理学的な関係について解説する。これらの重金属は、環境中に微量存在する場合でも、食物連鎖によって魚介や牛乳中に濃縮され、われわれの健康に深刻な障害をもたらす危険性がある。そこで、微細藻類の機能を利用して、環境に放出された重金属を除去・再資源化する新しい技術について、最近の研究動向を紹介する。

2. 重金属毒性の生理・生化学

2.1 重金属の毒性及び耐性 重金属が生物に対して毒性を持つ主な理由の一つは、吸収された重金属がタンパク質、核酸、糖類などの官能基とキレート結合し、それらを変性させたり機能を変化させるためと考えられる。金属の生物に対する毒性の大きさが電気陰性度やキレート結合の安定度の大きさとほぼ一致するという報告があり、第4周期の遷移元素の中では銅が最もキレート結合の安定性が高く、生物に対する毒性も最も強い。¹⁾

重金属に対する微生物の耐性は、細菌について最もよく調べられている。抗生物質の使用量の増加とともに薬剤耐性菌が増えていることはよく知られているが、細菌の薬剤耐性のほとんどはプラスミドによって支配されている。そして、水銀、カドミウム、ヒ素といった重金属に対しても、プラスミドによる耐性の獲得が報告されている。河川由来の大腸菌に、重金属耐性の株が多いという報告があり、環境汚染がこれらの重金属耐性菌の selection factor の一つになっていると考えられる。重金属耐性と無毒化に関与する多くの酵素が見つかっており、遺伝子レベルの研究も盛んに行われている。²⁾

2.2 フィトケラチンとメタロチオネイン様物質 細菌類については、このようにプラスミドによる耐性機構が遺伝子レベルで明らかになってきているが、藻類を含めた植物では、重金属を無毒化する別の機構が働いている。その代表例として、細胞内で重金属イオンを安定で毒性の低いキレートイオンに変化させる物質の生成誘導がある。キレート化合物を形成すると、遊離イオンで存在するよりも重金属イオンの毒性は一般に低下すると考えられる。

動物では、亜鉛、銅、カドミウムのような金属を

投与することにより、メタロチオネインが誘導生成され、重金属の解毒が行われている。³⁾ 高等植物、藻類、菌類などにおいても、様々な重金属によって金属結合タンパク質が誘導生成され、最初は動物のメタロチオネインに似たものであると考えられていた。しかし後の研究において、これらのタンパク質の一般構造は $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$, $n=3-7$ であることが明らかになり、フィトケラチンと命名された。⁴⁾ また、カドミウムによって酵母に誘導される $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$, $n=2, 3$ のペプチドは、キャディスチンと命名されている。⁵⁾ これらのタンパク質は、システインのSH基が金属に配位結合することにより、重金属の解毒に関与している。フィトケラチンに関しては多くの研究があり、総説にもまとめられている。⁶⁾

藻類におけるメタロチオネイン様のタンパク質の例としては、次のような報告がある。McLean らは、藍藻の *Anacystis nidulans* にカドミウムと結合する物質が存在することを初めて見いだした。⁷⁾ このような金属結合タンパクは、その後他の藻類、例えば、*Chlorella ellipsoidea*,⁸⁾ *C. pyrenoidosa*,⁹⁾ *Dunaliella bioculata*,¹⁰⁾ *Euglena gracilis*,¹¹⁾ *Synechococcus* sp.¹²⁾ においても報告されている。それらのタンパク質の分子量は8000—10000以内であり、多量のシステイン、グルタミン酸、グリシンを含んでいる。Gekeler らは、多くの種類の藻類にフィトケラチンが存在すると報告している。¹³⁾ しかし藻類においては、このようなタンパク質の遺伝子的研究は、まだあまり進んでいない。

3. 重金属の生物学的除去の基礎

3.1 水溶液中での金属の化学 水溶液中での金属の状態を知ることは、重金属の処理を考える上で重要である。水溶液中の金属は、遊離イオンの状態、配位子によって囲まれた状態、固体表面に吸着した状態、沈殿状態に分類される。これらの状態によって、重金属の毒性をコントロールすることが可能となる。まず、水溶液中での金属の安定性であるが、金属と遊離イオンとは熱力学的平衡にあり、金属濃度、酸化還元電位、pHによって、異なった形態で安定な状態にある。しかし、水溶液中の金属は遊離イオンとして存在しているだけではなく、配位子と呼ばれる他のイオンと相互作用することにより、錯体を形成している場合が多い。金属と配位子との関係は、pHや酸化還元電位などに依存する。一般に、pHが低いほど遊離イオンは安定である。逆にpHが高いと水酸化物がより安定となり、溶解度が

低いため沈殿となる。pH を上げて水酸化物として重金属を沈殿させる方法は、溶液中の重金属を取り除く一般的な方法である。pH を調節することにより、特定の金属を選択的に沈殿させることも可能である。イオン交換や石灰沈殿などの工業技術は、重金属のこのような性質を利用したもので、従来から重金属を除去するために用いられてきた。これらは有効な方法であるが、低い濃度まで重金属を減少させようとするとき非常に高価である。環境に受容可能なレベルまで、手ごろなコストで重金属濃度を減少させることのできる新しい技術が必要とされている。生物的除去はこの目標の達成に大いに貢献する可能性を持っている。

また、重金属の生物的吸着特性も、溶液の状態に依存するところが多い。pH は、微生物による金属イオンの取り込みにおいて、最も重要な因子であり、水素イオン濃度が高いと重金属の吸着が妨害されることが報告されている。^{14,15)} また、pH を上げることによって、藻類バイオマスに吸着させたカドミウムを脱離回収することも可能である。¹⁶⁾

3.2 取り込み機構 金属の取り込みは、一般に異なる2つの段階で起こると考えられている。^{16,17)} 最初の段階は細胞表面での吸着やイオン交換で、非常に速い金属の取り込みが起こる。それに続く2番目の段階は細胞がエネルギーを必要とする能動的な物質代謝に関係し、ゆっくりと起こる。

最初の段階は生物吸着 (biosorption) と呼ばれ、生細胞でも死細胞でも観察されている。つまりこの吸着は細胞がエネルギーを使わない受動的な過程であり、金属の取り込みは非常に速く、微生物が金属と接触した直後の短い時間 (数秒から数分間) で起こる。藻類の細胞表面に金属イオンが吸着するメカニズムを明らかにするためには、細胞壁のどの部分に金属が結合しているかを調べる必要がある。細胞壁には多糖類やタンパク質があり、カルボキシル基、アミノ基、メルカプト基、リン酸基などの官能基が金属イオンと結合していると考えられる。^{15,18)} カルボキシル基をメタノールでエステル化して金属イオンとキレート結合を起こし難くすることにより、銅イオン、アルミニウムイオンの吸着サイトとしてカルボキシル基が働いていることが確かめられ、細胞壁の吸着サイトはカルボキシル基が大きな割合を占めており、その割合は藻類の種類によって異なることがわかった。¹⁵⁾ また、pH が低いと金属イオンの吸着量が減少するが、これは水素イオンが金属イオンと競合し、カルボキシル基がプロトン化されて金属

イオンとキレート結合をつくらなくなるためであると考えられる。アミノ基をアセチル化して同様の実験を行った報告もある。¹⁴⁾

生物吸着が起こってしばらくすると、溶液中と細胞に吸着した金属イオンとの間に平衡が成り立つ。この平衡は次に示す Freundlich の吸着等温式で説明される場合が多い。^{17,18)}

$$q = KC^{1/n}$$

ここで q は単位細胞量あたりの金属の吸着量 (mg/g), C は平衡時の金属イオン濃度 (mg/dm³), K , n は定数である。

次の段階では、金属イオンは細胞膜を通して細胞質に運ばれる。この段階は温度や光強度の影響を強く受け、細胞がエネルギーを必要とする能動的な取り込みであると考えられる。Singh らは、¹⁹⁻²¹⁾ 藍藻 *Nostoc calcicola* による銅や水銀の細胞内への取り込みにおける光の効果について研究し、暗条件下では金属の取り込みは非常に少なく、これらの金属イオンの取り込みが主に光合成で作られたエネルギーに依存していることを示した。また、光化学系 II の電子伝達阻害剤である DCMU (3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea) を加えると金属の取り込み量が大幅に減少し、光化学系 II によって生産されたエネルギーが、金属イオンの能動的輸送に重大な役割を果たしていることを明らかにした。また、Ting らは、¹⁷⁾ 細胞壁に吸着した金属イオンが、金属イオンと結合する酵素によって細胞膜中

Fig. 1 Uptake of Cadmium at 25°C

($\blacktriangle$) Mass balance ($\times 10^{-2}$ mmol Cd/l). ($\square$) Specific metal uptake ($\times 10^{-5}$ mmol Cd/mg cell dry wt). ($\blacksquare$) Residual metal concentration ($\times 10^{-2}$ mmol Cd/l). The metal ion was added at $t=0$ h. The model results are shown as solid lines.¹⁷⁾

Fig. 2 Uptake of Zinc at 25°C

(▲) Mass balance ($\times 10^{-2}$ mmol Cd/l). (□) Specific metal uptake ($\times 10^{-5}$ mmol Cd/mg cell dry wt). (■) Residual metal concentration ($\times 10^{-2}$ mmol Cd/l). The metal ion was added at $t=0$ h. The model results are shown as solid lines.¹⁷⁾

を移動するというモデルを用い、細胞の増殖も考慮して速度式を立てた。Fig. 1, 2に、緑藻 *Chlorella vulgaris* によるカドミウムと亜鉛の取り込みをそれぞれ示す。プロットが実測値、実線が計算値である。カドミウム、亜鉛の取り込みともに、このモデルに

よる計算値と良く一致しており、カドミウムより亜鉛の方が取り込み量が多いことがわかる。また、金属を取り込んだ細胞をその金属を含まない培地に入れ、金属取り込みの可逆性を調べたところ、カドミウムは速やかに溶液中に溶出するが、亜鉛は溶出しなかった。亜鉛は多くの酵素系での必須元素であるが、カドミウムの生物的役割は知られていない。金属はその種類によって、細胞中において異なった状態で保持され、利用されていると考えられる。

3.3 生物的除去に利用される微細藻類 重金属の生物的除去には様々な藻類が用いられており、様々な金属の除去が試みられている。特にカドミウム、銅に関する研究が多い。Table Iにカドミウムの除去に関する報告をまとめた。^{22,23)} ここで concentration factor (CF) は、次のように定義される。

$$CF = \frac{\text{バイオマス中の金属量}(\mu\text{g/g dry weight})}{\text{溶液中の金属濃度}(\mu\text{g/ml})}$$

金属の取り込みには、pH、培養時間、接触時間、光、金属濃度、バイオマス濃度、競合する金属イオンなど多くの因子が影響を与えるため、CFの値は培養条件によって変化するという欠点もあるが、³¹⁾ 異なる種類の藻類においても金属の取り込み能力を比較することができ、非常に便利なパラメーターである。藻類の種類によるカドミウムの取り込み能力を比較

TABLE I. Concentration Factors for Cadmium by Various Algae ^{22,23)}

Algal species	Concentration factor ^{a)}	Reference
Blue green algae		
<i>Chroococcus parisi</i>	3 250	24
<i>Nostoc</i> sp. 586	1 140—1 470	25
<i>Oscillatoria</i> sp.	1 160—1 310	25
Green algae		
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	16 700—32 000	25
<i>Chlorella regularis</i>	3 308	26
<i>Chlorella salina</i>	1 420—3 900	27
<i>Chlorella vulgaris</i>	86—3 900	28
<i>Chlorella</i> sp.	310—1 100	29
<i>Chlamydomonas angulosa</i>	1 981	26
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	3 539	26
<i>Chlamydomonas</i> sp.	5 480	25
<i>Scenedesmus biijuga</i>	2 663	26
<i>Scenedesmus chlorellioides</i>	1 847	26
<i>Scenedesmus obliquus</i>	2 456	26
<i>Scenedesmus</i> sp.	570—1 250	29
<i>Ulothrix fimbriata</i>	11 400—14 100	25
Diatoms		
<i>Asterionella formosa</i>	20 300—24 400	30
<i>Fragilaria crotonensis</i>	3 500—8 000	30

a) CF = metal in biomass ($\mu\text{g/g dry weight}$)/metal in solution ($\mu\text{g/ml}$).

すると、緑藻や珪藻に高いCFを示すものがあることがわかる。高村らは、^{32,33)}銅に汚染された河川と非汚染河川から単離培養した河川性付着藻類について、その光合成活性に及ぼす銅、カドミウム、亜鉛の影響を調べ、汚染地区から単離した緑藻と珪藻は非汚染地区のものよりこれらの重金属に強い傾向を持つが、藍藻はいずれも重金属に弱いと報告している。また、種々の藻類によるニッケルの取り込みを調べたところ、藍藻がこの能力に優れていることがわかった。^{31,34)} このように藻類の種類によって、取り込まれやすい金属がある。銅、鉛、コバルトなどの重金属においても種々の藻類による取り込みが調べられている。³⁵⁻³⁷⁾

4. 生物的除去プロセス

4.1 重金属の除去・回収のための生物プロセス

上述のように、藻類の中には、自らの栄養要求量をはるかに超えて、重金属を蓄積する性質をもつものがある。さらに、ある種の藻類では、生理的に不活性化された細胞や死細胞においても、大量の重金属を蓄積することが知られている。このような性質を利用して、重金属の除去・回収を目的とした廃水処理プロセスに、微生物バイオマスを適用するには、基本的に次の2方法が考えられる。

- 1) あらかじめ適当な条件下で培養したバイオマスを、前処理して粒状に加工したのち、攪拌槽や充填層内で廃水と接触させる方法。
- 2) 廃水を、池、ラグーン、あるいは人工の循環水路に導き、活発に増殖しているバイオマスと接触させる方法。

1)の方法は、活性炭による吸着や合成樹脂を用いたイオン交換などと類似した操作であるが、生物材料のもつ優れた選択性や高い吸着性を活かして独自の応用分野が開拓されてきた。藻類のバイオマスを用いて、攪拌槽によりカドミウムを吸着させる研究や、¹⁸⁾ 充填層でカドミウムを除去する研究³⁸⁾が行われている。この方法は、藻類に限られたものではなく、一般の微生物について蓄積された知識と技術を適用することができる。

生細胞を用いる後者の方法についても、多くの研究と応用への試みが報告されている。このプロセスの概念図を Fig. 3 に示す。重金属を含んだ廃液中で微生物の培養を行うなどの方法で、微生物バイオマスと金属イオンを含んだ水溶液とを接触させる。金属イオンを分離するため、バイオマスに十分な時間接触させた後、バイオマスを液相から分離する。その後液相は排出され、金属を含んだバイオマスは、濃縮溶液として金属を溶出することにより再生されるか、環境に許容できる方法で処理される。Wilde らは、そのようなプロセスの設計と運用を行う場合に考えられるパラメーターについて考察している。²³⁾ これをまとめると Table II のようになる。このように非常に多くのパラメーターが考えられる。また、開放系で操作されるこの方法は、悪気象条件、廃水の流入量、pH などの変動、毒性の高い重金属の含有など、微生物ポピュレーションの安定性を脅かす多くの要因が複雑に関係しているため、現状では信頼性に乏しい。しかし生物的除去は、pH や重金属濃度の変化を調節する能力があるという点で沈殿法より優れており、懸濁した固体、有機物、他の重金属の存在による影響の点でイオン交換法や逆浸透法よりも優れている。一方、生物的除去に匹敵する低い残留重金属濃度を達成できるのは、イオン交換法のみ

Fig. 3 Conceptual Diagram of a Bioremoval Process

TABLE II. Parameters in the Design and Operation of Bioremoval Process²³⁾

Process design	Strain selection, cultivation method, pretreatment, physiological state
Growth condition	Immobilization scheme, pH, biomass concentration, contact time
Separation and recovery	Separation of biomass, elution of heavy metals
Recycling	Reuse or disposal of biomass in an environmentally acceptable manner
Operation	Economic considerations for all of the above steps and the overall process

TABLE III. Advantage of Bioremoval²³⁾

1. Use of cheap and renewable biomass
2. Ability to treat large volumes of waste water
3. Removal and recovery of specific heavy metals
4. Ability to handle multiple heavy metals and mixed waste
5. Reducing residual metals to a very low concentration
6. Less need for additional process or expensive reagents
7. Operation over a wide range of conditions (temperature, pH and presence of other ions)
8. Low investment and operational costs
9. Improved recovery of heavy metals from the biomass
10. Greatly reduced volume of waste produced

である。全体的に、生物的除去を従来の重金属除去法と比べたデータは限られているが、生物的除去プロセスには Table III のような利点がある。²³⁾ また、藻類の利用は太陽エネルギーを駆動力に用いることができるので、大量の廃水を経済的に処理するには適した方法であろう。過酷なストレスの下でも安定に操作できるシステムの開発に向けて、広範囲な生態工学的な研究が必要である。具体的な問題点を明らかにするために、ここでは、廃水中の重金属除去における微細藻類の利用に焦点を絞って話を進める。

4.2 微細藻類を利用した重金属処理システム
微細藻類を利用して廃水中に含まれる重金属（多くの場合極めて低濃度）を、除去・回収するには、主に、光エネルギーの捕獲（微細藻類の増殖）と、処理後の廃水からの微細藻類バイオマスの分離の、2操作における効率を大幅に改善しなければならない。したがって、常にこれらの点を考慮しつつシステムの開発が進められてきた。生細胞を使う系でも、基本的には2つの方法に集約される。

1) 遊離細胞系——屋外の処理システム中で、微細藻類の遊離細胞に重金属を吸着、濃縮させた後、何らかの固液分離操作により、廃水から細胞を取り除く。この方法では、広い土地があれば光エネルギーを効率的に利用できるが、後の細胞分離操作の効率化がポイントになる。遠心分離やろ過操作など実験

室で多用される手段も、大量の廃水を扱う実用プラントでは、役立たない。多細胞、糸状性の藻類を選抜することや、容易にフロックを形成する条件の検討が重要となる。

2) 固定化細胞系——支持体の表面上に形成された生物膜を利用したり、別途に培養した微細藻類の細胞をスポンジなど多孔性の支持体に固定化して、固液分離操作を省略する点が特徴である。この方法には、バイオリクター内の光の透過、及び生物膜内の重金属の拡散など、解決すべき問題も残されているが、多くの研究者が関心を示している。アルギン酸ビーズに固定化した *Chlorella* に銅やニッケルを取り込ませた例や、³⁹⁾ 同様の方法でコバルト、亜鉛、マンガンの取り込みを調べたところ、遊離細胞よりもより多くの蓄積が観察されたという報告もある。⁴⁰⁾ しかし、アルギン酸ビーズによる固定化は強度の面で問題があり、より実用性のある固定化法の開発が望まれている。

5. おわりに

重金属の除去に微生物、特に微細藻類を利用する方法は、太陽エネルギーを有効に利用できるため、安いコストでプロセスを運転することができる。また、近年の発展途上国の経済成長はめざましく、それに伴い環境に対する負荷も急増している。処理施設の建設も行われているが、経済的な問題もあり、廃棄物の増加に追いつけないのが実状である。東南アジアの工業地域においては鉛、水銀、カドミウムなどの重金属による汚染が実際に報告されている。また、これらの地域では、河川の水が生活と密接に結びついていることも考慮する必要がある。このような開発途上国の現状と技術の受け入れ易さを考えた場合、コストの安さは非常に重要な要素であり、微生物による重金属の除去は有望な方法である。もちろん、実際に応用する場合、他の微生物との相互作用、⁴¹⁾ 重金属などによるストレス下の挙動など不確定の要素も多く、生態工学的考察も必要となってくる。光合成微生物による環境修復の今後の発展に期待したい。

謝辞 本稿をまとめるに際し、有益な御助言を頂いた大阪大学薬学部西原力教授並びにカリフォルニア大学 J.R. Benemann 博士に深くお礼を申し上げます。

引用文献

- 1) 茅野充男, 北岸確三, 日本土壤肥科学雑誌, **37**, 342 (1966).
- 2) 中原英臣, “重金属と生物,” 茅野充男, 斎藤寛 (編), 博友社, 東京, 1988, pp.11—79.
- 3) 山崎素直, “重金属と生物,” 茅野充男, 斎藤寛 (編), 博友社, 東京, 1988, pp.229—331.
- 4) E. Grill, E.-L. Winnacker, M.H. Zenk, *Science*, **230**, 674 (1985).
- 5) N. Kondo, K. Imai, M. Isobe, T. Goto, A. Murasugi, C. Wada-Nakagawa, Y. Hayashi, *Tetrahedron Lett.*, **25**, 3869 (1984).
- 6) G.N. Reddy, M.N.V. Prasad, *Environ. Exp. Bot.*, **30**, 251 (1990).
- 7) F.I. MacLean, O.J. Lucas, Z.A. Shaikh, E.R. Jansz, *Fedn. Proc., Fedn. Am. Soc. Exp. Biol.*, **31**, 699 (1972).
- 8) T. Nagano, M. Miwa, S. Suketa, S. Okada, *J. Inorg. Biochem.*, **21**, 61 (1984).
- 9) B.A. Hart, P.E. Bertram, *Environ. Exp. Bot.*, **20**, 175 (1980).
- 10) E. Heullet, F. Guerbette, C. Guenou, J.C. Kader, *Int. J. Biochem.*, **20**, 203 (1988).
- 11) D.J. Gingrich, D.N. Weber, C.F. Shaw, J.S. Garvey, D.H. Petering, *Environ. Health Perspect.*, **65**, 77 (1986).
- 12) R.W. Olafson, K. Abel, R.G. Sim, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **89**, 36 (1979).
- 13) W. Gekeler, E. Grill, E.-L. Winnacker, M.H. Zenk, *Arch. Microbiol.*, **150**, 197 (1988).
- 14) D.-Y. Cho, S.-T. Lee, S.-W. Park, A.-S. Chung, *J. Environ. Sci. Health*, **A29**, 389 (1994).
- 15) J.L. Gardea-Torresdey, M.K. Becker-Hapak, J.M. Hosea, D.W. Darnall, *Environ. Sci. Technol.*, **24**, 1372 (1990).
- 16) C. Fehrmann, P. Pohl, *J. Appl. Phycology*, **5**, 555 (1993).
- 17) Y.P. Ting, F. Lawson, I.G. Prince, *Biotechnol. Bioeng.*, **34**, 990 (1989).
- 18) Z. Aksu, T. Kutsal, *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, **52**, 109 (1991).
- 19) S.K. Verma, S.P. Singh, *Curr. Microbiol.*, **21**, 33 (1990).
- 20) P.K. Pandey, C.B. Singh, S.P. Singh, *Curr. Microbiol.*, **24**, 35 (1992).
- 21) P.K. Pandey, S.P. Singh, *Curr. Microbiol.*, **26**, 155 (1993).
- 22) J.T. Trevors, G.W. Stratton, G.M. Gadd, *Can. J. Microbiol.*, **32**, 447 (1986).
- 23) E.W. Wilde, J.R. Benemann, *Biotech. Adv.*, **11**, 781 (1993).
- 24) A. Les, R.W. Walker, *Water Air and Soil Pollution*, **23**, 129 (1984).
- 25) J.M. Hassett, J.C. Jannett, J.E. Smith, *Appl. Environ. Microbiol.*, **41**, 1097 (1981).
- 26) T. Sakaguchi, T. Tsuji, A. Nakajima, T. Horikoshi, *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **8**, 207 (1979).
- 27) K.H. Wong, K.Y. Chan, S.L. Ng., *Chemosphere*, **11/12**, 887 (1979).
- 28) H.J. Geisweid, W. Urbach, *Z. Pflanzenphysiol.*, **109**, 127 (1983).
- 29) E.W. Becker, *Water. Res.*, **17**, 459 (1983).
- 30) H.L. Conway, S.C. Williams, *J. Fish. Res. Board. Can.*, **36**, 579 (1979).
- 31) H.-K. Wang, J.M. Wood, *Environ. Sci. Technol.*, **18**, 106 (1984).
- 32) 高村典子, 笠井文絵, 渡辺 信, 国立公害研究所研究報告, **114**, 223 (1988).
- 33) N. Takamura, F. Kasai, M. Watanabe, *J. Appl. Phycology*, **1**, 39 (1989).
- 34) S.L. Corder, M. Reeves, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **45/46**, 847 (1994).
- 35) A. Nakajima, T. Horikoshi, T. Sakaguchi, *Agric. Biol. Chem.*, **43**, 1455 (1979).
- 36) V.M. Laube, C.N. McKenzie, D.J. Kushner, *Can. J. Microbiol.*, **26**, 1300 (1980).
- 37) N. Kuyucak, B. Volesky, *Biotechnol. Bioeng.*, **33**, 809 (1989).
- 38) B. Volesky, I. Prasetyo, *Biotechnol. Bioeng.*, **43**, 1010 (1994).
- 39) M.H. Wong, D.C.H. Pak, *Biomedical Environ. Sci.*, **5**, 99 (1992).
- 40) G.W. Garnham, G.A. Codd, G.M. Gadd, *Environ. Sci. Technol.*, **26**, 1764 (1992).
- 41) A. Kungolos, I. Aoyama, *Environ. Toxicol. Water Quality*, **8**, 351 (1993).