

光合成細菌의 檢索과 그 利用에 관한 研究

金容雄·金廣植

全南大學校 農科大學

(1981년 6월 5일 수리)

Studies on the Isolation and the Application of Photosynthetic Bacteria

Young-Ung Kim and Kwang-Sik Kim

College of Agriculture, Chonnam National University, Kwang Ju, Korea

Abstract

Four species of the photosynthetic bacteria from 36 samples were isolated. their characteristics, their capability for nitrogen fixation and their capability for purification of organic waste water by photosynthetic bacteria were examined. Photosynthetic bacteria are widely distributed in soil. The isolated species are *Rhodopseudomonas capsulatus*, *R. spheroides*, *R. gelatinosa*, and *R. rubrum*. The capability for nitrogen fixation varies with the species of photosynthetic bacteria, and it is very pronounced in the *R. capsulatus*. The capability for purification of organic waste water is relatively strong but varies with the species.

緒 論

光合成細菌은 光 energy 를 利用하여 生育하는 微生物로 環境條件에 따라 窒素固定, 脫窒, 黃化物酸化, 炭酸固定, CO₂放出 등 多様な 機能에 있는 細菌¹⁻⁶⁾으로 그 分類는 Van Niel⁷⁾에 의하여 처음으로 이루어졌다. 한편 小林 등은 이들 菌의 生理, 生態, 特히 窒素固定에 관한 研究^{1,2,8)}와 이 菌을 利用한 有機性 廢水, 即 糞尿, 食品工場 廢水 등의 淨化 處理와 菌體의 生産, 畜産飼料 및 肥料로서의 利用에 관한 많은 實驗結果⁸⁻¹⁷⁾를 報告하고 있으며 北村⁵⁾, 佐藤⁴⁻⁶⁾도 脫窒 光合成細菌을 分離하여 利用하는 方案을 檢討하고 있다. 그러나 우리나라에서는 아직 光合成細菌의 分離 및 그 性質 또는 利用에 대하여 體系的인 研究가 없는 實情이다. 따라서 本研究에서는 우선 光合

成細菌中에서 基質利用性과 菌學的 性質을 檢査하여 紅色無黃細菌에 屬하는 몇가지 菌株을 分離하여 그 成分과 利用面에 對하여 實驗한 結果를 報告하는 바이다.

材料 및 方法

1. 光合成細菌의 分離

Table 1과 같은 光合成細菌이 分布되어 있으리라 생각되는 36個 場所에서 는 土壤, 河底土, 汚染되어 있는 都市下水와 그 浮遊物의 少量을 採取하여 100ml의 細菌瓶에 넣고 Table 2와 같은 基本培地⁹⁾를 가득 채워 嫌氣狀態로 30°C에서 5000Lux 光 照明下에서 2週日間 培養하여 出現하는 赤色~褐色으로 菌의 發生을 確認하고 分離하기 위하여 5回以上 移植을 反覆하여 集積培養을 한 다음 分離된 菌株을 基質을 달리한 培地에

Table. 1. Sampling places for isolation of photosynthetic bacteria

No.	Sampling places	No.	Sampling place
①	Youngbong-Dong, Kwang ju-Si, Paddy soil	①9	Mokpyong-Ri, Haenam-Up, Haenam Kun, Paddy soil
2	Youngbong-Dong, Kwang ju-Si, Pond water	20	Bangchoon-Ri, Kyoekok-Myon, Haenam Kun, Paddy soil
3	Youngbong-Dong, Kwang ju-Si, River soil	21	Bong Ri, Samsan-Myon, Haenam Kun, Paddy soil
④	Gyoesan-Ri, Yongsan-Myon, Changhung-Kun, Paddy soil	22	Jungsan-Ri, Okchun-Myon, Haenam Kun, Paddy soil
5	Sansin-Ri, Youchi-Myon, Changhung-Kun, Paddy soil	②3	Naekco-Ri, Hwangjun-Myon, Sungju-Kun, Paddy soil
6	Haban-Ri, Kwansan-Myon, Changhung-Kun, Paddy soil	24	Yokok-Ri, Jooam-Myon, Sungju-Kun, Paddy soil
7	Ip-Ri, Jangpyong-Myon, Changhung-Kun, Paddy soil	25	Sapyong-Ri, Su-Myon, Sungju-Kun, Paddy soil
⑧	Songkwang-Ri, Kyom-Myon, Koksung-Kun, Paddy soil	26	Sinpyong-Ri Songkwang-Myon, Sungju-Kun, Paddy soil
9	Gajung-Ri, Kyom-Myon, Koksung-Kun, Paddy soil	27	Sinhak-Ri, Ssangam-Myon, Sungju-Kun Paddy soil
10	Kongbuk-Ri, Moksadong-Myon, Koksung-Kun, Paddy soil	28	Songchun-Dong, Junju-Si, Paddy soil
11	Chungdan-Ri, Ohsan-Myon, Koksung-Kun, Paddy soil	29	Songchun-Dong, Junju-Si, Floating matter I in Junju-Riuer
⑫	Yousan-Ri, Bongsan-Myon, Tamyang-Kun, Paddy soil	③0	Songchun-Dong, Junju-Si, Floating matter II in Junju-River
13	Jungsuk-Ri, Moojung-Myon, Tamyang-Kun, Paddy soil	31	Songchun-Dong, Junju-Si, Soil in Junju-River
14	Dongun-Ri, Kosu-Myon, Tamyang-Kun, Paddy soil	③2	Sinsung-Ri, Sungnae-Myon, Kochang-Kun, Paddy soil
15	Su-Ri, Kosu-Myon, Tamyang-Kun, Paddy soil	33	Sinsung-Ri, Sungnae-Myon, Kochang-Kun Soil in waterway
16	Maesan-Ri, Daeduk-Myon, Tamyang-Kun, Paddy soil	34	Sosung-Mon, Chungup-Kun, Soil in Chungup-River
17	Haekok-Ri, Changpyong-Myon, Tamyang-Kun, Paddy soil	③5	Sosung-Mon, Chungup-Kun, Floating matter in Chungup-River
18	Ungyoung-Ri, Taejun-Myon, Tamyang-Kun, Paddy soil	36	Nongso-Ri, Chungju-Up, Chungup-Kun, Paddy soil

○ : Samples for isolation of photosynthetic bacteria species.

接種하여 菌의 生育狀態, 生育與否에 따라 小林⁸⁾ 등의 方法으로 分離하여 細胞形態와 gram 染色性을 檢査하였다.

2. 光合成 細菌의 菌體分析

1) 培養條件 : 培地の 組成¹³⁾은 K_2HPO_4 5g, NaCl 1g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 2g, Na-propionate(Na-

citrate, Na-Tatrate) 30g, Yeast extract 30g, pepton 30g, H_2O 10l 를 加壓滅菌하여 分離된 菌株를 接種한 다음 密閉하고 8,000~10,000Lux 의 光照明下에 30°C 에서 7日間 培養하여 遠心分離한 다음 洗滌하여 65°C 로 熱風乾燥하고 分碎하여 分析試料로 하였다.

Table 2. Composition of culture medium for isolation of photosynthetic bacteria

NH ₄ Cl	1.0g	*inorganic solution	
NaHCO ₃	1.0g	FeCl ₃ ·6H ₂ O	5.0mg
K ₂ HPO ₄	0.2g	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.05mg
Na-Acetate	1.0g	H ₃ BO ₃	1.0mg
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.2g	MnCl ₃ ·4H ₂ O	0.06mg
Biotin	5.0mg	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	1.0mg
p-Aminobenzoic acid	5.0mg	Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	0.5mg
NaCl	0.5g	Distilled water	1000ml
Inorganic solution*	10ml		
Distilled water	1000ml		
pH	7.0		

2) 一般分析 : AOAC 法에 따라 粗蛋白質은 Kjeldahl 法으로 粗脂肪은 ether 抽出法, 粗灰分은 灰化法, 全炭水化合物은 ethanol 로 抽出하여 還元糖과 非還元糖을 定量하고 抽出殘渣를 鹽酸으로 加水分解하여 中和, 除蛋白한 다음 Somogy 法으로 糖을 定量하고 還元糖은 glucose 로, 非還元糖은 sucrose 로 酸加水分解糖은 澱粉으로 換算했다.

3) Bacteriochlorophyll 의 吸光度 : 分離培養한 光合成細菌을 遠心分離하여 얻은 菌體 1g(生體重을 100ml 의 acetone 에 넣어 7日間 抽出하고(4°C) ethanol 抽出은 菌體 1g 을 ethanol 100ml 에 넣어 100°C 에서 1時間 還流冷却하면서 抽出한 다음 spectrophotometer 로 340~800nm 에서 吸光도를 測定했다.

3. 窒素固定力 測定

Acetylene 還元法²⁰⁾으로 測定했다. 即, 分離培養한 光合成細菌 各 1g(生體重)을 200ml 의 滅菌水에 넣어 10分間 진탕 分散시킨 다음 100ml flask 에 20ml 를 넣어 15分間 30°C, 10,000Lux 照明下에서 培養하고 二重 고무마개로 密栓한 다음 750mmHg 로 1分間 減壓하여 基質 gas 로 1氣壓이 되도록 채운 다음 1分間 放置하는 操作을 4回 反覆하여 同一條件下에서 4時間 培養한 다음 NaN₃ 飽和溶液 5ml 를 注射하여 反應을 停止시키고 gas chromatography(Shimadzu 4BM FID) 로 還元된 ethylene 을 定量했다. 基質 gas 의 組成은 C₂H₂ 2.08%, CO₂ 0.042%, Ar. Balance 이며 gas chromatograph 의 測定條件은 3mm×

2m 의 stainless column 에 Porapak R 을 充填하고 carrier gas 로 N₂ 60ml/min, H₂ 30ml/min, 空氣 1000ml/min 의 條件에 detector 溫度 105°C, column 溫度 55°C 에서 測定했다.

4. 廢水淨化 能力의 檢討

1) 培養條件 : 豚糞, 豆腐工場 廢水, 下水를 採取하여 豚糞은 20倍로 稀釋하고 豆腐工場 廢水와 下水는 原液을 30°C 에서 24時間 通氣培養하여 好氣性菌으로 醱酵시킨 다음 濾過하여 pH 7로 調節한 液에 光合成細菌을 接種하여 嫌氣狀態로 30°C 에서 10,000Lux 의 光照明下에 5日間 培養한 다음 濾過하고 다시 pH 를 調節하여 5日間 培養하여 濾液을 分析했다.

2) COD 測定 : dichromate reflux method²¹⁾로 測定했다.

3) BOD 測定 : azide modification method²¹⁾로 測定했다.

結果 및 考察

1. 光合成細菌의 分離

Table 2 와 같은 組成의 基本培地에 Table 1 에 表示한 試料 採取場所에서 採取한 畚土壤, 河底土, 汚水, 汚水 浮遊物 少量을 接種하여 集積培養을 5回以上 反覆한 結果 36個所의 全試料에서 光合成細菌이 分離되었으므로 生育이 良好한 9個所의 分離菌株만을 基本培地에 基質을 달리하여 培養하고 赤色 혹은 褐色의 有無와 spectrophotometer 로 吸光도를 測定하여 色の 濃淡을 比較하고 Table 3과 같은 基質利用性에 따라 分離同定하는 小林法⁸⁾에 따라 分離된 光合成細菌은 Table 4와 같이 9個의 試料에서 *Rhodopseudomonas(R) capsulatus*, *Rhodopseudomonas gelatinosa*, *Rhodopseudomonas spheroides*, *Rhodospirillum(Rs.) rubrum* 의 4種이었으며 *R. capsulatus* 는 9個 *R. spheroides* 는 4個 *R. gelatinosa* 는 2個, *Rs. rubrum* 은 8個 菌株가 分離되었다.

한편 分離된 光合成細菌의 細胞形態는 大部分 桿狀이었으나 *R. capsulatus* 는 chair 形인 것도 觀察되었으며 *Rs. rubrum* 은 螺旋形이었다. 細胞의 크기는 *R. capsulatus* 는 2.5~3×0.5~0.75 μm, *R. spheroides* 는 1.5~2.5×0.4~0.5μm, *R. gelatinosa* 는 0.5~2.5×0.5~0.6μm, *Rs.*

Table 3. Availability of substrate by photosynthetic bacteria isolated in *Honam Area*

Substrate	<i>R. palustris</i>	<i>R. capsulatus</i>	<i>R. spheroides</i>	<i>R. gelatinosa</i>	<i>Rs. rubrum</i>
N ₂ -thiosulfate	+	-	-	-	-
N ₂ -propionate	+	‡	-	-	-
N ₂ -tartrate	-	-	+	-	-
N ₂ -citrate	-	-	-	+	-
N ₂ -glutamate	±	±	±	+	+
N ₂ -acetate	+	+	+	+	+
N ₂ -lactate	+	+	+	+	+
Glucose	-	+	+	+	+
Fructose	-	+	+	+	-
Mannose	-	-	+	+	-
Mannitol	-	-	+	-	-
Sorbitol	-	-	+	-	-
Alanine	±	+	±	+	+
Leucine	+	-	±	±	±
Asparagine	∓	+	∓	±	±
Glycerol	∓	-	+	-	-
Ethanol	‡	-	+	+	+
Number of isolated	0	9	4	2	8

+ growth, ‡ good growth, - no growth, ± some growth, ∓ doubtful

Table 4. Distribution of photosynthetic bacteria isolated in *Honam Area*

Photosynthetic bacteria	Sample									No. of isolate
	Kwang-ju	Chang-hung	Kok-sung	Tam-yarg	Hae-nam	Sung-ju	Jun-ju	Ko-chang	Jung-up	
<i>R. palustris</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
<i>R. capsulatus</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	9
<i>R. spheroides</i>	+	-	-	+	-	+	-	+	-	4
<i>R. gelatinosa</i>	+	-	-	-	-	+	-	-	-	2
<i>Rs. rubrum</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	8

Table 5. General composition of photosynthetic bacteria isolated from *Honam Area*

(units %)

Component	<i>R. gelatinosa</i> , Kw-1	<i>R. capsulatus</i> H-1	<i>R. spheroides</i> , Kc-1
Crude protein	76.26	66.28	70.05
Crude fat	7.20	5.48	6.37
Crude fiber	10.37	22.14	18.68
Sugar(soluble carbohydrate)	0.65	0.68	0.83
Crude ash	5.51	5.41	6.62
Total carbohydrate	0.582	0.648	0.770
Reducing sugar	0.072	0.216	0.220
Nonreducing sugar	0.031	0.161	0.023
Starch	0.479	0.271	0.527

rubrum 은 1.0~1.2×0.5~0.7 μ m 였으며 測定할 때 따라 약간 달라지는 것을 觀察할 수 있었다. Gram 染色性은 全部 gram 陰性이었다. 한편 小林⁸⁾도 이菌의 形態가 桿狀, 圓形, 橢圓形 등으로 基質의 種類, 酸素分壓, 光條件, 培養期間에 따라 多形現象을 나타내 形態觀察로는 菌의 區別이 困難하다고 報告한 바도 있다.

2. 光合成細菌의 性質

1) 光合成細菌의 一般成分 및 炭水化物 組成 : 分離된 菌株中 *R. gelatinosa* Kw-1, *R. capsulatus*, H-1, *R. spheroides*, Kc-1을 大量培養하여 얻어진 菌體의 化學的 成分을 分析한 結果를 Table 5에 表示한 바와 같이 粗蛋白質 含量은 65% 以上이며 分離菌 *R. gelatinosa*, Kw-1가 가장 많고 粗纖維는 10~20%로 分離菌 *R. capsulatus*, H-1가 가장 含量이 많으며 炭水化物은 0.6~0.8% 程度 含有하고 *R. spheroides*가 가장 많다. Alcohol 可溶糖은 非還元糖보다 還元糖이 많은 것으로 보아 糖類는 主로 單糖類의 形態로 들어 있는 것이 아닌가 생각된다. 이와같은 結果는 小林¹¹⁾가 報告한 結果에 比하여 粗蛋白質의 含量이 많고 炭水化物의 含量이 적은 것이 다르며 이와 같은 結果는 菌의 培養條件 등의 差에 基因되는 것이 아닌가 생각된다.

2) 光合成細菌의 bacteriochlorophyll의 性質 : 分離된 光合成細菌의 bacteriochlorophyll을 含有하는 chromatopore의 吸光曲線은 Fig. 1, 2에서 보는 바와 같이 acetone으로 抽出한 것은 776 nm에서 吸收極大가 있으며 그외에도 478, 509,

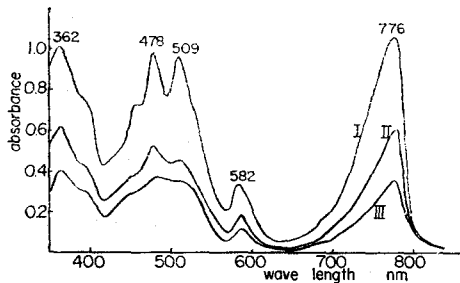


Fig. 1. Absorption spectra of chromatophore of photosynthetic bacteria extracted with acetone
I : *R. capsulatus*, H-1, II : *R. gelatinosa*, Kw-1, III : *R. spheroides*, Kc-1

582nm에서도 吸收極大를 보였다. 한편 細菌의 懸濁液에서는 805nm에 吸收極大가 있었다. 이와 같은 結果는 小林⁹⁾ 등의 結果와 매우 類似한 傾向을 보였으나 菌種間의 差異는 區分하기 困難하며 alcohol 抽出液에 대한 吸光曲線은 Fig. 3에 表示한 바와 같이 733nm에 吸收極大가 있었다.

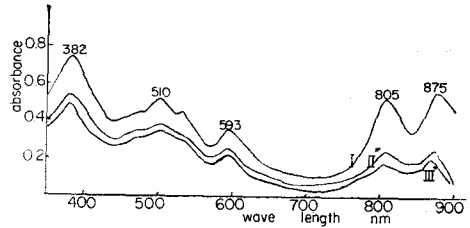


Fig. 2. Absorption spectra of chromatophore of photosynthetic bacteria suspended with water
I : *R. gelatinosa*, Kw-1, II : *R. spheroides*, Kc-1, III : *R. capsulatus*, H-1

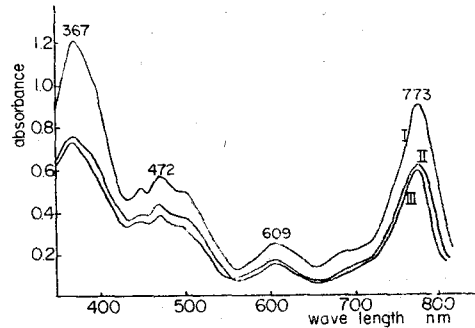


Fig. 3. Absorption spectra of chromatophore of photosynthetic bacteria extracted with ethanol
I : *R. capsulatus*, H-1, II : *R. gelatinosa*, Kw-1, III : *R. spheroides*, Kc-1

Table 6. Acetylene reducing activity of photosynthetic bacteria isolated in Honam area

Photosynthetic bacteria	Acetylene reducing activities (nm/g microbes. hr.)
<i>R. gelatinosa</i> , Kw-1	541
<i>R. capsulatus</i> , H-1	19,683
<i>R. spheroides</i> , Kc-1	491

Table 7. Activity of purification for organic waste water by photosynthetic bacteria isolated in Honam Area

	Sample	Aeration	1st incubation in photosynthetic bacteria			2nd incubation in photosynthetic bacteria			
			<i>R. gelatinosa</i> Kw-1	<i>R. capsulatus</i> H-1	<i>R. spheroides</i> Kc-1	<i>R. gelatinosa</i> Kw-1	<i>R. capsulatus</i> H-1	<i>R. spheroides</i> Kc-1	
			24 hrs	5 days		5 days			
pH	Pig excrements	8.54	7.85	8.7	8.7	7.88	8.60	8.59	8.02
	Wastewater of bean curd	4.6	7.5	9.25	9.18	8.54	7.85	7.88	8.02
	Sewage of city	6.8	8.6	9.1	9.02	7.92	8.52	8.17	8.09
COD (ppm)	Pig excrements	19741	1810.9	1265.9	974.9	982.8	216	576	486
	Wastewater of bean curd	8955	597.0	276.9	263.4	369.5	234	306	234
	Sewage of city	796	310.4	283.1	310.6	349.9	108	252	216
BOD (ppm)	Pig excrements	15888	11916	1241.2	1787.4	844	196.3	186.7	186.7
	Wastewater of bean curd	4965	2562	1092.4	1042.6	1092	292.3	280.3	211.3
	Sewage of city	750	202	198.1	200.5	168.9	150.0	191.7	115.0
Total-N (ppm)	Pig excrements	460	19.3	11.56	19.3	7.73	7.53	8.31	12.56
	Wastewater of bean curd	268.3	6.5	1.93	16.61	15.45	3.09	0.19	2.90
	Sewage of city	195.2	7.4	7.73	3.86	11.59	3.67	1.74	4.06

3. 光合成細菌의 窒素固定力

分離한 光合成細菌의 窒素固定力을 acetylene 還元法으로 測定한 結果를 Table 6에 表示한 바와 같이 菌種에 따라 差異가 있으며 分離菌 *R. capsulatus*, H-1이 가장 강한 固定能力을 나타냈으며 이와같은 結果는 菌體만의 固定力을 測定한 것이므로 土壤中에서 固定能이나 他菌과의 混合培養 其他 여러가지 다른 培養條件에 따라 固定能力의 變化가 豫想되므로 앞으로 이와 같은 側面의 研究檢討가 必要하다고 생각된다.

4. 光合成細菌의 廢水 淨化能力

有機性 廢水에 對한 光合成細菌의 淨化能力을 Table 7에서 보면 通氣培養 期間에 BOD 나 COD 가 急激히 減少하며 光合成細菌을 接種하여 5日間 培養한 結果 COD는 1次培養이나 2次培養에서 豚糞과 豆腐工場 廢液에 대해서는 比較的 강한 淨化能力을 나타냈으며 分離菌 *R. gelatinosa* Kw-1이 가장 強했다. 더욱이 豚糞은 COD 나 BOD가 10⁴ 範圍에서 10² 範圍로 減少 되었으나

都市下水에 있어서는 約 1/3 程度로 減少했다. 한편 全窒素를 보면 10²ppm 範圍에서 單 ppm 範圍로 減少했다.

有機性 廢水의 淨化에 있어서 分離된 光合成細菌의 利用에 대한 問題는 앞으로 더욱 많은 研究와 檢討가 要望된다.

抄 錄

본 실험에서는 光合成細菌의 檢索과 그 利用을 目的으로 우선 36個 試料에서 光合成細菌을 分離하고 그 細菌들의 成分과 窒素 固定力, 有機性 廢水의 淨化能力을 測定하였다. 一般적으로 어느 試料나 光合成細菌은 分布되어 있으며 分離된 菌은 *Rhodospseudomonas capsulatus*, *Rhodospseudomonas spheroides*, *Rhodospseudomonas gelatinosa*, 와 *Rhodospirillum rubrum*의 4種이었다 이들의 窒素 固定力은 菌株에 따라 다르고 *R. capsulatus* H-1가 가장 強했다.

또한 有機性 廢水의 淨化能力은 廢水와 菌株에

따라 다르게 나타났으나 일반적으로 相當히 強한 淨化能을 보여주고 있다.

謝 辭

本 研究는 1980年度 文教部 學術研究 助成費로 수행된 것이며 관계당국에 謝意를 表한다.

參 考 文 獻

1. Okuda, A., Yamakuchi, M. and Kobayashi, M.: Soil and Plant Food, 1 : 102, 2 : 4, 131, 4 : 73, 6 : 35, 76, 7 : 115, 146 (1955, 1956, 1959, 1960, 1961)
2. Okuda, A. and Kobayashi, M.: Soil Science and Plant nutrition, 8 : 1, 35, 10 : 29, 11 : 28, 32 (1962, 1964, 1965)
3. 小林達治 : 生物科學, 20 : 63(1968)
4. Satoh, T., Hoshino, Y., and Kitamura, H.: Arch. Microbil. 108 : 265(1976)
5. Satoh, T.: Arch. Microbial, 115 : 293(1977)
6. Satoh, T., Hoshino, Y. and Kitamura, H: Agr. Biol. Chem., 38 : 1749(1974)
7. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8th Edition, Baltimore William & Wilkins Co. U.S.A.(1977)
8. 小林達治 : 日土肥誌, 46 : 101, 148(1975)
9. 金廣植 : 農漁村開發研究, 6 : 67(1972)

10. 北村 博 : 微生物の生態, 5 : 85 學會出版 Center, 東京(1978)
11. 小林達治, 汐見信行, 奥田 東 : 日土肥誌, 37 : 305(1966)
12. 小林達治 : 近代農業における土壤肥料の研究. 第3集 : 113, 養賢堂, 東京(1972)
13. Kobayashi, M. and Haque, M.: Plant and Soil, Special Volume: 443(1971)
14. Kobayashi, M., Kobayashi, M. and Nakanishi, H.: 醱酵工學雜誌, 49 : 817(1971)
15. Kobayashi, M. and Tchan, Y.T.: Water Research, Pergamon Press, 7 : 1219(1973)
16. 高橋英一, 小林達治, 玉虫達夫 : 鹽研 55 : 1 (1961)
17. 高橋英一, 小林達治, 藤井國博, Hao, M.: 鹽研, 64 : 1(1969)
18. Wang, H.H., Chen, S.K., Yen, S.L., Liu, J.H. and Chou, C.C.: 國立臺灣大學農學院研究報告, 17 : 50(1977)
19. 土壤微生物研究會 : 土壤微生物實驗法, 養賢堂, 東京(1975)
20. 松口龍彦, Tangcham, B. and Paliyuth, S.: 土と微生物, 18 : 7(1976)
21. Water Pollution Control Federation: Simplified Laboratory Procedures for Waste Water Examination, 2nd Ed, Washington, U.S.A.(1976)