

***Chlamydomonas reinhardtii* 이용한 명반응 증식 특성 및 암반응에서 수소 생산**

김지성*, 박호일*, 김동건*, 공경택**, 조경숙***, 박대원†*

*한국과학기술연구원 수질환경 및 복원연구센터,

**한국과학기술연구원 반응매체 연구센터,

***이화여자대학교 과학기술대학원 환경학과

Multiplication conditions in light reaction and hydrogen production in dark fermentation using *Chlamydomonas reinhardtii*

Ji-Seong Kim*, Ho Il Park*, Dong Kun Kim*, Gyeong Taek Gong**,
Kyung-Suk Cho***, Daewon Pak†*

*Water Environment & Remediation Research Center, Korea Institute of Science and
Technology, Korea

**Reaction Media Research Center, Korea Institute of Science and Technology, Korea

***Department of Environmental Science and Engineering, Ewha Womans University, Korea

ABSTRACT

We experimented on growth in light and production of hydrogen and organic matters in dark fermentation by using *C. reinhardtii*. In the light, growth rate of *C. reinhardtii* following CO₂ fixation was proportional to consumption rate of nitrogen source. And the starch in cell was accumulated more when the period of culture was lengthened more. But the accumulation rate of starch in cell was decreased when the growth rate of cell become dull. In the dark fermentation, the production volume and production rate of hydrogen were the highest value in the mid exponential state among other states. The utilization efficiency of substrate was better in the early exponential state than other states. In production of organic matters, acetic acid didn't change remarkably and ethanol showed the highest value in early exponential state.

주요기술용어 : *Chlamydomonas reinhardtii*(클라미도모나스), Hydrogen production(수소생산), Organic material production(유기물생산), Starch(녹말), Dark fermentation(암 발효)

† Corresponding author : daewon@kist.re.kr

1. 서론

현재 우리가 사용하고 있는 화석 연료는 가장 대표적인 에너지원이다. 그러나 에너지 생산을 화석연료에만 의존하기에는 여러 가지 문제점들이 있다. 화석연료는 부존량이 한정되어 있을 뿐 아니라, 연소 시 이산화탄소가 발생하여 지구의 온난화를 일으키며, 이로 인해 지구 생태계에 큰 악영향을 미친다.

화석에너지의 한정성과 지구에 미치는 악영향 때문에 새로운 대체 에너지로서 태양 에너지가 각광받고 있다. 태양에너지는 재생산이 가능한 에너지 자원 중에서 가장 풍부하며, 지속적인 공급을 받을 수 있다. 그 에너지 중에서도 수소는 가장 강력한 에너지 자원이다. 현재 수소가 차세대 에너지원으로 각광받고 있는 것은 수소 에너지가 깨끗하며, 효율적이고, 재생이 가능하기 때문이다. 또한 부산물로 이산화탄소나 NOx, SOx와 같은 유해기체를 생산하지 않는다. 따라서 수소는 석탄, 석유와 같은 화석연료를 대체할 환경친화적 에너지 자원이며, 이에 다른 국제적인 연구가 활발하게 진행되고 있다¹⁾.

차세대 에너지원인 수소를 생산하는 여러 가지 방법 중에서, 생물학적으로 수소를 생산하는 방법이 꾸준히 연구되고 있다. 자연에서는 오직 bacteria와 algae와 같은 미세조류만이 수소를 생산하는 능력이 있는데, 이러한 미세조류 중에서 연구되고 있는 분야는 anaerobic bacteria, photosynthetic bacteria, cyanobacteria, green algae에 관한 것이다. 이 중 green algae와 cyanobacteria는 물을 분해하여 수소와 산소를 생산하기 때문에 많은 연구가 진행 중이다^{2~5)}.

생물학적 수소생산은 혐기적 조건하에서만 활성을 가지는 효소인 nitrogenase나 hydrogenase에 의해 이루어진다. Hydrogenase가 O₂에 의해 저해를 받기 때문에, 광합성에 의한 O₂와 H₂의 생산을 시간적 혹은 공간적으로 분리시키는 two-stage 공정으로 이루어져야만 한다. 이러한 two-stage 공정은, 우선 CO₂가 일반적인 광합성을 통해 H₂ 생산을 위한 내인성 기질(endogenous substrate)로 고정화되고(stage 1), 그 다음 녹조

류가 혐기적 조건하에서 배양될 때 수소를 생산하는 공정(state 2)으로 구성된다⁶⁾. 이와 관련된 연구로 Miura 등(1995)이 세포 배양을 통해 *Chlamydomonas* sp. MGA 161의 광합성에 의한 균주의 대량 배양과 혐기 암반응을 통한 수소의 생산을 시도하였다. 또한, 이와 동시에 에탄올, 글리세롤, 아세트산 및 휴믹산 등의 유기물을 생산하고, 이를 탄소원으로 이용해 광합성 박테리아인 *Rhodospseudomonas* W-1S를 이용한 추가적인 수소 생산을 실시한 바 있다⁵⁾.

본 연구에 이용된 녹조류의 일종인 *Chlamydomonas reinhardtii*은 대기 중에 있는 CO₂를 기질로 하여 광합성을 통해 증식하며, 혐기적 조건하에서 수소와 유기물질을 생산한다⁷⁾. 또한 수소 생산시 발생하는 발효산물인 유기물은, 수소 생산성이 비교적 높은 광합성 박테리아의 기질로 공급이 가능하다⁸⁾.

본 연구에서는 수소 및 유기물을 생산하기 위해 명반응에서는 *C. reinhardtii*의 최적 증식 조건 9을 확립하기 위한 실험을 수행하였으며, 암반응에서는 혐기 발효를 통한 증식에 따른 수소와 유기물 생산량을 분석하였다.

2. 실험

2.1. 실험 균주 및 배양 조건

본 연구에 이용된 공시균주는 *Chlamydomonas reinhardtii* UTEX 90이다. 이 균주는 UTEX(The Culture Collection of Algae at the University of Texas at Austin)에서 구입하였다. 본 실험에 이용된 배지는 Ammonia-calcium-phosphate(ACP)이다. ACP 배지 조성은 NH₄Cl 0.4g/L, MgSO₄ · 7H₂O 0.1g/L, CaCl₂ · 2H₂O 0.05g/L, K₂HPO₄ 0.822g/L, KH₂PO₄ 2.195g/L이며 여기에 trace element solution을 1.00ml 첨가하였다.

C. reinhardtii 배양 조건은 온도 25℃, 교반속도 120rpm의 교반배양기에서 암반응과 명반응을 12시간/12시간 유지하며 세포를 배양하였다. 명반응

일 때의 광도는 $25\mu\text{E}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$ 를 유지하였다.

2.2. Photo-bioreactor 이용한 C. reinhardtii의 증식 특성

C. reinhardtii의 증식 특성 실험은 직경 6.5cm 인 2L 용량의 관형 광생물 반응기를 이용하였으며, 3%의 CO₂ 혼합기체(공기+CO₂)를 100ml/min로 유지하면서 반응기에 공급하였다. 또한 각각 반응기 내부에 동일한 산기석을 넣어 혼합되는 기체가 미세한 기체 방울이 되게 하여 배지와 혼합 기체 사이에 CO₂ 물질전달 효과를 높이도록 하였다. 광원은 형광등을 반응기 양면에 배치하여 $100 \mu\text{E}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$ 로 공급하였다. 온도는 water double jacket을 이용하여 25°C로 고정하였다. 이때 배양은 회분식으로 하여 새로운 배지의 주입은 없으며, 각각의 증식상태에 따라 일정량의 시료를 채취하여 수소 생산 실험에 사용하였다. 각 증식 단계에 따라 흡광도와 DCW를 측정하였고, 일정한 주기로 소량을 채취하여 TKN, starch, ethanol 그리고 acetic acid를 분석하였다.

2.3. 암반응에 의한 각 증식상태에 따른 H₂ 및 유기물 생산

본 실험에서는 앞에서 증식상태별로 채취한 시료를 이용하여, 빛을 차단한 조건에서 발효시킨 후 그에 따른 수소 생산성과 유기산 생산성을 분석하였다. 암 발효 실험은 140ml의 serum bottle에 80ml의 시료를 넣은 후 먼저 질소로 30분간 purging시켜 혐기성 상태로 만든 후 고무마개로 입구를 밀봉한 후 bottle내로 유입되는 빛을 차단하였다. 이 반응기는 25°C, 150rpm의 교반배양기에서 거꾸로 뒤집은 상태로 실험에 사용하였다. 암반응시 생성되는 gas양 측정은 head space에 플라스틱 syringe를 꽂아 증가되는 부피를 기록하여 이용하였다. 생성된 수소는 GC를 이용하여 수소와 질소의 비로 계산하여 얻었다. 또한 발효 대사산물인 유기산은 주기적으로 반응기에서 소량의 액상시료를 채취하여 상등액을 분리해 GC

로 분석하였다.

2.4. 분석방법

세포증식은 spectrophotometer (HITACH, U-2000, Japan)를 이용하여 660nm에서 흡광도(optical density)를 측정하였다. dry cell weight와 흡광도와의 상관관계를 구하기 위하여, 10mL의 시료를 4000g에서 원심분리 시킨 후 3차 증류수로 두 번 세척하여 필터로 여과하였다. 그리고 여과된 세포를 포함한 필터를 80°C의 오븐에서 건조시켜 일정한 무게에 도달하였을 때 그 무게를 측정하였다. Starch 분석은 시료를 0°C에서 10분간 4000g로 하여 원심분리 시킨 후, pellet을 4ml의 40% 과염소산과 혼합하여 25°C에서 6시간 동안 반응시켰다. 그리고 얼음 수조에서 NaOH를 조금씩 첨가하여 그 혼합물의 pH가 중성이 되게 한 후, starch를 용해시키기 위해 끓는 물에서 30분 동안 가열하였다. 가열된 시료를 0°C에서 20분간 15000g로 하여 원심분리 시키고 상등액을 적정 농도로 희석하여 요오드-녹말 반응법에 의해 반응시켰다. 반응된 시료 내 starch 농도는 spectrophotometer (HITACH, U-2000, Japan)를 이용하여 550nm에서 측정되었다. 유기물 분석에 있어서는 ethanol과 acetic acid는 gas chromatography(GC)에 의해 분석되었다. GC 조건은 FID detector, Porapak Q column, oven 온도 200°C, detector 온도 230°C, injector 온도 215°C이다.

한편 수소는 TCE detector가 장착된 GC로 분석하였다. oven 온도는 50°C, injector 온도는 80°C 그리고 detector 온도는 110°C로 하였다. TKN(total Kjeldahl Nitrogen)은 standard method9) 방법에 의해 분석하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. Photo-bioreactor를 이용한 C. reinhardtii의 증식 특성

C. reinhardtii의 배양에 일반적으로 사용되는

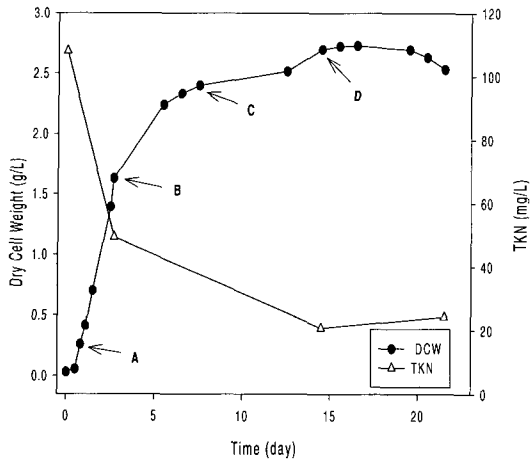


Fig. 1. The growth curve and variation of TKN in photo-bioreactor. (A: early exponential state B: mid exponential state, C: early stationary state, D:mid stationary state)

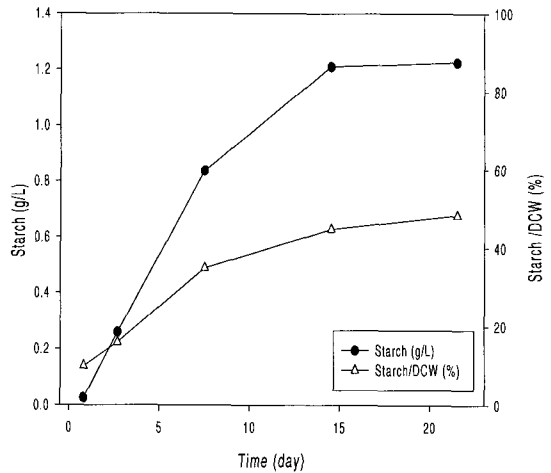


Fig. 2. The variation of starch content in the cell (g/L) and starch content per dry cell weight(%) in photo-bioreactor.

배지는 TAP 배지로서, 그 조성 중에는 gracial acetic acid 와 tris base가 포함된다. 이 두 성분의 본질적인 역할은 buffer로서의 작용이지만, 이들의 첨가로 인해 탄소원과 질소원이 다량으로 공급된다(C source:1360ppm, N source:280ppm), 따라서 *C. reinhardtii*의 성장에 인위적인 영향을 끼칠 뿐만 아니라 대기 중의 CO₂ 고정의 저해 효과도 가져올 수 있다. 따라서 본 연구에서는 gracial acetic acid 와 tris base의 성분이 함유되지 않은 ACP 배지를 사용하여 실험을 하였다.

본 실험을 수행하기에 앞서서 다른 두 종류의 배지(TAP 배지와 ACP 배지)에 대한 *C. reinhardtii*의 성장 특성을 알아보기 위한 실험을 수행하였다. 그 결과 TAP 배지의 경우 pH가 전체 성장 기간 동안 적정 수준으로 유지되었다. 그러나 ACP 배지의 경우 pH가 성장 초반에 4이하로 급격히 감소되면서 더 이상 성장을 하지 않음이 관찰되었다. 따라서 ACP 배지를 사용하여 *C. reinhardtii*를 배양할 경우 pH의 보정이 필수적임을 알 수 있었다(The graph is not shown.).

앞선 실험 결과를 토대로, 2L의 photo-

bioreactor에 ACP 배지를 이용하여 적정 pH를 유지하면서 *C. reinhardtii*를 배양하였으며, 이에 따른 TKN 변화, starch 변화, 유기산 변화를 확인하였다.

Fig. 1을 보면, *C. reinhardtii*의 성장곡선은 하루의 유도기를 거친 후 약 5일 동안의 지수적인 증식을 보였다. 그 결과 DCW가 2.3g/L에 도달하였으며 그 후에도 약간의 증식을 하여 DCW가 최고 2.7g/L까지 이르렀다. 또한 배지 내 함유되어 있던 약 100ppm의 질소원은 *C. reinhardtii*가 지수적인 증식을 하는 동안 대부분이 소비되었다. 그리고, 정지기에 도달할수록 점점 적은 양이 소비되었다. 따라서 *C. reinhardtii*의 증식속도와 질소원 소비속도가 비례함을 알 수 있다.

*C. reinhardtii*는 증식함과 동시에 starch를 세포 내부에 축적하는 것으로 알려져 있다⁷⁾.

Fig. 2는 *C. reinhardtii*의 증식에 따른 starch 축적 경향을 분석하기 위해 각기 다른 성장상태에서 동일한 부피의 샘플을 취해 실험한 결과이다. 그 결과 초기 대수증식기에는 샘플 부피당 starch 량이 거의 0g/L에 가까웠으나, 중기 대수

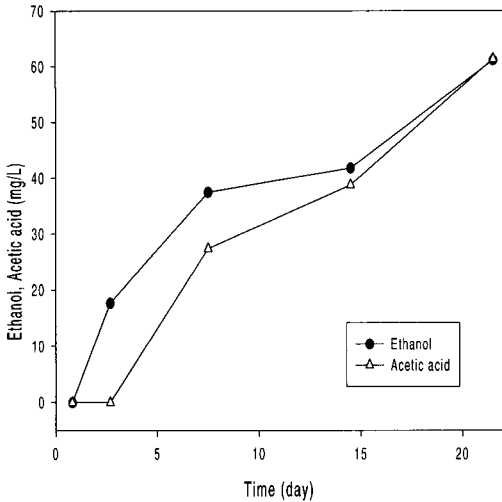


Fig. 3. The variation of ethanol and acetic acid concentration depending on growth states of *C. reinhardtii* in photo-bioreactor.

증식기에는 0.26 g/L의 starch를 세포내에 축적하였다. 그리고 초기 정지기에서는 가장 활발한 축적을 나타내면서 0.83g/L에 까지 도달하였다. 중기 정지기와 사멸기에서 starch 농도는 각각 1.21g/L 1.23g/L에 이르렀다. 그리고 starch 농도를 DCW의 백분율로 나타낸 결과 초기 대수증식기에는 9.85%, 중기 대수증식기에는 15.93%, 초기 정지기에는 34.87%를 나타내었다. 그리고 중기 정지기와 사멸기에서는 각각 44.81%, 48.37%를 나타내었다. DCW의 백분율로 나타낸 starch 농도 역시 샘플 부피당의 starch 량과 마찬가지로 초기 정지기에서 가장 활발한 축적을 보인다. 그리고 중기 정지기에서 가장 높은 starch 축적을 하였으나 사멸기에서는 더 이상의 축적이 일어나지 않았다. 즉, 배양기간이 길어질수록 더 많은 양의 starch를 세포내에 축적하는 것이긴 하지만 세포의 증식이 둔화될수록 세포내 starch 축적 속도는 감소하는 것을 알 수 있었다.

그리고 *C. reinhardtii*가 증식을 하는 동안에도 일부 사멸하는 세포에 의해 ethanol과 acetic acid 등의 유기산들이 생성되어 이들의 농도를 증가시

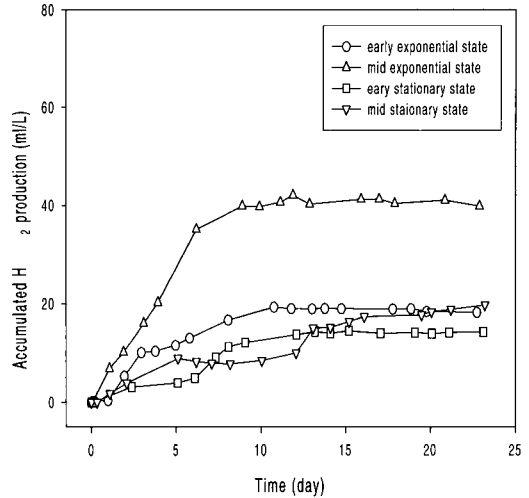


Fig. 4. The accumulated hydrogen production (ml/L) depending on growth states of *C. reinhardtii*.

키는 것이 관찰되었으며, 이를 Fig. 3에 나타내었다. Ethanol과 acetic acid 두 성분은 초기 대수증식기에서 0mg/L를 나타내었고 사멸기에 이르러서는 약 61mg/L를 나타내었다. acetic acid의 농도가 ethanol의 농도보다 약간 낮은 값을 보이긴 하였지만 전체적으로 비슷한 농도와 비슷한 경향을 증가하는 것을 알 수 있었다.

3.2. 암반응에 의한 각 growth state에 따른 H₂ 및 유기물 생산

암반응에 의해 발생하는 수소 및 유기산 생성 정도를 *C. reinhardtii*의 증식 상태에 따라 비교 분석하기 위해, 각 증식상태별로 암반응을 수행하였다. 이 실험에는 Fig. 1에 표시된 4 지점(A, B, C, D)에서의 시료들, 즉 초기 대수증식기, 중기 대수증식기, 초기 정지기(후기 대수증식기), 그리고 중기 정지기에서의 *C. reinhardtii*가 동일량으로 sampling되었다.

그 결과 Fig. 4, Fig. 5, Fig. 6 및 Table 1과 같은 실험 결과를 얻었다. Fig. 4는 *C. reinhardtii*의 증식상태에 따라 누적된 수소 생산량을 나타낸

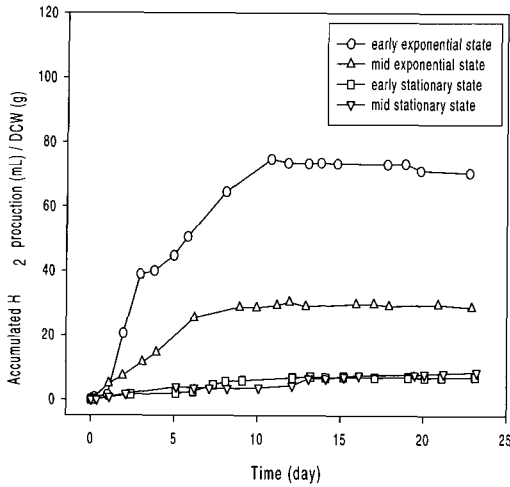


Fig. 5. The accumulated hydrogen production (ml/L) per dry cell weight(g/L) depending on growth states of *C. reinhardtii*.

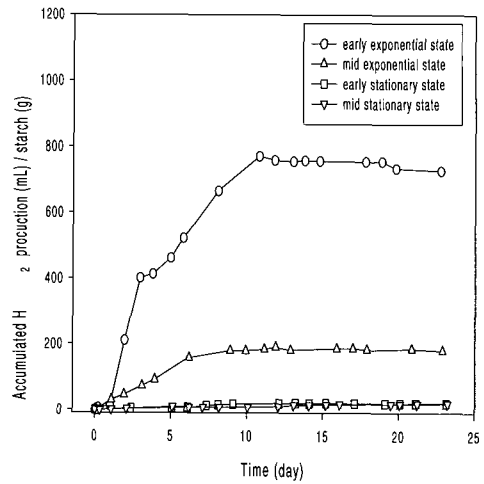


Fig. 6. The accumulated hydrogen production (ml/L) per starch content (g/L) depending on growth states of *C. reinhardtii*.

것이다. 발생된 누적 수소생산량만을 고려한다면 중기 대수증식기에서 40ml/L로 가장 많은 수소가 생산 되었다. 초기 대수증식기에서는 19ml/L가 생산되었으며, 초기 정지기와 중기 정지기는 14~17ml/L로 서로 비슷한 양으로 생산되었다. 수소생산 속도 역시 중기 대수증식기에서 4.755ml/L*d로 다른 증식상태에 비해 월등히 높은 값을 나타내었다. 초기 대수증식기, 초기 정지기, 중기 정지기는 각각 1.902ml/L*d, 1.170ml/L*d, 0.923ml/L*d의 값을 나타내었다(Table 1). 따라서 *C. reinhardtii*는 상대적으로 활성 정도가 낮은 단계에 비해 생물학적 활성이 높은 단계인 중기 대수증식기에서 비교적 빠른 속도로 많은 양의 수소를 생산하는 것을 알 수 있었다.

Fig. 5와 Fig. 6은 건조중량당 수소 생산량과 단위 starch당 수소 생산량을 나타낸 것이다. 이 두 그래프는 증식상태에 따른 기질 이용효율에 관해서 서로 동일한 경향을 나타낸다. 수소생산 시 *C. reinhardtii*가 동일한 양의 기질, 즉 DCW 또는 starch를 이용한다고 가정할 경우, 초기 대수증식기에서 생산되는 수소량은 74ml/DCW-g 또는

771ml/starch-g으로 가장 높은 값을 나타내었다. 그 다음으로 중기 대수증식기에서 30ml/DCW-g 또는 192ml/starch-g의 값을 보였다. 초기 정지기와 중기 정지기에서는 7~8ml/DCW-g 또는 19~20ml/starch-g으로 서로 비슷한 값을 보였다. 이 결과에 따르면 *C. reinhardtii*의 증식을 초기 대수증식기로 유지시켜 수소를 생산하게 하는 것이 기질 이용효율 면에서 가장 효율적이며 바람직하다. 그러나 비록 기질의 이용효율이 높다 하더라도 초기 대수증식기는 Fig. 1에서 설명한 바와 같이 극히 낮은 DCW(0.26g/L)를 가지고 있기 때문에 전체 수소발생량은 중기 대수증식기보다 낮다 (Fig. 4). 따라서 이러한 초기 대수증식기의 *C.*

Table 1. The rate of hydrogen production depending on growth states of *C. reinhardtii*.

	early exponential state	mid exponential state	early stationary state	mid stationary state
Rate of hydrogen production (ml/L*d)	1.902	4.755	1.170	0.923

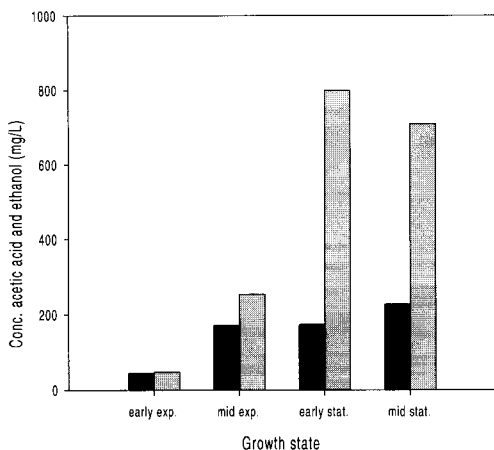


Fig. 7. The organic material production at the termination of the hydrogen production (exp.: exponential state, stat.: stationary state)

reinhardtii를 이용하여 수소를 대량 생산하기 위해서는 아주 거대한 플랜트를 건설해야 한다. 그러나 이것은 경제적 측면으로 볼 때 아주 비효율적이다. 그러므로 중기 대수증식기의 C. reinhardtii를 이용하여 수소생산 실험을 하는 것이 타당할 것으로 생각된다.

암반응에 의한 수소 생산에 사용된 C. reinhardtii의 유기산 생성 정도를 알아보기 위해 각각의 증식 상태별로 ethanol과 acetic acid를 분석하였으며, 이 결과를 Fig. 7에 나타내었다. 이 결과는 수소생산 실험을 종료하여 약 23일 경과된 후 C. reinhardtii의 대사산물로 생성된 ethanol과 acetic acid 농도를 분석한 것이다. 증식 상태별로 본 acetic acid의 농도 변화는, Fig. 7에서 볼 수 있듯이, 초기 대수성장기에서 45mg/L, 중기 대수성장기에서 171mg/L, 초기 정지기에서 173mg/L, 중기 정지기에서 227mg/L를 나타내었다. 그리고 ethanol의 농도는 초기 대수성장기에서 47mg/L, 중기 대수성장기에서 254mg/L, 초기 정지기에서 789mg/L 그리고 중기 정지기에서 709mg/L가 생성되었다. Acetic acid와 ethanol의 농도를 비교해보면, acetic acid의 경우, 성장상태

별로 농도의 변화가 크게 나타나지 않으며 초기 대수증식기를 제외하고는 비슷한 농도로 측정되었다. 그러나 ethanol의 경우는 증식 상태별로 급격히 증가하다가 초기 정지기에서 최고의 농도를 나타내었으며 중기 정지기에서 약간의 감소를 나타내었다.

4. 결론

이단 배양을 통하여 명반응에서는 C. reinhardtii의 증식특성을 분석하고, 암반응에서는 증식 상태에 따른 수소와 유기물 생산성을 분석한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

명반응에서의 실험 결과,

- 1) 증식속도와 질소원의 소비속도는 비례하였다.
- 2) C. reinhardtii의 세포 내 starch 축적은 배양 기간이 길어질수록 더 많은 양을 축적하였으나 세포의 증식이 둔화될수록 세포 내 starch 축적 속도는 감소하였다.
- 3) C. reinhardtii가 증식하는 동안 ethanol과 acetic acid의 농도가 증가하였다.

암반응에서의 실험 결과,

- 1) 누적 수소 생산량은 중기 대수증식기에서 가장 많았으며 수소 생산 속도 또한 4.755 ml/L*d로 가장 높았다.
- 2) 수소 생산에 이용되는 기질의 이용효율은 early exponential state에서 가장 좋았다.
- 3) 생성되는 유기물량은 acetic acid의 경우 증식상태에 따라 큰 변화가 나타나지 않았으나, ethanol의 경우 초기 정지기에서 가장 높았다.

후 기

본 연구는 과학기술부의 국책기술연구사업으로 고효율 수소제조기술개발사업의 일환으로 수행되었으며 연구비 지원에 감사드립니다.

참 고 문 헌

- 1) Hansel A. and Lindbald P., "Towards optimization of cyanobacteria as biotechnologically relevant producers of molecular hydrogen, a clean and renewable energy source", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, Vol. 50, 1998, pp. 153-160.
- 2) Lichtl, Rixa R., Baxin, Michael J., Hall, DAvid O., "The biotechnology of hydrogen production by *Nostoc flagelliforme* grown under chemostat conditions", *Applied microbiology and biotechnology*, Vol. 47, 1997, pp.701-707.
- 3) Miura Y., Yamada W., Hirata K., Miyamoto K., Kiyohara M., "Simulation of hydrogen production in algal cells grown under high CO₂ concentration and low temperature", *Appl. Biochem. Biotechnol.*, Vol. 39/40, 1993, pp. 753-761.
- 4) Maeda I., Hikawa H., Miyashiro M., Yagi K., Miura Y., Miyasaka H., Akano T., Kiyohara M., Matsumoto H., Ikuta Y., "Enhancement of starch degradation by CO₂ in a marine green alga, *Chlamydomonas* sp. MGA 161", *J. Ferment. Bioeng.*, Vol. 78, No. 5, 1994, pp. 383-385.
- 5) Miura Y., "Hydrogen production by biophotolysis based on microalgal photosynthesis", *Process Biochemistry*, Vol. 30, No. 1, 1995, pp. 1-7.
- 6) Kosourov, S., Tsygankov, A., Seibert, M., Maria L., "Sustained hydrogen photoproduction by *Chlamydomonas reinhardtii*: Effects of culture parameters", *Biotechnology and bioengineering*, Vol. 78, 2002, pp.731-740
- 7) Elizabeth H. Harris, "The *Chlamydomonas* Sourcebook : A comprehensive Guide to biology and Laboratory Use", Academic Press, Inc., 1989.
- 8) Kim M. S., Moon K. W., Lee I. G., Lee T. J., Sung C. K., "Hydrogen Gas Production by Fermentation From Various Sugars Using *Clostridium butyricum* BCIB 9576.", *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, Vol. 27, No. 1, 1999, pp. 62-69.
- 9) Andrew D. Eateon, lenore S. Clesceri, Arnold E. Greenberg, "Standatrd methods for examination of water and wastewater", APHA, 19th edit. 1995.