Lactobacillus casei SM 3 株の糖蜜アルコール 蒸留廃液脱色特性

鈴木昌治・谷垣元揮・長野晃弘*・藤本尚志・高橋力也
(東京農業大学応用生物科学部醸造科学科, 三機工業(株)開発本部*)

平成 11 年 4 月 26 日受理

Decolorization of Wastewater from a Molasses Alcohol Distillery with *Lactobacillus casei* SM3

Masaharu SUZUKI, Motoki TANIGAKI, Akihiro NAGANO,
Naosi FUJIMOTO and Rikiya TAKAHASHI

(Department of Brewing and Fermentation, Tokyo University of Agriculture,
1-1-1 Sakuragaoka, Setagaya, Tokyo, Japan 156-8502.

*Department of Development, Sanki Engineering Co., Ltd.,
1742 7 Shimotsuruma, Yamato, Kanagawa 242, Japan.)

Lactobacillus casei SM3, which has the ability to decolorize the molasses pigment in the distilled wastewater produced during the alcoholic fermentation of cane molasses (distilled wastewater), was investigated to determine its optimal culture conditions and decolorization characteristics, and its ability to decolorize distilled wastewater was evaluated. This strain decolorized approximately 30 % of the molasses pigment present in distilled wastewater with 12,000 color units supplemented with 0.5 % (w/v) glucose when incubated at 30°C for 24 hours under semi-anaerobic conditions. This decolorization was due to the removal of pigment components belonging to the larger molecular weight fractions (more than 10,000) of the molasses pigment molecules. On the contrary, pigment components belonging to the smaller molecular weight fractions (less than 10,000) underwent little decolorization.

Key words : 糖蜜アルコール蒸留廃液, 脱色特性, *Lactobacillus casei* SM3

緒 言

前報¹⁾までに、糖蜜アルコール蒸留廃液(以下、蒸留廃液)に対して脱色活性を発現する通性嫌気性細菌を糖蜜アルコール製造工場内の土壌より分離、選出し、最優良株を *Lactobacillus casei* SM3 と同定した。また乳酸菌保存株の蒸留廃液に対する脱色活性の分布を調査し、脱色活性を示す菌種は *Lactobacillus* 属に見い出され、特に *Lactobacillus casei* グループの菌種が強い活性を示すことを明らかにした²⁾。これら *Lactobacillus casei* グループの菌種は、共通して蒸留廃液中の糖

蜜色素分子の高分子量領域を特異的に脱色し、既報³⁾の糖蜜色素分子の低分子量領域を脱色する *Lactobacillus hilgardii* W-NS とは明らかに異なる脱色活性を示した。また、好気性条件下で脱色活性を発現する *Coriolus versicolor* や *Coriolus hirsutus*^{4,5)} などの白色不朽菌とは異なり、半嫌気条件下で脱色活性を発現するなど、既に報告されている代表的な糖蜜色素脱色菌には見られない脱色性を示した。

本報では、蒸留廃液中の糖蜜色素に対して脱色活性を発現する *Lactobacillus casei* グループのうち、もっとも強い脱色活性を示した *Lactobacillus casei* SM3

株の脱色条件と、その特性を調べ、脱色菌としての有効性を評価した結果について報告する。

実験方法

1. 供試廃液

前報¹⁾で用いたサトウキビ糖蜜を発酵原料としたアルコール発酵液の蒸留廃液を供試した。

2. 廃液培地の調製

脱色試験用の廃液培地は、前報¹⁾と同様に蒸留廃液の色度を約 12,000 (OD₄₇₅ の吸光度で約 3.0) になるように蒸留水で希釈調製したものを基本培地とし、これを目的に応じて適宜改変した。また、蒸留廃液中の糖蜜色素分子の分子量別分画液の脱色試験用培地は以下のとおり調製した。すなわち、色度 12,000 に希釈した蒸留廃液 100 ml を、攪拌式セル (Amicon 社製) に限外ろ過膜 YM-10 (Amicon 社製、排除限界分子量 10,000) をセットして、窒素ガス (3.0 kg/cm²) により加圧ろ過した。濃縮部は画分 A (分子量 10,000 以上) とし、ろ液部を画分 B (分子量 10,000 以下) とし、それぞれを 1.0 N NaOH 溶液で pH 6.8 に調製してから、蒸留水で 100 ml にメスアップした。この分画液 A, B にグルコースを 0.5 % (W/V) 添加し、滅菌済みフィルター (Cellulose Acetate DISMIC-25, 孔径 0.2 μm, ADVANTEC TOYO 製) で除菌して蒸留廃液の色素分画培地とした。

3. 供試菌株

前報¹⁾において、蒸留廃液脱色菌の最優良株として選出した *Lactobacillus casei* SM3 (以下、SM3 株) を供試した。

4. 接種菌体の調製

脱色菌 SM3 株の接種用菌体の前培養は前報¹⁾の GYP 培地 (グルコース 1.0 %, 酵母エキス 1.0 %, ペプトン (Difco 製, Bactopeptone) 0.5 %, 塩類溶液 0.5 %, Tween 80 溶液 (2.5 mg/ml), pH 6.8) を用いた。本培地 10 ml をスクリーキャップ付きの試験管に分注し、オートクレーブで 10 分間滅菌後、SM3 株の凍結保存溶液を 0.05 ml 接種して 30°C、24 時間静置培養した。この培養終了液 1.0 ml 中の生菌数は 10⁹ cells オーダー (希釈平板培養法で計数) であることから、この生菌数に基づいて接種菌体量を調製した。

5. 培養方法

好気培養は綿栓を付した L 字型試験管、半嫌気培養

は 10 ml 容スクリーキャップ付きの小型試験管に 1 % (w/v) のグルコースを添加した廃液培地を 10 ml 分注して、オートクレーブ滅菌した。各々の培地に SM3 株の前培養菌体を 10⁷ cells/ml オーダーになるように接種し、好気培養は 30°C で振とう培養 (130 oscillations/min) し、半嫌気培養はスクリーキャップで密栓して、30°C で静置培養した。嫌気培養は、15 ml 容ブチルゴム栓付きバイアル瓶に前記と同一の廃液培地を 10 ml 分注後、気相部を嫌気性培養装置 (三紳工業 (株) 製) により調製した脱酸素炭酸ガスで置換してから、オートクレーブ滅菌した。菌体の接種はガス噴射法に⁶⁾ 準拠して、前培養菌体の懸濁液を 10⁷/ml になるように接種し嫌気ジャー (Gas Pak, BBL 製) 内において 30°C で培養した。なお、廃液培地は黒褐色を呈し、酸化還元指示薬による嫌気度の確認が困難であるため、レザズリン指示薬を 0.0004 % 添加したイオン交換水を用い、廃液培地と同様の操作を行い、培養期間中のレザズリンの呈色状態を観察して培地の嫌気度を把握するための間接的な指標とした。

6. 分析方法

(1) 色度の測定と脱色率の算出

廃液培地およびその処理液の色度は、前報¹⁾に従って、pH 6.8 の McIlvaine 緩衝液で OD₄₇₅ の吸光度が 1.0 になるように希釈した後、上水試験法⁷⁾の白金・コバルト法に従って測定した。脱色率は脱色反応前後の色度の減少率として示した。

(2) 菌体濃度

菌体濃度は前報²⁾に従って、分光光度計により 660 nm の波長で測定し、OD 値 1.0 = 0.36 mg/ml の相関から乾燥菌体量として示した。

(3) グルコースの定量

グルコースの定量は、酵素法⁸⁾ (オートバック A・グルコース試薬、ベーリンガー・マンハイム (株) 製) により行った。

(4) 乳酸の定量

乳酸の定量は、高速液体クロマトグラフィー (島津製作所 (株) 製の有機酸分析システム) により行った。カラムは Shim-pack SCR-102 H (8 mm I.D. × 30 mm L), 移動相は 5 mM・p-トルエンスルホン酸水溶液を用い、流速 0.8 ml/min, カラム温度は 40°C とした。検出は pH 緩衝化電気伝導検出法で行い、C-R6 型データ処理機によりクロマト波形処理を行って測定した。

実験結果と考察

1. 好気、半嫌気および嫌気条件の影響

SM3 株の 1.0 % グルコース添加の蒸留廃液（色度 12,000, pH 6.8）に対する好気、半嫌気および嫌気培養における脱色率を Table 1 に示した。半嫌気および嫌気培養では、それぞれ、32.1 %, 31.8 % の脱色率であり、両者とも黒褐色から透明感のある淡褐色まで脱色された。また、好気培養では 22.3 % の脱色率であり、両者の脱色率を下回った。また、その脱色状態は明らかに異なり、嫌気および半嫌気培養後の菌体表面には糖蜜色素の残存は認められなかったが（Fig.1 の A、半嫌気培養の菌体の状態）、好気培養後の菌体には糖蜜色素が付着したまま残存して黒変した（Fig.1 の B）。前報¹⁾で述べたとおり、SM 3 株の糖蜜色素の脱色は、細胞膜区分の脱色酵素に起因することから、嫌気および半嫌気培養における脱色反応は細胞膜区分で効

率的に進行したものと推察した。一方、好気培養において菌体の増殖は旺盛であることから、好気培養での脱色は、増殖菌体への色素物質の吸着に基づく物理的作用が主要因になっているものと推察した。これらの脱色メカニズムと、その相違については今後の検討課題になるが、本菌の利用面においては、雑菌汚染が少なく、かつ曝気エネルギーを必要としない省エネルギー型の嫌気処理技術への活用の可能性が示唆された。以降の実験は、すべて半嫌気培養により行った。

2. 有機栄養素の影響

SM3 株の脱色活性の発現に及ぼす有機栄養素（グルコース 1 %, ペプトン 0.5 %, 酵母エキス 0.1 %）の影響を Table 2 に示した。初発時の菌体接種量を 10^7 cells/ml とした場合、栄養素無添加の廃液培地（色度 12,000）の直接処理では、培養開始直後から菌体の微

Table 1 Effect of aerobic, semi-anaerobic and anaerobic conditions on the decolorizing activity of *Lactobacillus casei* SM 3.

Culture system	Decolorization (%)
Aerobic conditions	22.3
Semi-anaerobic conditions	32.1
Anaerobic conditions	31.8

The strain was cultured at 30°C for 5 days using the distilled wastewater (color units 12,000) supplemented with 1.0% (w/v) glucose.

Fig.1 Photos of SM3 cells after 5 days of cultivation.

Photo A ; semi-anaerobic conditions

Photo B ; aerobic conditions

Table 2 Effect of nutrient supplementation on the decolorization by *Lactobacillus casei* SM 3 of distilled wastewater produced during the alcoholic fermentation of cane molasses (distilled wastewater).

Inoculum size (cells/ml)	Supplementation			Decolorization (%)		Growth*1
	Glucose (1.0%)	Peptone (0.5%)	Yeast Ext (0.1%)	24 h	120 h	
10^7	—	—	—	18.6	23.2	+
	+	—	—	28.8	31.1	++
	+	+	—	26.1	26.8	+++
	+	+	+	25.2	26.5	+++

The strain was cultured at 30°C under semi-anaerobic conditions.

* 1, +, poor growth ; ++, moderate growth ; +++, vigorous growth

弱な増殖がみられ、培養 24 時間および 120 時間後の脱色率は、それぞれ 18.6 %、23.2 %であった。さらにこの廃液培地にグルコースを 1.0 % (w/v) 添加すると、菌体の増殖と脱色活性が促進され、24 時間および 120 時間後の脱色率はそれぞれ、28.8 %と 31.1 %まで向上し、グルコースの添加効果が認められた。しかし、これにペプトンや酵母エキスを添加すると菌体の増殖は促進されたが、脱色活性は抑制され、それらの添加効果は認められなかった。この傾向は、糖蜜色素の低分子量領域を特異的に脱色する *Lactobacillus hilgardii* W-NS³⁾と類似していた。

3. 糖類の影響

SM3 株の脱色活性の発現に及ぼす各種糖類の添加の影響を Table 3 に示した。本菌は糖類の添加によって脱色活性を発現する *Lactobacillus hilgardii* W-NS³⁾とは異なり、糖類無添加の廃液培地（対照培地、酵素法⁸⁾による測定では、グルコースは不検出）においても、30°C、5 日間の培養で微弱に増殖して、21.5 %の脱色率を示した。さらに、この廃液培地における菌体の増殖と脱色活性の発現にはグルコース、マンノース、フルクトース、リボースなどの糖類が効果的であった。また、アラビノース、キシロース、ラムノース、メリビオース、ラフィノースなどの糖類では菌体の増殖が微弱であり、糖類無添加の対照培地と同程度の脱色率にとどまった。供試した糖類のうち、特にグルコースに添加効果が認められたことから、脱色活性の発現に及ぼすグルコース濃度の影響を調べ、その結果を Table 4 に示した。グルコースの添加量に比例して、菌体量は増加する傾向を示したが、脱色活性の発現に適したグルコース濃度は 0.5 % (w/v) であり、その脱

色反応の大部分は 24 時間以内の短時間に完了した。また、グルコース濃度が 2.0 % (w/v) になると菌体量は増加したが、脱色活性は抑制され、脱色率が低下した。この原因は、既に前報¹⁾で述べたとおり、本菌の脱色酵素の活性が低 pH 下で強く抑制されることを考えあわせると、グルコース濃度の上昇による培養初期時の急速な乳酸の蓄積に伴う低 pH 環境に起因することが推察された。従って、以降の実験では、グルコース濃度を 0.5 % (w/v) に調製した蒸留廃液（色度 12,000）

Table 3 Effect of sugars on the decolorization of distilled wastewater by *Lactobacillus casei* SM 3.

Sugars	Decolorization (%)	Relative yield (%)	Growth* ¹ (mg/ml)
Arabinose	20.9	67.9	0.22
Ribose	26.7	86.7	0.48
Glucose	30.8	100.0	0.52
Xylose	20.8	67.5	0.19
Fructose	27.2	88.3	0.49
Mannose	28.8	93.5	0.49
Cellobiose	20.9	67.9	0.20
Rhamnose	21.5	69.8	0.20
Maltose	22.5	73.1	0.31
Sucrose	22.9	74.4	0.32
Melibiose	21.5	69.8	0.23
Raffinose	19.5	63.3	0.22
Mannitol	22.9	74.4	0.32
Sorbitol	22.1	71.8	0.35
None	21.5	69.8	0.21

The strain was cultured at 30°C for 5 days under semi-anaerobic conditions using the distilled wastewater supplemented with 1% (w/v) of the various sugars.

* 1, Dry cell weight

Table 4 Effect of glucose concentration on the decolorization of distilled wastewater by *Lactobacillus casei* SM 3.

Glucose concentration % (w/v)	24 hr		120 hr	
	Decolorization (%)	Growth* ¹ (mg/ml)	Decolorization (%)	Growth (mg/ml)
0	18.2	0.20	20.1	0.21
0.1	20.2	0.25	22.3	0.28
0.5	30.8	0.37	32.5	0.39
1.0	29.0	0.48	30.2	0.50
2.0	19.8	0.63	22.0	0.64

The strain was cultured at 30°C under semi-anaerobic conditions using the distilled wastewater supplemented with 0 to 2.0% (w/v) glucose. * 1, Dry cell weight

を反応培地とした。

4. 初発 pH の影響

SM3 株の脱色活性の発現に及ぼす廃液培地の初発 pH の影響を pH 2.0 から pH 8.0 の範囲で調べた。pH 調整は 1.0 N NaOH あるいは 1.0 N HCl により行った。Fig.2 に示すとおり、pH 7.0 において菌体増殖量と脱色活性は最大となった。また中性よりアルカリ性側あるいは酸性側になるに従って、菌体の増殖量や脱色活性は低下し、両者は連動する傾向を示した。特に pH 3.0 以下の酸性域では、菌体の増殖が停止して、脱色反応は認められなかった。また、前報¹⁾において、本菌による脱色反応は細胞膜区分の脱色酵素に起因することや、本酵素の脱色活性は酸性域で低下することを報告したが、このことも培養系の酸性域において脱色活性を低下させる一要因になっているものと推察した。一方、Ohmomo ら³⁾が分離、選出した糖蜜色素の低分子量領域を特異的に脱色する *Lactobacillus hilgardii* W-NS の脱色反応に適した pH が 4 付近の酸性域であることを考えあわせると、糖蜜色素脱色能をもつ乳酸菌には、少なくとも酸性域で糖蜜色素の低分子量領域を脱色する菌種と中性から微酸性域で糖蜜色素の高分子量領域を脱色する菌種の 2 タイプの存在が推察された。

5. 培養温度の影響

SM3 株の脱色活性の発現に及ぼす培養温度の影響を 15°C から 45°C の範囲で調べた。Fig.3 に示すと

り、至適温度は 30°C であったが、それよりも低温側の 25°C、20°C および高温側の 40°C においても、脱色活性の低下は小さく、幅広い温度範囲で比較的安定した脱色活性を発現した。しかし 15°C の低温下では、菌体の増殖が抑制されて脱色率が著しく低下し、また 45°C では菌体の増殖がほとんど認められないまま着色反応が進行した。Ohmomo ら³⁾が脱色菌として分離した *Lactobacillus hilgardii* W-NS の脱色反応温度は 35°C から 40°C が最適であり、また 45°C の高温域でも脱色活性は維持されるとしている。このように同じ乳酸菌菌種でありながら、脱色活性の発現のための温度範囲に違いが認められた。

6. 廃液濃度の影響

SM3 株の脱色活性の発現に及ぼす廃液濃度の影響を、色度 3,000 から 20,000 の範囲で調べた。Table 5 に示すとおり、菌体の増殖量は色度が高い廃液培地ほど増加する傾向を示した。しかし、初発時の色度が 3,000 から 14,000 の範囲では、色度値の大小に関わらず、ほぼ一定の脱色率（5 日間の培養で約 31 %）を示すのに対し、初発時の色度が 16,000 と 20,000 では、増殖菌体の菌体表面が黒変し、脱色率の低下が認められた。前報¹⁾で述べたとおり、本菌は幅広い分子量領域からなる糖蜜色素の高分子側色素を細胞膜に存在する酵素が特異的に脱色する。従って、本菌が色度 3,000 から 14,000 の範囲にある異なる色度の廃液に対して、同一の脱色率を示す理由は、糖蜜色素分子内の高分子側

Fig.2 Effect of the pH of the medium on the decolorization of distilled wastewater by *Lactobacillus casei* SM3.

The strain was cultured at 30°C for 5 days. The distilled wastewater was as described in the text, except for a pH adjustment to different values with HCl or NaOH.

Fig.3 Effect of culture temperature on the decolorization of distilled wastewater by *Lactobacillus casei* SM3.

The strain was cultured between 15°C and 45°C for 5 days under semi-anaerobic conditions using the distilled wastewater supplemented with 0.5 % (w/v) glucose.

の限定された結合部分（化学結合）を特異的に分解することに起因するものと推察した。しかし、色度が少なくとも 14,000 以上の廃液では、着色物質が過負荷となり過剰分の色素が菌体表面に付着して残存し、脱色反応の進行が抑制されるものと推察した。

7. 最適条件下における脱色反応の経日的変化

Fig. 4 に SM3 株の最適条件下(廃液色度 12,000, グルコース濃度 0.5 % (w/v), 初発 pH 6.8, 培養温度 30°C, 半嫌気培養)における培養経過を示した。本菌は培養開始直後から、グルコースを消費して乳酸を生成した。本菌の発酵形式はホモ型であるため、対グルコース量あたりの乳酸生成量は、ほぼ 100 % であった。また生成乳酸の大部分は L-型の乳酸であると推察した。この乳酸の生成に伴い、培地 pH が 6.8 から 3.2 まで低下し、それ以降一定となった。脱色率は培養を開始してから、24 時間以内に速やかに上昇し、約 30 % に達し、それ以降は、わずかな上昇にとどまった。また、

Table 5 Effect of the molasses pigments concentration on the decolorization of distilled wastewater by *Lactobacillus casei* SM 3.

Color units	Decolorization (%)	Growth*1 (mg/ml)
3,000	30.2	0.36
6,000	30.3	0.36
9,000	31.0	0.38
12,000	32.5	0.39
14,000	31.5	0.42
16,000	25.2	0.43
20,000	21.5	0.43

The strain was cultured at 30°C for 5 days under semi-anaerobic conditions using distilled wastewater with various concentrations of color supplemented with 0.5% (w/v) glucose.

* 1, Dry cell weight

特にデータは示さないが、この脱色処理液は、前報¹⁾と同様に糖蜜色素分子の高分子量領域の色素が特異的に脱色されていたが、低分子量領域の色素は残存したままであった。

8. 糖蜜色素分子の低分子および高分子量領域色素の脱色性

SM3 株は糖蜜色素分子の高分子量領域の色素を特異的に脱色するが、かたや低分子量領域の色素を脱色することが困難である。そこで、本菌の糖蜜色素分子に対する脱色領域を明確にすることを試みた。糖蜜色素分子は限外ろ過膜 YM-10 (排除限界分子量 10,000) により 2 区分に分別した。この 2 区分の状態は、特に

Fig. 4 A typical culture profile for *Lactobacillus casei* SM3.

The strain was cultured under optimal culture conditions as described in the text.

Table 6 Decolorizing activity of *Lactobacillus casei* SM 3 toward molasses pigments fractionated with an ultrafilter.

Fraction	Molecular weight of molasses pigments	Color units		Decolorization (%)
		Before	After	
A	10,000>	6,053	2,156	64.4
B	10,000<	6,017	5,857	2.7

The strain was cultured at 30°C for 5 days under semi-anaerobic conditions using the molasses pigments solutions shown above supplemented with 0.5% (w/v) glucose.

データとして示さないが、糖蜜色素分子の Sephadex G-75 を用いたゲルクロマトグラフィーで確認される高分子側と低分子側の2種類の主要ピーク¹⁾が明確に分別されていることが確認された。分子量 10,000 以上の濃縮部を高分子側画分 A とし、一方の分子量 10,000 以下のろ液部を低分子側画分 B とし、両区分の脱色性を調べた。Table 6 に示すとおり、分子量が 10,000 以上に分布する高分子側画分 A の脱色率は約 65 % を示し、初発時の黒褐色の色相が完全に消失して黄色にまで脱色された。一方、分子量が 10,000 以下に分布する低分子側画分 B に対する脱色率は、菌体の増殖が認められたのにもかかわらず、2.7 % にとどまった。従って、本菌が脱色困難な低分子側画分は、分子量が 10,000 以下の色素物質で構成されているものと推察した。今後はこの画分を構成する色素物質を分画、定性し、その脱色性を明らかにすることが課題となる。

以上より、SM 3 株は蒸留廃液中の糖蜜色素分子のうち、分子量が 10,000 以上に分布している色素物質に対する脱色活性が強いことから、糖蜜色素の高分子量領域の色素脱色菌としての有用性が示唆された。一方、分子量が 10,000 以下に分布している色素物質に対する脱色率は極めて低いことから、この区分の構成色素を明らかにすると共に、Ohmomo³⁾らが分離、選出した低分子量領域を特異的に脱色する *Lactobacillus hilgardii* W-NS と同様な脱色能をもつ菌株の探索が必要である。

要 約

糖蜜アルコール蒸留廃液（蒸留廃液）中の糖蜜色素に対して脱色活性を発現する *Lactobacillus casei*

SM 3 の最適脱色反応条件と脱色特性を調べ、脱色菌としての能力を評価した。本菌は、0.5 % (w/v) のグルコースを含む色度 12,000 の蒸留廃液中の糖蜜色素を、30°C、24 時間の半嫌気培養により約 30 % 脱色した。この脱色は、糖蜜色素分子の高分子量領域（分子量として 10,000 以上の区分）に分布している色素物質に対する脱色反応に基づくものであった。一方、低分子量領域（分子量として 10,000 以下の区分）に分布している色素物質は、ほとんど脱色されなかった。

参 考 文 献

- 1) 鈴木昌治, 廉澤ひろみ, 長野晃弘, 藤本尚志, 高橋力也：醸協, **93** (12), 982 (1998)
- 2) 鈴木昌治, 廉澤ひろみ, 長野晃弘, 藤本尚志, 高橋力也：醸協, **94** (5), 420 (1999)
- 3) S. OHMOMO, W. DAENGSUBHA, H. YOSHIKAWA, M. YUI, K. NOZAKI, T. NAKAJIMA and I. NAKAMURA : *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 2429-2435 (1988)
- 4) Y. WATANABE, R. SUGI, Y. TANAKA and S. HAYASHIDA : *Agric. Biol. Chem.*, **46**, 1623-1630 (1982)
- 5) I. AOSHIMA, Y. TOZAWA, S. OHMOMO and K. UEDA : *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 2041-2045 (1985)
- 6) 東 量三：嫌気性菌と嫌気性菌症, 小酒井望, 鈴木祥一郎編, 36 医学書院 東京 (1968)
- 7) 日本水道協会：上水試験法, 厚生省生活衛生局・水道環境部監修, 192-193 (1985)
- 8) 財団法人 日本生物工学会編：生物学実驗書, 291(株)培風館 東京 (1992)