

Tetrahymena sp.의 분리와 물리화학적 요인이 성장에 미치는 영향

김종진²⁾·유재근¹⁾·이형환²⁾

¹⁾국립환경연구원 수질공학과

²⁾건국대학교 생물학과

Effects of physical and chemical factors on the growth of *Tetrahymena* sp. isolate

Kim, Jong-Jin², Jae-Keun Ryu¹ and Hyung-Hoan Lee²

²Department of Biology, Kon Kuk University, Seoul 133-701, Korea

¹Division of Wastewater Engineering, National Institute of Environmental Research, Seoul 122-040, Korea

ABSTRACT: A Protozoa, *Tetrahymena* sp. was isolated from domestic wastewater and identified by morphological characteristics. It was 50 to 70 μm in length, ovoidal shape, and divided by binary fission. When *Escherchia coli* was fed as a food microorganism, the optimal conditions for growth were 30 to 35°C, pH 7 to 9 and 0.05% NaCl. The growth was inhibited by heavy metal ions; 0.3 mg of Cd⁺⁺/l and 0.1 mg of Cu⁺⁺/l. While, it was not inhibited up to 0.7 mg of Zn⁺⁺/l.

KEY WORDS □ *Tetrahymena* sp.

원생동물(Protozoa)은 단세포 진핵동물로서 분열속도가 빠르며 바람, 물의 흐름, 그리고 동물의 배설기관과 같은 수단에 의해 cysts 상태로 운반되어 지구생물권에 폭넓게 분포하고 있다(Jahn 등, 1979).

원생동물은 세균과 효모 그리고 조류와 다른 원생동물을 먹이로서 섭식하여 증식하고(Repak, 1986; Jackson, 1980; Berk 등, 1977), 암모니아와 같은 무기물을 체외로 배출하고, 또한 원생동물세포의 파쇄에 의해 아미노산과 같은 유기물질이 자연계에 유출되어 이들 물질을 세균 등이 다시 이용함으로써(Curds, 1982; Jost 등, 1973; Sambanis 등, 1986) 생태계에서 먹이망(Food webs)을 통한 에너지전달과 물질순환에 중요한 위치를 차지하고 있다(Lee, 1980).

근래 문제가 되고 있는 환경오염에 원생동물의 생태학적 특성을 이해하고 규명하여 이를 이용하

려는 연구가 진행되어 왔는데, 환경오염 평가(Cairns 등, 1978; Fen 등, 1986)와 지표생물(Hawkes, 1979), 그리고 활성슬러지에 의한 폐수처리(Sudo, 1974)에 주로 연구되었다.

환경오염 평가에 지표생물로서의 이용은 온도, 독성물질, 염분농도, pH값, 산소이온농도 그리고 유기물질과 같은 환경인자의 변화가 원생동물에게 어떠한 영향을 주는가를 관찰하여 오염정도를 평가 진단하고(Cairns, 1974), 오염정도에 따라 우점종의 원생동물종을 규명하려는 것이고(Hynes, 1959), 폐수처리에 있어서 원생동물의 이용은 폐수처리에서의 원생동물의 역할과 기능을 규명하며, 폐수처리 상태의 진단에 지표생물로서 사용하려는 것이다(須藤隆一, 1983).

중금속과 같은 독성물질이 생태계에 과대하게 방출되면 원생동물의 형태를 변형시키고(Willmer, 1956), 대사작용에 이상을 가져온다(Ruben

등, 1982). 또한 이러한 중금속의 영향은 중금속의 종류와 원생동물의 종에 따라 차이가 있다 (Ruthven 등, 1973).

온도와 같은 물리적 변화는 원생동물의 형태와 기관의 구조를 변형시키며 (Rosenbaum 등, 1966), 성장속도에도 영향을 준다는 보고 (Kasturi bai, 1969)가 있기에 이 연구를 하였다.

본 연구에서는 환경오염 평가와 지표생물로서 이용이 가능한 *Tetrahymena* sp.을 폐수에서 분리하여 성장에 미치는 영향을 연구하였기에 보고한다.

재료 및 방법

사용균주

인천 학익천의 폐수에서 *Tetrahymena* sp.을 분리하여 사용하였고, *Tetrahymena* sp.의 먹이로서 *Escherichia coli* K-12(ATCC 10789)를 사용했다.

Tetrahymena sp.의 배양배지

액체영양배지 (nutrient broth) 100 ml를 121°C에서 15분간 증압멸균한 후 대장균을 접종하여 28°C에서 24시간동안 진탕배양(140 rpm)시켰다. 이때 대장균의 수는 5.5×10^9 cell/ml이었다.

세균배양액을 30 분간 $4,000 \times g$ 로 원심분리한 후 그 상등액을 버리고, 합성폐수(中鹽眞喜夫, 1976)의 조성에서 포도당과 펩톤을 제거한 기본배지(K_2HPO_4 5.8 mg, KH_2PO_4 2.3 mg, $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 12 mg, NH_4Cl 46.8 mg, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 22.5 mg, $CaCl_2$ 27.5 mg, $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 0.25 mg을 녹여 전량을 1l로 한 후, pH를 7.2로 조정하여 만들었다.)에 침전된 세균 세포를 현탁시킨 후 다시 30분간 $4,000 \times g$ 으로 원심분리하였다. 다음에 그 상등액을 버리고 상기 대장균세포를 다시 기본배지에 100 ml에 현탁시켜 *Tetrahymena* sp.의 배양배지로 사용하였다.

세균농도와 *Tetrahymena* sp. 수 측정

대장균 세포 농도측정 : 분광광도계 (spectronic 21)로 600 nm에서 흡광도를 측정하였다. 흡광도 0.238일 때에 대장균 세포의 수는 5.5×10^9 cell/ml이었다. 이것을 표준으로하여 흡광도의 비율로 세포의 수를 계산하였다.

***Tetrahymena* sp. 수 측정 :** *Tetrahymena* sp.의 배양액을 일정량 취하여 Lugol's 용액 (Greenberg 등, 1985)으로 시료와 Lugol 용액의 비율이 2 : 1이 되도록 하여 세포를 고정한 후 Hemocytometer (Fisher, No 1483)를 이용하여 측정하였다.

Tetrahymena sp.의 순수분리 및 동정

인천 학익천의 공장이 밀집되어 있는 주변 하수 5개 지점에서 시료를 채취하여 원심분리용 튜브에 각 시료를 일정량씩 취하여 10분간 600 rpm으로 원심분리한 후 그 침전액을 1백금이 취하여 배지가 들어있는 캡 튜브에 접종한 후 25°C에서 일주일간 정치배양하였다. 배양하면서 매일 광학현미경으로 원생동물의 성장을 관찰하여 *Tetrahymena* sp.가 우점종으로 성장한 배양액을 1백금이 취하여 새로운 배지에 접종한 후 25°C에서 배양하였다.

Tetrahymena sp.의 성장이 관찰된 튜브는 세균의 순수분리에 사용하는 희석법 (Greenberg 등, 1985)을 일부 변형시켜 *Tetrahymena* sp.을 순수분리 하였다. *Tetrahymena* sp.가 든 배양액을 Hemocytometer를 이용하여 수를 측정하여 최종 희석단계를 구했다. 다음에 배양액을 희석하여 최종 희석단계의 세포수가 10 세포/10 ml 이하되게 조정하여 10개의 배지가 든 캡 튜브에 각각 1 ml씩 접종하여 25°C에서 배양하여 성장이 관찰된 배양액은 광학현미경을 통해 순수성을 판정하였다.

이렇게 하여 순수분리된 *Tetrahymena* sp.의 배양액은 20°C에서 보관하였고, 매주 한번씩 새로운 배지에 계대배양하였다.

Tetrahymena sp.의 동정은 형태학적 특징에 준하여 John (1979), Jahn (1979)과 川村多實二 (1973)의 분류법을 이용하여 동정했다.

또한 동정을 위하여 광학현미경으로 세포의 형태와 생활사를 관찰하였으며, *Tetrahymena* sp.의 세포를 Lugol 용액으로 고정시켜 광학현미경 사진을 찍어 동정에 이용하였다.

물리화학적 요인이 증식에 미치는 영향

온도의 영향 : *Tetrahymena*의 증식에 미치는 온도의 영향을 조사하기 위하여 *Tetrahymena* 배양배지 100 ml에 *Tetrahymena*를 ml당 220 세포를 넣고 진탕배양하면서 *Tetrahymena* 세포수의

증식을 0, 6, 24, 48, 72, 120시간후 조사하였다. 배양온도는 20, 25, 30, 35, 37°C였다.

pH의 영향: *Tetrahymena* 배양배지 100ml씩의 pH를 5, 7과 9로 조정 한 후 0시간에 *Tetrahymena* 세포(940 세포/ml)를 각 배지에 넣고 25°C에서 진탕배양을 하면서, 15, 19, 23과 27시간 후에 세포수를 각 배지에서 조사하여 증식에 미치는 영향을 조사했다.

NaCl 농도의 영향: NaCl 농도에 따른 증식에 미치는 영향을 조사하기 위하여 배양배지에 염분의 농도를 0, 0.05, 0.1, 0.3과 0.5%되게 첨가한 후에 *Tetrahymena* 세포(180 세포/ml)를 접종하고 25°C에서 진탕배양을 하면서 0, 16, 18, 20, 22시간 후에 세포수의 변화를 조사했다.

중금속의 영향: 100ml의 배양배지에 리터당 중금속 Cd⁺⁺ (CdCl₂·2H₂O)와 Zn⁺⁺ (ZnCl₂)의 농도를 0, 0.1, 0.3, 0.5, 0.7mg이 되게 하고, Cu⁺⁺ (CuSO₄·5H₂O)의 농도는 리터당 0, 0.01, 0.1, 1.0mg이 되게 첨가한 후 *Tetrahymena* 세포(830 세포/ml)를 접종, 25°C에서 진탕배양을 하면서 세포수의 변화를 조사하였다.

결과 및 고찰

분리한 *Tetrahymena* sp.의 동정

폐수에서 분리해낸 *Tetrahymena* sp.의 현미경 사진은 Fig.1에 제시되었다. 단세포 원생동물이며, 세포의 크기는 50~70µm이고, 형태는 전체적으로 타원형을 이루고 있었으며, 뒷부분은 둥글고, 앞부분은 끝이 약간 뾰족하다. 구강(Buccal cavity)은 앞부분에 위치하고 있으며, Kinetosome은 황으로 배열되어 있다. 대핵(Macronucleus)은 세포의 중앙에 위치하고 있으며, 수축포(Contractile vacuole)는 끝부분에 위치하고 있다. 세포의 분열은 횡적으로 이분법에 의해 이루어지며 (Fig. 1B), 분열후에도 얼마동안은 모세포와 딸세포가 붙어서 운동했다. 분열하는 동안에 먹이를 섭취하여 많은 식포(Food vacuole)가 세포질에 형성되며, 섭취된 세균은 일정시간 체내에 살아있는 것을 관찰했다.

위와같은 형태적 관찰로 볼 때 동정의 열쇠가 되는 세포의 형태와 크기, 구강과 대핵, 그리고 수



Fig. 1. Micrographs of *Tetrahymena* sp. isolate.

1A, 1B, and 1C (×400), 1D (×1,000). PM indicates plasma membrane, FV; food vacuole, CW; cell wall, CV; contractile vacuole, MN; macronucleus, CP; cytoplasm, K; kinetosome, CI; cilia, BC; buccal cavity, P; Prey bacteria, and DC; dividing cells.

축포의 위치와 Kinetosome의 배열 등이 John (1979)과 Jahn(1979)이 보고한 *Tetrahymena* 속과 일치하였다.

Tetrahymena sp. 증식에 미치는 영향

온도의 영향: 초기의 세포수를 일정하게 유지하여 온도별로 배양시킨 결과는 Fig.2에 있다.

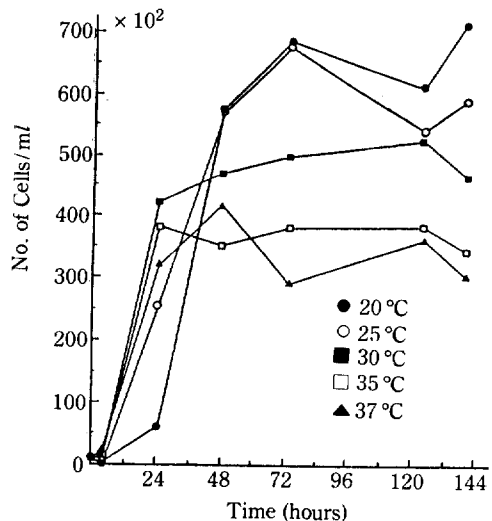


Fig. 2. Effect of temperature on the growth of *Tetrahymena* isolate.

6시간 배양후 20°C에서는 ml당 1.1×10^2 세포였고, 25°C에서는 2.7×10^2 세포, 30°C에서는 1.33×10^3 세포, 35°C에서는 1.25×10^3 세포, 37°C에서는 2.5×10^3 세포였다.

24시간후에는 20°C에서는 ml당 5.5×10^3 세포였고, 25°C에서는 2.5×10^4 세포, 30°C에서는 4.2×10^4 세포, 35°C에서는 3.8×10^3 세포, 37°C에서는 3.2×10^4 세포에 달했다.

48시간 배양후에 20°C와 25°C에서의 배양은 계속 대수증식을 하여 8ml당 5.7×10^4 세포를, 72시간 배양때는 6.8×10^4 세포까지 증식하였다. 30°C 이상 배양에서는 초기성장은 매우 빨랐으나 24시간 이후에는 정지내지는 쇠퇴기로 접어들었다.

Kasturi bai(1969)는 편모충류인 *Blepharisma*의 성장속도에 있어서 온도에 의해 영향을 받으며, 또한 세포의 구조도 변한다고 보고하였는데, 본 실험에 사용한 *Tetrahymena* sp.도 온도에 의해 성장속도에 차이가 있는 것으로 나타났으며, 높은 온도(30°C~37°C)에서 초기의 높은 성장속도에도 불구하고 배양시간이 길수록 세포수가 저온(20°C~25°C)에 비해 적게 나타나는 것은 Curds 등(1982)이 보고한 바와 같이, 성장하면서 체외에 대사산물을 배출하기 때문에 높은 온도에서는 더 높은 호흡율을 나타내어, 오히려 세포성장 억제되는 것으로 생각된다.

pH의 영향: *Tetrahymena* 증식에 pH의 영향을 조사한 것은 Fig. 3에 있다. pH5인 배지에서 15시간 배양후의 세포는 ml당 3.0×10^3 세포였고, pH 7.0에서는 3.6×10^3 세포, pH9.0에서는 5.2×10^3 세포여서 별 차이가 없었으나, 19시간때부터

는 pH9 배지에서 증식이 제일 높았다. 23시간 배양후에는 pH5에서는 ml당 2.72×10^4 세포였고, pH7.0에서는 3.22×10^4 세포, pH9에서는 5.52×10^4 세포로 pH7배지에서 현저한 증식을 했으나, 27시간 배양에서는 pH9와 7배지의 증식이 거의 유사하였다. 이러한 결과로 미루어 *Tetrahymena* sp.는 pH9에서 가장 높은 성장을 나타냈으며, 23시간 배양후에 pH9에 있어서는 pH5에 비하여 약 2배의 성장을 나타내는 것으로 보아 *Tetrahymena* sp.는 다른 물리화학적 요인에 비하여 pH에 있어서는 성장속도에 큰 영향을 받지 않는 것으로 생각된다.

염분농도의 영향: *Tetrahymena*의 증식에 미치는 NaCl의 영향은 Fig. 4에 제시하였다.

염분을 첨가하지 않는 배지에서 16시간 배양에서 세포수는 ml당 3×10^3 세포였고, 0.05%에서는 5×10^3 세포, 0.1%에서는 1.1×10^3 세포, 0.3%에서는 8×10^2 세포에 달했으며, 0.5%에서는 성장이 관찰되지 않았다. 18시간 배양때는 약간의 차를 보였으나, 그 이후는 현격한 차이를 보였다. 22시간 배양에서 염분을 넣지 않은 조건에서는 ml당 1.25×10^4 세포였고, 0.05%에서는 2.52×10^4 세포, 0.1%에서는 1.3×10^4 세포, 0.3%에서는 4.4×10^3 세포, 0.5%에서는 5×10^2 세포에 달했

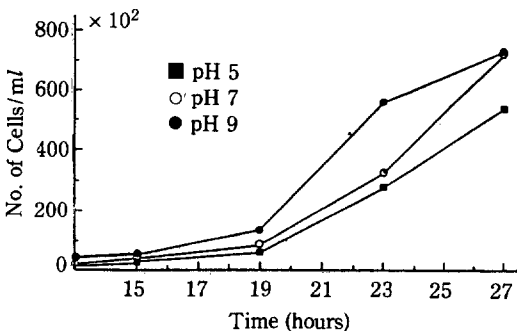


Fig. 3. Effect of pH on the growth of *Tetrahymena* isolate.

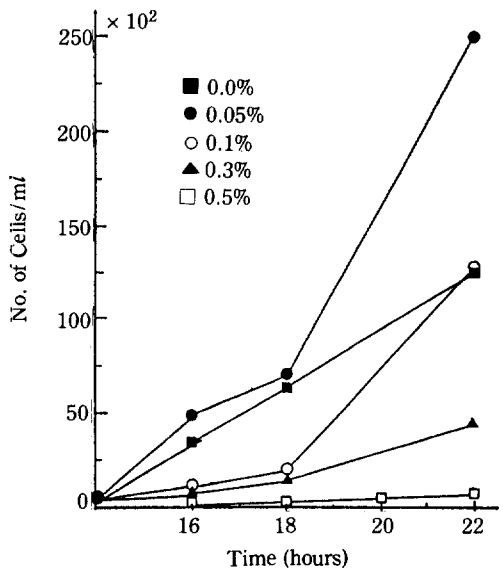


Fig. 4. Effect of NaCl concentration on the growth of *Tetrahymena* isolate.

다.

0.05%의 염분농도에서 성장율이 제일 높았고, 0.5%의 염분농도부터는 현저한 성장의 억제를 나타내는 것으로 보아, *Tetrahymena* sp.는 담수성의 적소를 갖는 것으로 사료된다.

중금속의 영향: *Tetrahymena* 증식배지에 Zn^{++} 을 첨가했을 때의 영향은 Fig. 5에 제시됐다. 아연을 첨가하지 않은 조건에서는 18시간 배양후에 세포수는 ml당 2.27×10^4 세포였고, 아연농도가 0.1mg인 조건에서는 2.22×10^4 세포, 0.3mg에서는 2.66×10^4 세포, 0.5mg에서는 3.66×10^4 세포, 0.7mg에서는 3.22×10^4 세포에 달했고, 20시간 배양때는 0.5mg 농도배지에서는 증식이 촉진되었으나, 다른 농도에서는 정상치와 차이가 없었다. 22시간 배양후에 아연을 첨가하지 않은 조건에서는 ml당 1.26×10^5 세포였고, 0.1mg에서는 9.13×10^4 세포, 0.3mg에서는 1.28×10^5 세포, 0.5mg에서는 1.258×10^5 세포, 0.7mg에서는 1.391×10^5 세포에 달했다. 이러한 결과로 보아, *Tetrahymena* sp.는 아연이온에 높은 내성을 가지고 있는 것으로 생각된다.

Cd^{++} 이 미치는 영향은 Fig. 6에 나타냈다. 카드뮴을 첨가하지 않은 배지에서 18시간 배양후의 세포수는 ml당 7.7×10^3 세포였고, 카드뮴농도가 0.1mg 배지에서는 1.14×10^4 세포, 0.3mg에서

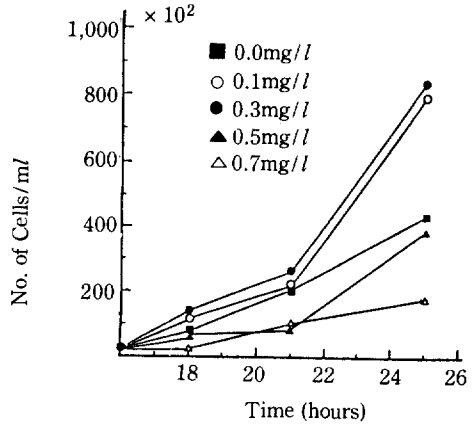


Fig. 6. Effect of Cd^{2+} concentration on the growth of *Tetrahymena* isolate.

는 1.36×10^4 세포, 0.5mg에서는 6.5×10^3 세포, 0.7mg에서는 2.5×10^3 세포에 달했으며, 25시간 배양후에 카드뮴을 첨가하지 않은 조건에서는 ml당 4.33×10^4 세포였고, 0.1mg에서는 7.97×10^4 세포, 0.3mg에서는 8.39×10^4 세포, 0.5mg에서는 3.86×10^4 세포, 0.7mg에서는 1.78×10^4 세포에 달했다.

0.1mg/l의 카드뮴을 첨가한 조건은 카드뮴을 첨가하지 않은 조건에 비해 약 1.8배의 세포수의 증가를 보였고, 0.3mg/l의 카드뮴을 첨가한 조건은 카드뮴을 첨가하지 않은 조건에 비해 약 1.9배의 증가를 보였다. 그러나, 0.5mg/l에서는 카드뮴을 첨가하지 않은 조건에 비하여 약간의 감소가 있었고 0.7mg/l에서는 카드뮴을 첨가하지 않은 조건에 비해 약 24배의 감소를 보였다.

이러한 결과로 보아 카드뮴은 소량(0.1~0.3mg/l)에서는 *Tetrahymena* sp.의 성장을 촉진시키는 요인으로 작용하고, 0.5mg/l 이상의 농도에서는 *Tetrahymena* sp.의 성장을 억제시키는 것으로 사료된다. Cu^{++} 이 증식에 미치는 영향은 Fig. 7에 있다.

구리를 첨가하지 않은 조건에서 16시간 배양후의 세포수가 ml당 1.3×10^4 세포였고, 구리농도가 0.01mg에서는 1.08×10^4 세포, 0.1mg에서는 8.3×10^3 세포, 1mg에서는 6.9×10^3 세포에 달했으며, 23시간 배양후에 구리를 첨가하지 않은 조건에서는 세포수가 ml당 1.183×10^5 세포였고, 구리농도가 0.01mg에서는 9.83×10^4 세포, 0.1

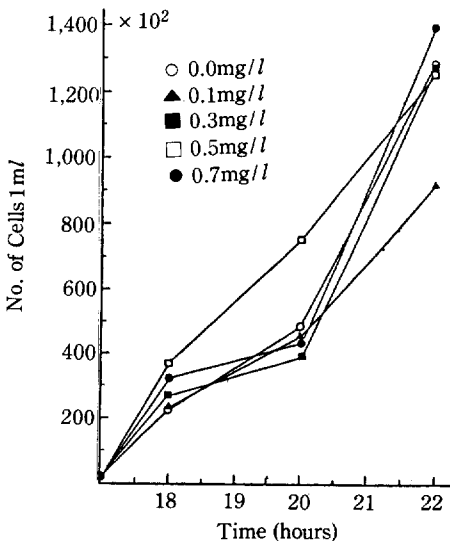


Fig. 5. Effect of Zn^{2+} concentration on the growth of *Tetrahymena* isolate.

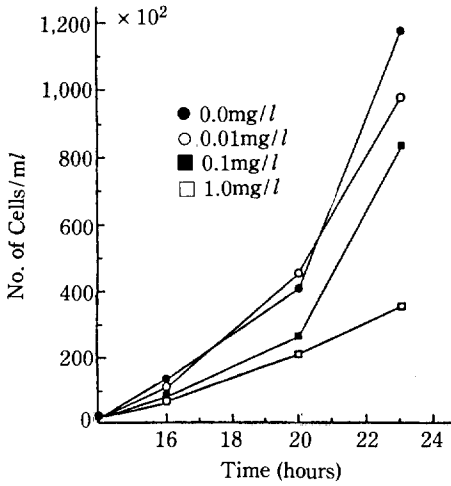


Fig. 7. Effect of Cu^{2+} concentration on the growth of *Tetrahymena* isolate.

mg에서는 8.33×10^4 세포, 1mg에서는 3.08×10^4 세포에 달했다. 23시간 배양후에 세포수는 구

리를 1mg/l 첨가한 조건에 비하여 구리를 첨가하지 않은 조건이 약 3.8배의 증가를 보였다.

Ruthven 등(1973)은 13종의 원생동물을 사용하여 중금속에 의한 세포의 치사농도와 저함농도를 실험한 결과 원생동물의 종에 따라 상당한 차이가 있고, 또한 같은 종에서도 중금속의 종류에 따라 차이가 나타난다고 보고하였다.

본 실험 결과에서도 중금속의 종류에 따라서 성장억제의 농도차이가 있었다. *Tetrahymena* sp. 는 아연에 대해 높은 내성을 보였으며, 고농도(0.7mg/l 이하)에서도 성장억제를 관찰할 수 없었다.

카드뮴과 구리에 대한 성장억제 경향은 유사하였으나, 저농도의 카드뮴(0.1mg~0.3mg/l)에서는 *Tetrahymena* sp. 성장을 촉진시킨 반면, 구리의 경우에는 0.01mg/l의 구리농도에서도 성장억제의 경향을 보였다.

적 요

폐수에서 분리한 *Tetrahymena* sp.는 크기는 50~70 μ m이고, 타원형이며, 앞부분은 약간 뾰족한 형태였다. 구강, Kineto some, 대핵, 수축포와 식포 등을 선명히 광학현미경으로 관찰할 수 있었다. 이분법에 의하여 세포분열을 했고, 대장균세균을 먹이로 이용했다. 분리한 *Tetrahymena* sp.는 20 $^{\circ}$ C와 25 $^{\circ}$ C, 그리고 pH7에서 9, 그리고 담수에서 증식이 제일 높았다. Zn^{++} 은 0.7mg/l 농도까지는 증식억제를 거의 하지 않았고, Cd^{++} 농도가 0.3mg/l, 그리고 Cu^{++} 가 0.1mg/l 이상에서는 증식을 억제하였다.

REFERENCES

- Berk, S.G., D.C. Brownlee, D.R. Heinle, H.J. Kling, and R.R. Colwell. 1977. Ciliates as a food source for maine planktonic Copepodes. *Microbiol. Ecol.*, 4, 27-40.
- Cairns, J. Jr., K.L. Dickson, and A. Maki. 1978. Estimating the hazard of chemical substances to aquatic life. ASTM, Philadelphia STP 657, p278.
- Cairns, J. Jr. 1974. Pollution ecology offresh-water invertebrates, Academic Press, New York. p1-28.
- Curds, C.R. 1982. The ecology and role of protozoan in aerobic sewage treatment processes. *Annu. Rev. Microbiol.* 36, 27-46.
- Fen, S.Y., A.L. Buikema Jr., W.H. Yongue. 1986. Use of protozoan communities to predict environmental effects of pollutants. *J. Protozool.*, 33, 146-151.
- Greenberg, A.E., R.R. Trussell, L.S. Clesceri. 1985. Standard methods for the examination of water and wastewater. 16th edition.
- Hawkes, H.A. 1979. Invertebrates as indicators of river water quality, In biological indicators of water quality edited by A. James, Lilian Evison, Chapter 2.
- Hynes, H.B.N. 1959. The use of invertebrates as indicator of river pollution. *Proc. Linn. Soc. London*, 2, 165-169.
- Jackson, G.A. 1980. Phytoplankton growth

- and zooplankton grazing in oligotrophic oceans. *Nature (London)* **284**, 439-441.
10. Jahn, T.L. 1979. How to know the protozoa. Brown Co.
 11. John, O.C. 1979. The ciliated protozoa. Pergamon Press Ltd. London.
 12. Jost, J.L., J.J. Drake, A.G. Fredrickson, and H.M. Tsuchiya. 1973. Interaction of *Tetrahymena pyriformis*, *Escherichia coli*, *Azotobacter vinelandii*, and glucose in a minimal medium. *J. Bacteriol.*, **113**, 834.
 13. Kasturi bai, A.R. (1969) The effects of temperature on *Blepharisma intermedium*. *J. Protozool.*, **16**, 738-743.
 14. Lee, J.J. 1980. Informational energy flow as an aspect of protozoan nutrition. *J. Protozool.*, **27**, 5-9.
 15. Repak, A.J. 1986. Suitability of selected bacteria and yeasts for growing the Estuarine Heterotrich ciliates *Fabrea saline* (Henneguy). *J. Protozool.*, **33**, 219-222.
 16. Ruben, L., J. Lageson, B. Hyzy, and A.B. Hooper. 1982. Growth cycle-dependent overproduction and accumulation of protoporpyrin IX in *Tetrahymena*: Effect of heavy metals. *J. Protozool.*, **29**, 233-238.
 17. Sambanis, A., S. Pavlou, and A.G. Fredrickson. 1986. Coexistence of bacteria and feeding ciliates: growth of bacteria on autochthonous substrates as a stabilizing factor for coexistence. *Biotechnology and Bioengineering*, **24**, 714-728.
 18. Sudo, R. 1974. Studies on the role of protozoa in the activated sludge process. Doctoral Thesis. University of Tohoku, Japan.
 19. Sudo, R., and S. Aiba. 1971. Growth rate of Vorticellidae isolated from activated sludge. *Japanese J. Ecol.*, **21**, 70-74.
 20. Willmer, E.N. 1956. Factors which influence the acquisition of flagella by the amoeba, *Naegleri gruberi*. *J. Exp. Biol.*, **33**, 583-603.
 21. 須藤隆一, 稱森悠平. 1983. 圖説, 生物相에서 본 處理機能의 診斷.
 22. 川村多實二. 1980. 日本 淡水生物學, 原生動物, pp: 140-191.
 23. 中鹽眞喜夫. 1976. 廢水の 活性汚濁處理, 2版.

(Received Aug. 8, 1988)