

(16) 基質の除去特性と混合微生物集団の構成に関する基礎的研究

COMPOSITION OF BACTERIAL POPULATION FROM PROPERTY OF
REMOVAL ACTIVITY OF SELECTED SUBSTRATES

生 方 悠
Yuu UBUKATA

ABSTRACT; Bacterial population in mixed culture is evaluated from the property of removal activity of selected substrates in considering of the substrate interaction. When the substrate interaction does not occur in removal of the mixture of two substrates, i.e., the TOC removal rate of the mixture is shown by the summation of the TOC removal rate of each substrate, it is recognized that there are two kinds of bacteria which uptake different substrates, respectively. When this interaction occurs, i.e., the TOC removal rate of the mixture is shown by the TOC removal rate of one of substrates, it is recognized that identical bacteria uptake one of two different substrates each other. The concept of the substrate interaction is also valid from the respiration rate of mixed culture. The activated sludge acclimated with acetate is composed of three kinds of bacteria which uptake acetate, glucose and medium-chain saturated fatty acids, respectively, however medium-chain fatty acids such as butyrate, valerate and caproate, are uptaken by identical bacteria.

KEYWORDS; Composition of bacterial population, Acetate activated sludge,
Substrate removal activity, Substrate interaction.

1. 結 論

活性汚泥のような混合微生物系における細菌種を株単位まで同定することもその微生物相を解析する上で重要であろう。しかしこの方法ではそこに存在する微生物が如何なる有機物を利用しているかの情報は全く得られない。そこで本論文では活性汚泥のような混合微生物系において、特定の基質を利用する細菌群を基質間の相互作用を考慮した種々の基質の除去速度から解析する方法について提案する。また本論文では基質間の相互作用の測定及び計算方法について詳述するとともに、ペプトン活性汚泥における基質間の相互作用について混合基質除去時における呼吸速度の相互作用の観点からその妥当性を実証し、更に単純な基質である酢酸で培養した活性汚泥における細菌群の構成について解析してみた。

純粋および混合培養系の場合でも、細菌による基質の貯蔵現象がなければある基質（有機物）の除去（取り込み）速度は、系全体におけるその基質の分解代謝系において律速段階となる酵素濃度（量）に比例しているものと考えられる。もし細菌群の活性度が同じであるなら、酵素量とそれを利用している細菌群の細胞数の間には比例関係が推定される。ところがグルコース効果で代表されるように基質間に相互作用を生じる基質が存在する場合には、単独の基質の除去速度の総和ではその系の基質除去に関与する細菌群の量を把握することはできない。その理由は混合基質除去時において基質間に相互作用が生じている基質の場合には、単独の基質除去時においては二種の基質に対する同一細菌群の生理的側面を表しているからである。

活性汚泥中に存在している他栄養細菌は外部環境（基質）の変化に応じてその生理活性を変化させることが出来る。他栄養細菌がある基質を利用するためには1連の分解酵素系が必要である。量的な面から見ればそれほど厳密ではないが、分解酵素は構成酵素と誘導酵素に分けられる。他栄養細菌に対して構成酵素では分解できないある基質が与えられた場合、細胞内に誘導酵素が合成されるまではその基質を利用することができない^{1,2,3)}。活性汚泥細菌のように世代時間の長い細菌では新たな有機物に対して曝気槽滞留時間である5-6時間の馴致では分解酵素を誘導することはできないものと考えられる。

大腸菌に関しては、グルコースを除く単糖や複糖、酢酸などの有機酸および各アミノ酸をエネルギー源有機物とする分解酵素は誘導酵素に属している^{1,2,3)}。エネルギー源有機物の存在の下では生合成源の基質も取り込まれる。細菌細胞の約6割は蛋白質で構成されており⁴⁾、アミノ酸は生合成源の基質として多量に利用されるので、アミノ酸に対して構成酵素を持つ微生物の存在も考えられる。各アミノ酸は微生物のエネルギー有機物の他に生合成源有機物としても用いられているので、ペプトン培養活性汚泥における各種基質利用微生物群の解析には困難な問題があったものと考えられる^{5,6)}。

2. 実験方法・基質間の相互作用の測定方法・その他

2.1 活性汚泥実験

アミノ酸及び短・中鎖飽和脂肪酸の除去実験に用いた活性汚泥は、都市下水を処理する活性汚泥処理場の返送汚泥をペプトン及び酢酸（酢酸アンモニウム：酢酸ナトリウム = 3:7）で各々半年以上馴致・培養したものである。活性汚泥の培養は5Lのポリビーカーを用いて回分法で行ない、有機物負荷はペプトン、酢酸で各々0.2, 0.4 g/g MLSS/Dである。無機塩としてはBOD測定用の補強液を基質添加時に適量加え、また微量金属は週2-3回活性汚泥を水道水で数回洗浄することで補給した。活性汚泥の培養と有機物除去実験及び活性汚泥の呼吸速度の測定は20°Cの恒温室で行なった。有機物除去実験において活性汚泥は先ず0.5mmのふるいを通し夾雑物を除去し、その後活性汚泥を沈澱させ水道水で数回洗浄した。MLSS濃度は約700-1500 mg/lであるが測定項目毎での活性汚泥濃度はどの反応槽でも一定である。各測定時間毎の試料は活性汚泥混合液をピペットで20cc採り、50ccのメスシリンダーで2-3分静止沈澱させ、その上清をWhatman GF/Fでろ過し、そのろ液を溶解性有機物試料とした。各実験毎の試料採取及び呼吸速度の測定は5回行ない、その時間間隔は1.5時間と2時間の2種類である（ただし酢酸活性汚泥の場合の測定間隔は1時間で、測定回数も多い）。試料中の基質濃度の測定には島津TOC-500を使用した。各測定時間毎の活性汚泥混合液をピペットを用いて40ccの酸素ビンに移し、ゴム栓で密閉できるようにした酸素電極を入れ、溶存酸素濃度を測定した。攪拌にはアクロバットスターを用い溶存酸素濃度の変化から活性汚泥の呼吸速度を計算した。溶存酸素濃度の測定にはBeckmann, Model 777を、また記録計にはTDA, EPA-100Aを用いた。なお酢酸と吉草酸の混合物における各脂肪酸の濃度は高速液体クロマトグラフィーにより測定した。

2.2 基質間の相互作用の測定方法

1組の基質間の相互作用の大きさを測定する場合には3個の活性汚泥反応槽を用い、各々の反応槽には同量の活性汚泥を添加し、2個の反応槽には単独の基質をまた残りの反応槽には2種の基質を各々同量づつ混合物として添加した。例えば反応槽500mlの場合、培養活性汚泥濃度4000mg/l、貯蔵濃厚基質2000 mg/lから各々100ml採り、水を300（混合基質の場合のみ200）ml添加すると反応槽の活性汚泥濃度は800 mg/l、各基質濃度は400 mg/lとなる。各有機物に対する有効な測定回数は最小でも3回は必要と考えたので、各反応槽における初期基質濃度は基質の除去速度を考慮して、400 mg/l, 200 mg/lとした。各反応槽における攪拌と酸素供給はエアストーンを通して圧縮空気で行なった。なお3組の基質間の相互作用の測定には6反応槽で良いので効率的である。

通常の活性汚泥処理実験におけるアミノ酸は窒素源として添加するが、本実験ではアミノ酸のみを基質として添加している。過剰のアミノ酸は脱アミノ反応により一般の有機物として分解代謝される。したがって

本実験で使用されたアミノ酸は活性汚泥のエネルギー源基質として利用されていることになる。

本文においてはアミノ酸はすべて略号を用いた。Asp-アスパラギン酸、Glu-グルタミン酸、His-ヒスチジン、Ser-セリン、Arg-アルギニン、Gly-グリシン、Thr-トレオニン、Ala-アラニン、Val-バリン、Phe-フェニルアラニン、Ile-イソロイシン、Leu-ロイシン、Lys-リジン。

2.3 基質独立性指標及び呼吸速度独立性指標

2種の各基質間における相互作用の大きさは基質独立性指標で表現するものとする。本来なら基質間の相互作用が大きいほど大きな値を示す指標が良いのであろうが、ここでは2種類の基質混合物の除去速度が単独の基質除去速度の和に対する割合を示す指標を用いた。何故なら基質独立性指標が1.0(100%)の場合には各々の基質を取り込む細菌群は他の基質及び細菌群の存在に影響されず、各々の基質の取り込みは他の基質の存在から独立しており、基質除去の重ね合わせが成立するからである。以前の論文では、この基質独立性指標を基質選択性指標(Substrate Selectivity Index: SSI)と表現していた^{5,6)}。

基質独立性指標(Substrate Independency Index = SII)は次式で定義する。

$$SII = c / (a + b) = (co - ci) / [(ao - ai) + (bo - bi)] \quad (1)$$

ここにおいて a, b, c: 基質A、B単独及び基質A・Bの混合物の除去速度

ao, bo, co: 基質A、B単独及び基質A・B混合物の初期濃度

ai, bi, ci: 基質A、B単独及び基質A・B混合物のi時間後の濃度

例えば、ある細菌は基質A、Bに対して分解酵素を誘導できるとする。基質Aで培養したその細菌の基質Aの除去速度をaとし、また基質Bで培養したその細菌の基質Bの除去速度をbとする。各々の基質で培養した細菌の混合物による基質A・B混合物の除去速度は $c = a + b$ となる。従って基質A・B間の基質独立性指標は100%となり、基質A、Bを取り込む細菌群は異なる機能を持った細菌群で構成されていることになる。一方ある細菌は基質Aに対しては構成酵素を持つとする。基質Bで培養したその細菌の基質Aの除去速度をaとし、また基質Bで培養したその細菌の基質Bの除去速度をbとする。グルコース効果発見の基となったジオキシ現象に見られるように、多くの細菌は二種の有機基質が与えられた場合、より速かな増殖を促がす基質(特に構成酵素を持つ)を先に利用する。そのため基質Bで培養されたその細菌の基質A・B混合物の除去速度は $c = a$ となる。従ってこの場合には、基質Bを分解代謝できる1連の酵素系が基質除去には関与しない状態に置かれていることになる。このように基質間に相互作用が生じている場合には、同一機能を持つ細菌群のそれらの基質に対する生理的側面を表していることになる。以前にはグルコース効果と呼ばれていた基質間の相互作用も、その後種々の基質間に見いだされ、その機構もより速かな増殖を促がす基質の代謝物が他の基質の代謝を阻害することが判明したので現在ではカタボライト抑制と称されている⁷⁾。なお2種の基質が細胞膜を透過できるならば、同じ代謝経路を用いて分解される2種の基質の場合にも見かけ上上記と同一の現象が起こる。基質の除去速度a, bが類似している場合のSIIは50%近くで示される。ところが基質の除去速度が1桁も異なる場合のSIIは90%前後の数値を示すことになるので注意を要するが、このような事態は希であろう。要するに基質間の相互作用の大きさはSIIの測定値が100%に近い値を取るか、または細菌の生理的側面を示す値のどちらに近いかで判断すれば良いことになる。

2種類の各基質間における呼吸速度の相互作用の大きさは呼吸速度独立性指標で表現するものとする。その理由及び意味内容は基質独立性指標に対するものと同じである。呼吸速度独立性指標は基質独立性指標の概念の妥当性を実証する為の概念であり、歴史的には酵素誘導や基質間の相互作用の研究は純粋培養細菌の呼吸速度を基に推定されてきたからである¹⁾。好気性細菌の呼吸速度は基質により若干の差はあるもののTCA回路に流入するピルビン酸などの代謝有機物量に比例しており、この代謝有機物量は基質間の相互作用を受けた後の基質量と考えられる。嫌気性分解においては代謝産物量を測定することにより細胞内での代謝量が把握できるが、好気性分解においては利用された酸素量により有機物の代謝量が把握できる。

呼吸速度独立性指標(Respiration Independency Index = RII)は次式で表現するものとする。

$$R_{II} = R_c / (R_a + R_b) \quad (2)$$

R_a 、 R_b 、 R_c : 各測定時間毎の基質 A、B 単独および基質 A・B 混合物の呼吸速度

3. 実験結果および考察

3.1 ペプトン培養活性汚泥によるアミノ酸の取り込み

(1) ペプトン培養活性汚泥によるアミノ酸の取り込みと呼吸速度

36 回の単独アミノ酸及びアミノ酸混合物の除去実験において、多くのアミノ酸は TOC 濃度が 15 mg/l 程度以下になると呼吸速度が急激に減少しblank値に近づいた。このことから TOC濃度が 15 mg/l 以上においては基質の取り込みは基質濃度の影響を受けない零次反応の範囲と判断し、実験結果を測定値として採用した。ただし Leu のみが TOC 濃度が 30 mg/l 程度以下になると呼吸速度と基質の除去速度が徐々に低下したので、測定値から除外した。

アミノ酸の除去速度が基質濃度の影響を受けないと考えられる範囲において各アミノ酸の除去速度は処理時間の経過に伴ない次の4型に分けられた。(i) 一定 Gly. (ii) 初期吸着と考えられる1時間以内に TOC 値で 10-20 mg/l の低下があり、その後は一定 Leu, Val, Ile, Lys, His, Thy. (ii) やや減少 Ala, Ser.

(ii) やや増加 Glu, Asp, Phe, Arg.

また呼吸速度が基質濃度の影響を受けないと考えられる範囲において各アミノ酸の呼吸速度は次の4型に分けられた。(i) 一定 Leu, Val, Ile, Lys, His, Thr. (ii) 1.5 倍程度まで増加 Ala, Glu, Asp, Phe, Arg. (ii) ほんのわずかに低下 Ser. (ii) 一度 70% 程度まで低下してから初期速度まで増加 Gly.

(2) 基質独立性指標及び呼吸速度独立性指標の計算方法

2 種の基質混合物の除去において基質除去はほとんど直線的であり、呼吸速度も単独基質のそれに較べて変化は少なくほぼ一定の値を示した。使用したアミノ酸の中で基質除去及び呼吸速度の型の組合せが複雑であり、ある意味で解析が1 番困難な基質の組合せとして、Glu, Ser, Gly の3 種のアミノ酸を選択した。

単独のアミノ酸及びそれらのアミノ

酸を組合せた基質の除去速度と呼吸速度の測定結果を図-1 に各々示す。

またそれらの基質間の基質独立性指標

及び呼吸速度独立性指標(基質の呼吸速度はblank値を引いてある)の計

算方法を表-1、2 に各々示す。処理時間4時間までにおける TOC 除去量は、

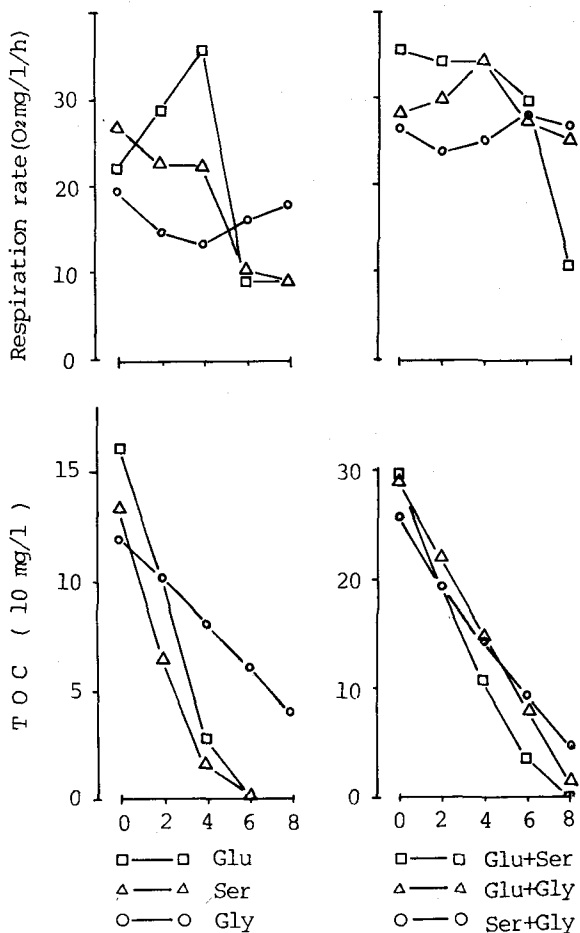


Fig. 1 TOC removal and respiration rate

Table 1. Calculating procedure for SII

	1	2	3	mixture	1	2	3	4	5
Glu	163	29	134	Glu + Ser	296	108	188	252	75
Ser	134	16	118	Glu + Gly	290	152	138	174	80
Gly	120	81	39	Ser + Gly	259	143	116	157	74

1:Initial*, 2:Final*, 3:Removal(2-1)*,

4:Sum of each substrate removal*, *: (TOCmg/l)

5:Substrate Independancy Index (SII), (%), (3/4)

Table 2. Calculating procedure for Respiration Independancy Index (RII)

h	Glu	Ser	Gly	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	18.0	22.5	15.0	31.5	40.5	78	24.0	33.0	73	22.5	37.5	60
2	24.5	18.0	10.5	30.0	42.5	71	25.5	35.0	73	19.5	28.5	68
4	31.5	18.0	9.0	30.0	49.5	61	30.0	40.5	74	22.0	27.0	81
				mean		70			73			70

1:Respitaiton rate (RR) of Glu/Ser mixture *, 2:Sum of each RR of Glu and Ser*, *: (O_2 mg/l/h)

3:Ratio of RR of substrate mixture for sum of RR of each substrate (RII), (%), (1/2)

4-6:in case of Glu and Gly, following to 1-3, 7-9:in case of Ser and Gly, following to 1-3.

Table 3. Substrate Independancy Index (SII) and Respiration Independancy Index (RII)

substrate	SII	RII	substrate	SII	RII	substrate	SII	RII
Phe - Leu	96	82	Ala - Ser	55	59	Glu - Ser	75	70
Phe - Lys	85	77	Ala - Gly	73	72	Glu - Gly	80	73
Leu - Lys	92	90	Ser - Gly	70	64	Ser - Gly	74	70
Phe - Leu	79	69	Ala - Ser	64	60	Glu - Asp	70	70
Phe - Arg	88	73	Ala - Asp	77	70	Glu - Ser	76	67
Leu - Arg	80	79	Ser - Asp	73	63	Asp - Ser	82	75

Glu - Gly 混合物においては Glu の除去量に近い値を、また Ser - Gly 混合物では Ser のそれに近い値が得られている。ところが処理時間8時間においては Glu - Gly 混合物における TOC 値は Gly 単独のそれより低い値を示している。前者の現象はカタボライト抑制で説明されるのかも知れないが、後者の現象から推定するとペプトン活性汚泥は混合培養系であるのでより複雑な基質間の相互作用が生じているものと思われる。表-2に示すように、各呼吸速度独立性指標の計算結果には大きな変動を示すものもあったが、その平均値は基質独立性指標が大きくなるほど呼吸速度独立性指標も大きくなっていった。このような計算方法により必須アミノ酸間で6組、非必須アミノ酸間で12組、合計18組の基質に対する基質独立性指標及び呼吸速度独立性指標の計算結果を表-3に示す。同一の基質間においても、活性汚泥中の細菌相が変化しているらしく測定日によりそれらの値には若干の変動はみられた。必須アミノ酸混合物における基質独立性指標と呼吸速度独立性指標の値は大きく、また非必須アミノ酸混合物における基質独立性指標と呼吸速度独立性指標は小さな値が得られた（特に Ala - Ser の場合には各々 55, 59%）。これらの関係を図-2に示すが、基質独立性指標が大きくなるほど呼吸速度独立性指標が大きくなるという強い正の相関関係が得られた。これらの結果から基質独立性指標の概念の妥当性が呼吸速度独立性指標で実証されたことになる。

3.2 酢酸培養活性汚泥による中・短鎖飽和脂肪酸及びグルコースの取り込み

図-3に示すように酢酸培養活性汚泥による各基質の除去において、酢酸は直線的に除去されていたが酪酸・吉草酸・カブロン酸の中鎖飽和脂肪酸は始めの1時間程度は除去速度がやや遅くその後直線的に除去されていた。酪酸・吉草酸・カブロン酸の酢酸に対する相対除去速度は12-14%とほぼ一定であった。なお酢酸の除去における呼吸速度は基質が存在する間は一定であり基質がなくなると急速にブランク値に近づいたが、一方酪酸・吉草酸・カブロン酸の呼吸速度は時間を経るに従って徐々に増加していた。各基質の除去速度、基質間の基質独立性指標及び呼吸速度を表-

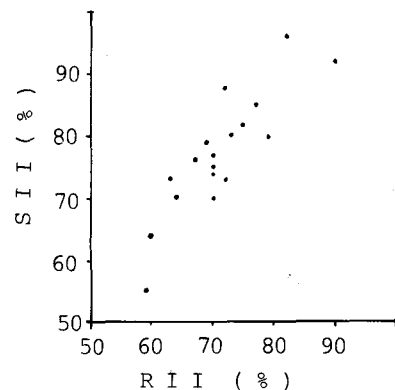


Fig. 2 Correlation between SII and RII

Table 4. Substrate removal rate, Substrate Independancy Index and Respiration rate

removal rate*	substrates	SII	respiration rate (O ₂ mg/l/h)									
Acetate	25.1	Acetate-Valerate	96	h	A	B	C	D	E	F	G	H
Butyrate	3.23	Acetate-Caproate	95	0	26.0	4.5	3.0	2.0	28.0	26.5	4.5	3.5
Valerate	3.55	Caproate-Valerate	61	1	22.5	5.0	3.5	3.5	25.0	24.0	6.0	4.0
Caproate	2.90	Caproate-Butyrate	58	2	22.5		4.0	4.0	24.0	24.0		5.0
Glucose	0.70	Glucose-Valerate	100	3	22.5	6.0	4.5	4.0	24.0	24.0	7.5	6.0
		Glucose-Acetate	101	4	3.5				5.0	4.0		
*:(TOCmg/gSS/h)				5	2.5	6.0	5.0	4.5	5.0	4.0	7.5	6.5
A: Acetate, B: Butyrate, C: Valerate, D: Caproate,												
E: Acetate+Valerate, F: Acetate+Caproate, G: Caproate+Butyrate, H: Caproate+Valerate												

*:(TOCmg/gSS/h)

A: Acetate, B: Butyrate, C: Valerate, D: Caproate,

E: Acetate+Valerate, F: Acetate+Caproate, G: Caproate+Butyrate, H: Caproate+Valerate

4に示す。なお他の実験系で得られた酢酸・吉草酸・グルコース間の基質独立性指標も表-4に示す⁷⁾。

表-4に示すように、酢酸と吉草酸およびカプロン酸各々の混合物の除去においては基質独立性指標が95%以上(生理的側面と仮定すると90%以下となる)と高く、また呼吸速度においても各々の呼吸速度の重ね合わせがほぼ成立している。カプロン酸と吉草酸及び酪酸との間の基質独立性指標は60%前後を示しているように、これらの基質混合物の除去速度は単独の場合の速い方の基質の除去速度を示している。またこれらの基質混合物における呼吸速度もどちらか一方の基質の呼吸速度とほとんど同じ値を示している。このことは酪酸・吉草酸・カプロン酸の中鎖飽和脂肪酸を取り込んでいる細菌群は同一の機能を持った細菌群であると判断できる。酢酸と吉草酸の混合物の除去時における各脂肪酸の濃度を高速液体クロマトグラフィで分析したところ、酢酸の除去は単独基質除去の場合と全く同じであったが、吉草酸の除去は単独基質除去の場合に較べて約1時間の時間遅れが出ていた。この時間遅れを考慮しない場合の基質独立性指標は96%であるが、時間遅れを考慮すると1時間以降における基質独立性指標は100%となり有機物除去の重ね合わせが完全に成立していた(図-4)。なお別の実験系において、グルコースと酢酸及び吉草酸との混合物の基質独立性指標は100%を示し、また呼吸速度においても各々の呼吸速度の重ね合わせが成立していた。

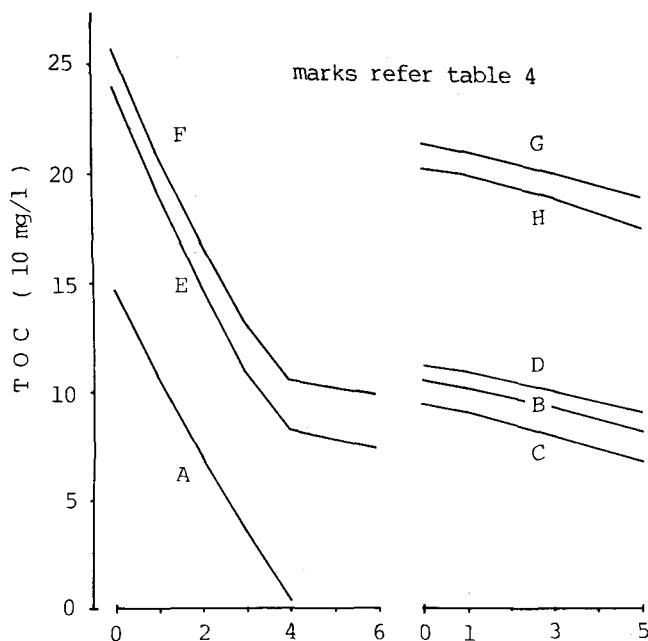


Fig. 3 Removal of fatty acids.

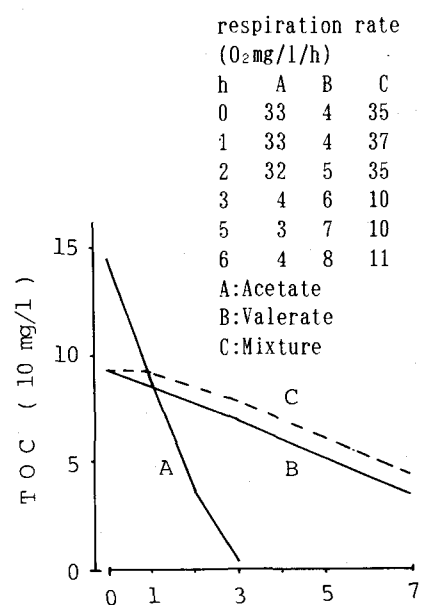


Fig.4 Acetate & valerate by HPLC

これらのことからグルコース、酢酸、吉草酸を取り込む細菌群は異なるものと判断される。

以上の実験結果を総合すると、酢酸活性汚泥の中には酢酸、酪酸・吉草酸・カブロン酸の中鎖飽和脂肪酸およびグルコースを各々取り込む細菌群が存在しているものと判断される。なおこの酢酸培養活性汚泥による Glu, Ser などのアミノ酸の除去速度は酪酸など中鎖飽和脂肪酸のそれとほぼ同じであった⁷⁾。これらのアミノ酸を取り込む細菌群も存在するものと考えられるが、基質間の相互作用を測定していないので細菌群の相違が細菌の生理的側面であるのかの厳密な判断は出来ない。

4. 結 論

活性汚泥のような混合微生物系において、特定の基質を利用する細菌群を基質間の相互作用を考慮した種々の基質の除去速度から把握する方法について提案した。基質間の相互作用の大きさを測定する実験方法および計算方法について具体的に記述した。

グルコース効果に代表される基質間の相互作用の大きさを基質独立性指標で表現した。基質独立性指標は基質混合物の除去速度が単独の基質除去速度の和に対する割合で示す。ペプトン活性汚泥における基質間の相互作用の大きさとその基質除去時における呼吸速度の相互作用の大きさとの間には強い正の相関関係が見いだせ、基質間の相互作用の大きさは基質独立性指標で表現できることが実証された。なお具体的には必須アミノ酸混合物における基質独立性指標と呼吸速度独立性指標の値は大きく、また非必須アミノ酸混合物における基質独立性指標と呼吸速度独立性指標は小さくなっていた。

基質の除去および呼吸速度における相互作用の結果から解析したところ、酢酸と無機塩で培養された活性汚泥中には、酢酸、酪酸・吉草酸・カブロン酸の中鎖飽和脂肪酸およびグルコースを取り込む細菌群などで構成されてものと判断された。酢酸、グルコース、酪酸など中鎖飽和脂肪酸を取り込む細菌群は異なっており、また酪酸・吉草酸・カブロン酸の中鎖飽和脂肪酸はほぼ同一の細菌群により取り込まれているものと判断された。なお種々のアミノ酸を取り込む細菌群の存在も示唆された。

種々の基質に対して基質間の相互作用が認められない基質の場合には、その基質を取り込む細菌群の量的把握が可能となるので活性汚泥などの混合微生物反応槽における微生物相の遷移などが解析できることになる。また基質間の相互作用が大きい基質の場合には、それらの基質に対して同一の基質取り込み機能を持つ細菌群の生理的側面が把握できることになる。

本研究を遂行するに当たり種々の配慮を賜った 川口士郎教授 を始めとする都立大学工学部衛生工学研究室の皆様へ深謝申し上げます。また TOC 計の使用について便宜を頂いた 田中康男主事を始めとする東京都下水道局計画部技術開発課水質係の皆様へ御礼申し上げます。更に本論文を書くきっかけを作ってくださった東京大学工学部都市工学科 花木啓祐助教授 に対しても深謝申し上げます。

<参 考 文 献>

- 1) J. Monod(1947) : The Phenomonon of Enzymatic Adaptation, Growth, Vol. 11, p223-
- 2) 高橋 甫 他訳(1978) : 微生物学 (上) (スタニア他原著第4版)、8章、培風館、
- 3) 柳田友道(1980) : 微生物科学 1、3章、学会出版センター、
- 4) G. Gottschalk(1986) : Bacterial Metabolism (2nd. Ed.), Chp. 3, Springer-Verlag,
- 5) 生方 悠(1989) : 衛生工学研究論文集、土木学会 Vol. 25, p109-
- 6) 生方 悠(1988) : 衛生工学研究論文集、土木学会 Vol. 24, p95-
- 7) 生方 悠(1989) : 第23回水質汚濁学会講演集 p115-