

固定化菌による銅イオン含有フェノール処理の 工学的検討

中村 嘉利, 沢田 達郎, 武 春美,
加納 重義, 小森 正樹*

金沢大学工学部 (〒920-8667 石川県金沢市小立野2-40)
*石川県保健環境センター (〒920-1154 石川県金沢市太陽ヶ丘1-11)

[平成13年4月23日受理]

Study on Treatment System for Degradation of Phenol in the Presence of Copper Ion by Immobilized Cell

Yoshitoshi NAKAMURA, Tatsuro SAWADA, Harumi TAKE,
Shigeyoshi KANO and Masaki KOMORI*

Faculty of Engineering, Kanazawa University
(2-40 Kodatsuno, Kanazawa, Ishikawa 920-8667)

*Ishikawa Prefectural Institute of Public Health and Environmental Science
(1-11 Taiyougaoka, Kanazawa, Ishikawa 920-1154)

[Received April 23, 2001]

Summary

The efficiency of the degradation of phenol in the presence of copper ion by immobilized cell was evaluated on the basis of the dynamic behavior of permeation of phenol and copper ion into gel bead. As a result of measuring concentration distribution of phenol and copper ion in the gel bead, it was found that the region where cell growth was not inhibited existed in the center part of the gel bead due to the low concentration of copper ion, and the cells could degrade phenol relatively easily in that region. The immobilized cell degraded phenol almost completely under fairly high concentration of copper ion, i.e. 1~10 mg/ℓ. The mathematical model was presented for representing cell growth and phenol degradation in the gel bead, and the calculated values were verified experimentally in a batch treatment. It was suggested that the immobilized cell could degrade phenol in the presence of copper ion not only in a batch treatment but also in a continuous treatment.

Key words: immobilized cell treatment, copper ion, immobilized growth model, phenol degradation, gel bead

1. はじめに

フェノールは水溶性で生物的に毒性の強い芳香族化合物であり、下水道法や水質汚濁防止法では排出基準が5

mg/ℓ以下に定められている¹⁾。フェノールは鉄鋼業や化学品製造業などの重化学工場から比較的高濃度で排水され、フェノール排水を迅速かつ高効率で処理するための合理的システムの開発が望まれている²⁾。多くの研究者

がフェノール分解菌を用いたフェノールの生物分解について研究してきたが、阻害物質として重金属イオン存在下でのフェノールの生物分解に関する報告はほとんどなかった^{3,7)}。特に鉄鋼排水中には数百～数千 mg/l のフェノールと数～数十 mg/l の重金属イオンが含まれるので、重金属イオン存在下でのフェノールの生物分解を合理的に行うための研究が望まれる²⁾。

菌の固定化培養は (1) 高い菌濃度の維持による処理効率の改善, (2) 処理システムからの菌の washout の防止, (3) 毒性物質による阻害作用の低減化などが期待できるので、重金属イオン存在下でのフェノールの微生物分解のために効果的と思われる^{8,9)}。著者ら¹⁰⁾はアルギン酸ゲルビーズにフェノール分解菌を固定化した固定化培養を行い、固定化培養が従来までの液体培養よりも銅イオンや亜鉛イオンなどの重金属イオン存在下でのフェノールを短時間で効率よく分解できることを報告した。

本研究では、重金属イオンとして銅イオンを含有するフェノールの固定化菌処理をゲルビーズ内へのフェノールと銅イオンの浸透や濃度分布の実験値などから検討した。次に、固定化菌による種々の銅イオン濃度含有フェノールの回分処理について検討した後、提出した数式モデルによってフェノールの連続処理の経時変化について推算した。

2. 実験方法

2. 1 菌株

フェノール分解菌として *Acinetobacter calcoaceticus* AH 株 (グラム陰性桿菌, 非運動性, 約 2 μm) を用いた^{3,4)}。

2. 2 固定化方法

0.05g の微生物を 3g/l のアルギン酸ナトリウム溶液 (1 l) に懸濁し、混合液を穏やかに攪拌されている 0.1mol/l の CaCl₂ 溶液に滴下した。菌が固定化されたアルギン酸カルシウムゲルビーズの直径は約 4 mm であり、ゲルビーズ 1 個当たりの微生物量は約 1.67×10^{-6} g であった。

ゲルビーズ内へのフェノールおよび銅イオンの浸透を検討するために、大きな直径を持つゲルビーズを以下のように作成した。3 g/l のアルギン酸ナトリウム (100m/l) に 0.1M CaCl₂ 水溶液を吹きかけて外部を固めてから、0.1M CaCl₂ 水溶液中で攪拌することにより直径約 40mm のゲルビーズを得た。フェノールおよび銅イオンの浸透実験はゲルビーズ 1 個を 500m/l の培地に入れて行い、ゲルビーズ表面から 0～1, 1～2, 5～6, 19～20mm の場所のゲルを切り取り、フェノールと銅イオンの濃度を測定した。

2. 3 培養方法

菌の培地組成は 0.1 g/l フェノール, 1.0 g/l (NH₄)₂SO₄, 0.02g/l KH₂PO₄, 0.2g/l MgSO₄·7H₂O, 1.0 g/l CaCl₂ であり、菌は培地 100m/l 中で培養した。種々の濃度の CuSO₄ を添加することによって培地中の銅イオン濃度を調整した。培地に添加された固定化ゲルビーズの全容積 (ゲルビーズ間の間隙容積は含まない)、直径、個数はそれぞれ 10m/l, 4 mm, 290 個であった。培養は 300m/l 容三角フラスコを用いて 100rpm の回転数の下で 37℃, pH7.8 で行った。サンプル液 (2～3 m/l) を一時間毎に培養液から抜き取り、菌体光学密度とフェノール濃度などの測定に用いた。

2. 4 分析方法

固定化ゲルビーズ中の菌の濃度は 10m/l のリン酸緩衝液 (3 g/l KH₂PO₄ と 7 g/l K₂HPO₄ から成る) 中で溶解した後測定した。菌体光学密度は吸光度計 (島津製 UV-120) を用いて波長 660nm で測定した。フェノール濃度は高速液体クロマトグラフィーにて測定した。銅イオン濃度は DDTC 抽出-原子吸光法にて測定した。

3. 結果と考察

3. 1 ゲルビーズ内へのフェノールおよび銅イオンの浸透および吸着

前報¹⁰⁾では、液体処理では増殖阻害のために分解できなかった 0.5mg/l の銅イオン含有フェノールが固定化菌処理によって分解されることがわかった。銅イオンのような阻害物質の存在下でのフェノールの分解に及ぼす固定化菌処理の有効性をさらに詳しく検討するために直径 40mm のゲルビーズ (菌の固定化なし) を作成し、ゲルビーズ内へのフェノール銅イオンの浸透および吸着について検討した。Fig. 1 はゲルビーズを 10mg/l の銅イオンを含む水溶液 (500m/l) に入れた時のゲルビーズ表面から 0～1, 1～2, 5～6 mm の地点における銅イオン濃度の経時変化を示す。ゲルビーズ表面から 0～1 mm と 1～2 mm の地点では銅イオン濃度は時間とともに増加し、2 時間後にはほぼ一定値になり、0～1 mm の地点の銅イオン濃度 (0.18mg/cm³) は 1～2 mm の地点の銅イオン濃度 (0.025mg/cm³) の約 7 倍であった。ゲルビーズ表面から 5 mm の地点では銅イオン濃度は 0 のままであった。銅イオンのゲルビーズ内での吸着は表面から 2 mm の地点までで、銅イオンの大部分が 0～1 mm 付近に存在していることがわかった。ゲルビーズ表面ではゲルビーズ内の Ca²⁺ と Cu²⁺ との置換反応が起こり¹¹⁾、2 時間で置換反応が平衡に達したと思われる。

Fig. 2 はゲルビーズを 100mg/l のフェノールを含む水溶液 (500m/l) に入れた時のゲルビーズ表面から 0～1, 1～2, 5～6 mm の地点におけるフェノール濃度

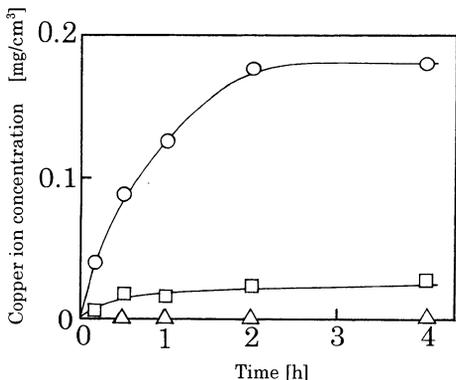


Fig. 1 Time courses of copper ion concentration in gel bead at radial distance of 0~1, 1~2, and 5~6mm from surface of gel bead in the diffusion experiment of copper ion
 Symbols: ○, 0~1mm; □, 1~2mm; △, 5~6mm

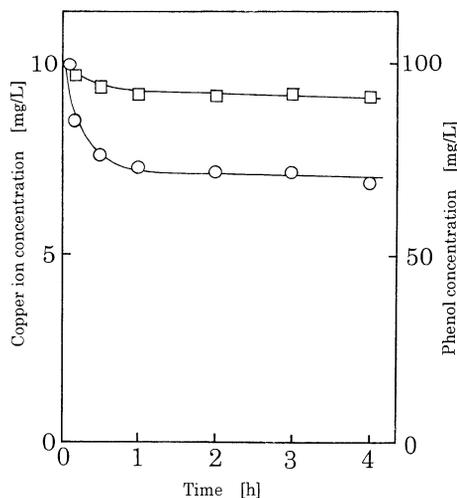


Fig. 3 Time courses of copper ion concentration and phenol concentration in aqueous solution in the diffusion experiment of copper ion and phenol into gel bead
 Symbols: ○, copper ion concentration; □, phenol concentration

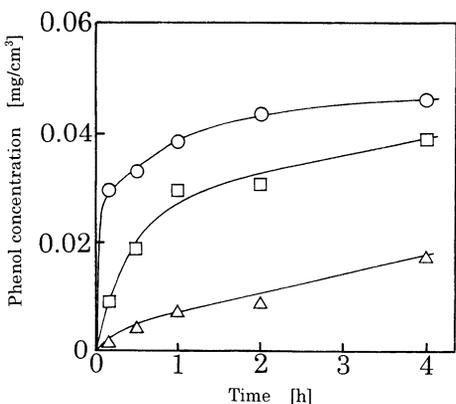


Fig. 2 Time courses of phenol concentration in gel bead at radial distance of 0~1, 1~2, and 5~6mm from surface of gel bead in the diffusion experiment of Phenol
 Symbols: ○, 0~1mm; □, 1~2mm; △, 5~6mm

の経時変化を示す。フェノール濃度は時間とともに急激に増加した後、徐々に増加する傾向を示した。フェノールはゲルビーズ表面からゲルビーズ内部へ浸透し、最終的にはフェノール濃度はゲルビーズ内部のすべての地点で一定になると思われる。

Fig. 3はゲルビーズを10mg/ℓの銅イオンと100mg/ℓのフェノールを含む水溶液 (500mℓ) に入れた時の水溶液中の銅イオン濃度とフェノール濃度の経時変化を示す。銅イオン濃度は時間とともに急激に減少し、2時間後に

ほぼ一定値約 7 mg/ℓに達した。フェノール濃度は時間とともに徐々に減少して2時間後にほぼ一定値約90mg/ℓに達した。銅イオン濃度の減少割合がフェノール濃度よりも大きかった理由は、銅イオンの場合にはゲルビーズ内への浸透だけでなく、カルシウムイオンとの置換反応によって減少したことが考えられる。

Fig. 4はゲルビーズを10mg/ℓの銅イオンと100mg/ℓのフェノールを含む水溶液 (500mℓ) に2時間入れた時のゲルビーズ内の銅イオンとフェノールの濃度分布を示す。2時間後の水溶液中の銅イオン濃度は約 7×10^{-3} mg/mℓ (7 mg/ℓ) であり、ゲルビーズ表面から1 mmの地点の銅イオン濃度は0.12mg/cm³であるので、ゲルビーズ表面から1 mmの地点の方がかなり高くなっている。この理由は前述したようにゲルビーズ内のカルシウムイオンと銅イオンとの置換反応により、銅イオンがゲルビーズ表面に吸着し、凝集したためと思われる。また、ゲルビーズ表面から5 mm以上では銅イオン濃度は0であった。フェノール濃度はゲルビーズ中心まで浸透していた。以上のことから、ゲルビーズ内ではフェノールは存在するが、銅イオンが存在しない領域があり、その領域内に菌が固定化されれば銅イオンの阻害作用を受けることなく、フェノールが分解されることが示唆された。結果として、固定化菌処理はゲルビーズ内への銅イオンとフェノールの浸透が異なるために培養液中に高濃度の銅イオンが存在してもフェノールを分解できることがわかった。

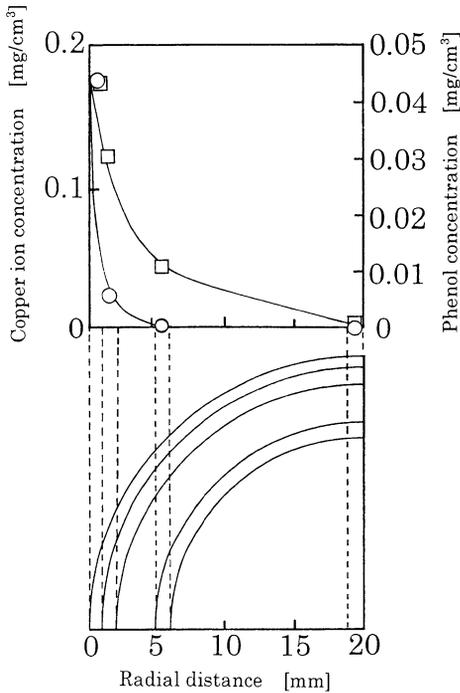


Fig. 4 Concentration distribution of copper ion and phenol in radial direction from surface of gel bead at 2h in the diffusion experiment of copper ion and phenol
 Symbols: ○, copper ion concentration; □, phenol concentration

3. 2 ゲルビーズ内へのフェノールの拡散と菌の増殖

Fig. 5は微生物を固定化していないゲルビーズ（個数2900，全体積100mℓ）を420mg/ℓのフェノール水溶液500mℓに入れて混合した時の液中のフェノール濃度の経時変化を示す。フェノール濃度は時間とともに減少し，0.5h以上ではほぼ一定値350mg/ℓに達したので，約0.5hで液中とゲルビーズ内のフェノール濃度が等しくなることがわかった。溶存酸素濃度30mg/ℓの下で10g/ℓの比較的高濃度フェノールが直径0.5mmのゲルビーズ10個によって分解した結果，固定化ゲルビーズ内の最大菌体光学密度 X_m は140に達した。菌が1gのフェノールを分解するために必要な酸素量 f はフェノールの酸化分解の化学反応式から2.38gと推算される。菌の維持代謝による単位時間，単位菌体光学密度当たりの酸素消費量 h はフェノールを含まない飽和酸素水溶液中に菌液を添加させて測定した。Fig. 6は菌液を飽和酸素水溶液中に添加した場合の溶存酸素濃度の減少の経時変化を示す。なお，水溶液中の菌体光学密度は約0.1であった。溶存酸素濃度は初期値約7mg/ℓからほぼ直線的に減少し，

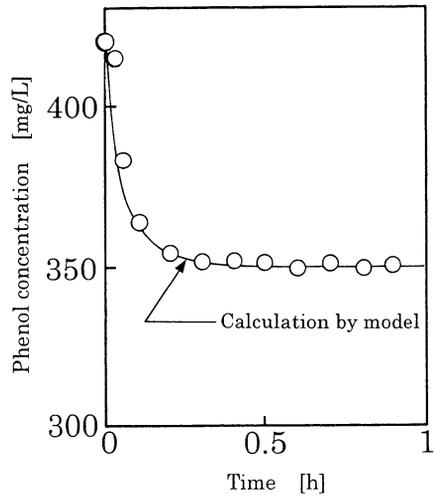


Fig. 5 Time courses of phenol concentration in aqueous solution in the diffusion experiment of phenol ion gel beads (diameter, 4mm; number, 2900; total volume, 100mℓ)

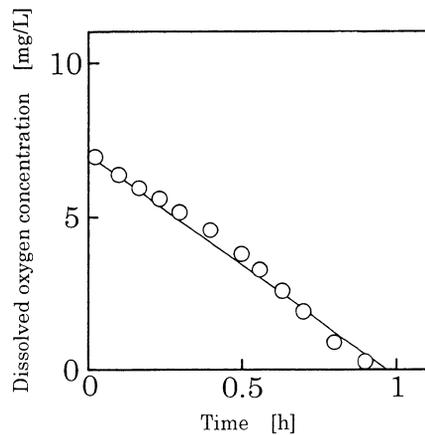


Fig. 6 Time course of dissolved oxygen concentration in the addition experiment of cells into saturated oxygen aqueous solution

その傾きから菌の維持代謝による単位時間，単位菌体光学密度当たりの酸素消費量 h は $7 \times 10^{-3} \text{g} / (\ell \cdot \text{h})$ と推算された。

3. 3 固定化菌による銅イオン含有フェノールの処理とモデル式の提出

3. 3. 1 固定化菌の増殖とフェノールの処理

Fig. 7は種々の濃度の銅イオン含有フェノールの固定化処理における平均菌体光学密度とフェノール濃度の経

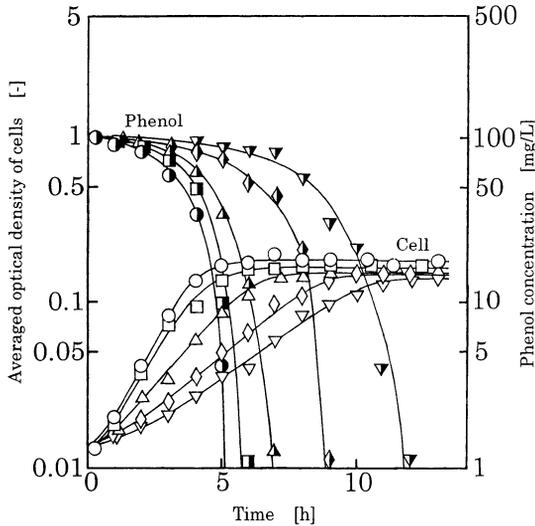


Fig. 7 Experimental result and model simulation in batch culture of phenol degradation under various copper ion concentrations by immobilized cells

Solid lines show the calculated values. Symbols: ○, ●, no copper ion; □, ■, 1mg/l; △, ▲, 3mg/l; ◇, ◆, 5mg/l; ▽, ▼, 10mg/l

時変化を示す。平均菌体光学密度はフェノール濃度の減少とともに増加し、フェノール濃度が完全に分解した後、一定値に達した。液体処理では銅イオンを0.5mg/l添加すると菌の増殖とフェノールの分解は全く見られなかった¹⁰⁾。しかしながら、Fig. 7に示したように固定化菌処理では1~10mg/lのような高濃度の銅イオンを添加しても菌が増殖してフェノールが分解されることがわかった。この理由は、前述したようにゲルビーズの中心付近にはフェノール菌の増殖を阻害するほどの銅イオンが存在しないために重金属阻害の影響が低減化され、ゲルビーズの中心付近の菌によってフェノールが分解されたと思われる。銅イオン濃度が増加するとゲルビーズの中心まで銅イオンが吸着するために、銅イオン濃度の増加とともに菌の増殖やフェノールの分解が遅くなると思われる。処理終了後の平均菌体光学密度は銅イオン濃度の増加とともに減少したので、銅イオンの添加によって菌体収率が低下することがわかった。また、培養液1ℓ当たり約100mℓの固定化ゲルビーズを添加した本実験結果を前報¹⁰⁾の実験結果(培養液1ℓ当たり約50mℓの固定化ゲルビーズを添加した実験結果)と比較すると、大量の固定化ゲルビーズを用いた本実験結果の方が初期菌体濃度の増加と銅イオン吸着効果の増大のためにフェ

ノールの処理時間を短縮できることが確認された。

3. 3. 2 モデル式の提出と実験値のシミュレーション

著者ら¹⁰⁾は固定化菌によるジオキシン増殖(微生物培養において2種類の栄養源が存在する場合、菌は優先的に代謝する栄養源を分解した後他方の栄養源を分解する現象で2つの対数増殖期とおくれ時間から成る増殖形態)をもつ2基質の培養の増殖と基質の分解に関するモデル式をすでに提出している。銅イオン存在下で1つの基質のフェノールを固定化菌によって分解するときの比増殖速度 μ は式(1)で表される。

$$\mu = \frac{1}{X} \frac{\partial X}{\partial t} = \frac{a Y_P Y_D}{(b_1 + Y_P + b_2 Y_P^m)(1 + b_3 Y_M^n)(b_4 + Y_D)} \quad (1)$$

ここで、 X , Y_P , Y_M , Y_D はそれぞれ固定化ゲルビーズ内の菌体光学密度、フェノール濃度、銅イオン濃度、溶存酸素濃度である。 a と b_1 はそれぞれ増殖に関する定数である。 b_2 と m はフェノールの基質阻害に関する定数、 b_3 と n は銅イオンの阻害に関する定数、 b_4 は溶存酸素の飽和定数である。

固定化ゲルビーズ内の平均菌体光学密度 X はゲルビーズの中心から半径方向の長さ r に関する次式で求められる。

$$\bar{X} = \int_0^R \frac{4 \pi N}{V} X r^2 dr \quad (2)$$

ここで、 R , N , V はそれぞれゲルビーズ半径、ゲルビーズ個数、培養液体積である。

固定化ゲルビーズ内のフェノール濃度、銅イオン濃度、溶存酸素濃度も培養時間とゲルビーズの中心から半径方向への距離の関数として与えられる。フェノールは培養液中からゲルビーズ内に浸透すると菌によって分解されるので、フェノールの蓄積速度は拡散と分解を考慮した式(3)で表される。

$$\frac{\partial Y_P}{\partial t} = \phi_1 \left(\frac{\partial^2 Y_P}{\partial r^2} + \frac{2}{r} \frac{\partial Y_P}{\partial r} \right) - \frac{1}{\eta} \mu X \quad (3)$$

ここで、 ϕ_1 , η はそれぞれ固定化ゲルビーズ内へのフェノールの拡散係数、菌体収率を表す。

銅イオンは培養液中からゲルビーズ内に浸透するとゲルビーズ内のカルシウムイオンと一部置換されて吸着するので、銅イオンの蓄積速度は拡散と吸着を考慮した式(4)で表される。

$$\frac{\partial Y_M}{\partial t} = \phi_1 \left(\frac{\partial^2 Y_M}{\partial r^2} + \frac{2}{r} \frac{\partial Y_M}{\partial r} \right) \quad (4)$$

ここで、 ϕ_1 は固定化ゲルビーズ内への銅イオンの見かけの拡散係数(銅イオンの拡散と吸着を考慮した拡散係

数)である。

溶存酸素は培養液中からゲルビーズ内に浸透すると菌の増殖と維持代謝のために消費されるので、溶存酸素の蓄積速度は拡散と消費を考慮した式(5)で表される。

$$\frac{\partial Y_D}{\partial t} = \phi_2 \left(\frac{\partial^2 Y_D}{\partial r^2} + \frac{2}{r} \frac{\partial Y_D}{\partial r} \right) - \frac{f}{\eta} \mu X - h X \quad (5)$$

ここで、 ϕ_2 , f , h はそれぞれ固定化ゲルビーズ内への溶存酸素の拡散係数、菌が1gのフェノールを分解するために必要な酸素量、菌の維持代謝による単位時間、単位菌体光学密度当たりの酸素消費量である。

培養液中のフェノール濃度 Y_P^* と Y_M^* は次式で示される。

$$\frac{d Y_P^*}{d t} = -\frac{4 \pi N}{V} \left(\int_0^R r^2 \frac{\partial Y_P}{\partial r} dr + \int_0^R r^2 \frac{1}{\eta} \mu X dr \right) \quad (6)$$

$$\frac{d Y_M^*}{d t} = -\frac{4 \pi N}{V} \left(\int_0^R r^2 \frac{\partial Y_M}{\partial r} dr \right) \quad (7)$$

なお、初期条件と境界条件は次のように与えられる。

初期条件 ($t=0, 0 < r < R$):

$$\begin{aligned} X &= X_0, Y_P = 0, Y_M = 0, Y_D = 0, \\ Y_P^* &= Y_{P0}, Y_M^* = Y_{M0} \end{aligned} \quad (8)$$

境界条件 ($r = 0$):

$$\frac{\partial Y_P}{\partial r} = \frac{\partial Y_M}{\partial r} = \frac{\partial Y_D}{\partial r} = 0 \quad (9)$$

$$(r=R): (r=R): Y_P = Y_P^*, Y_M = Y_M^*, Y_D = Y_D^* \quad (10)$$

Table 1はモデル式のパラメータ値を示す。フェノールの拡散係数 ϕ_1 はフェノールの拡散方程式(3)と(6)を用いて得られた計算値をFig. 5に示した実験値にフィッティングすることにより計算され、 $1.4 \times 10^{-6} \text{ m}^2/\text{h}$ と推算された。また、他のパラメータ値については3.2章の実験結果および文献値¹⁰⁾を用いた。モデル式とTable 1に示したパラメータを用いた計算結果をFig. 7に実線で示した。計算値と実験値がよく一致したので、モデル式は銅イオン存在下での菌の増殖とフェノールの分解の動的挙動をシミュレーションできることがわかった。

Fig. 8は固定化菌による銅イオン含有フェノールの回分処理を5h行った後、種々の希釈率の連続処理に移行した時の流出液のフェノール濃度と銅イオン濃度の経時変化を示す。計算値の初期フェノール濃度と初期銅イオン濃度はそれぞれ100mg/lと10mg/lである。希釈率が 0.01 h^{-1} の時には固定化菌によってフェノールが効率よく分解され、30hの処理でフェノール濃度はほとんど0

Table 1 Values of parameters

$a = 0.86 \text{ h}^{-1}$	$n = 0.76$
$b_1 = 0.97 \times 10^{-3} \text{ g/L}$	$N = 290$
$b_2 = 3.48 \text{ (g/L)}^{-1.7}$	$R = 2.0 \times 10^{-3} \text{ m}$
$b_3 = 2.15 \times 10^3 \text{ (g/L)}^{-0.76}$	$V = 0.1 \text{ L}$
$b_4 = 5.0 \times 10^{-5} \text{ g/L}$	$\eta = 1.7-5.7 Y_M \text{ L/g}$
$f = 2.38$	$\phi_1 = 1.4 \times 10^{-6} \text{ m}^2/\text{h}$
$h = 7.0 \times 10^{-2} \text{ g/(L}\cdot\text{h)}$	$\phi_2 = 8.3 \times 10^{-6} \text{ m}^2/\text{h}$
$m = 2.7$	$\phi_1 = 1.0 \times 10^{-8} \text{ m}^2/\text{h}$

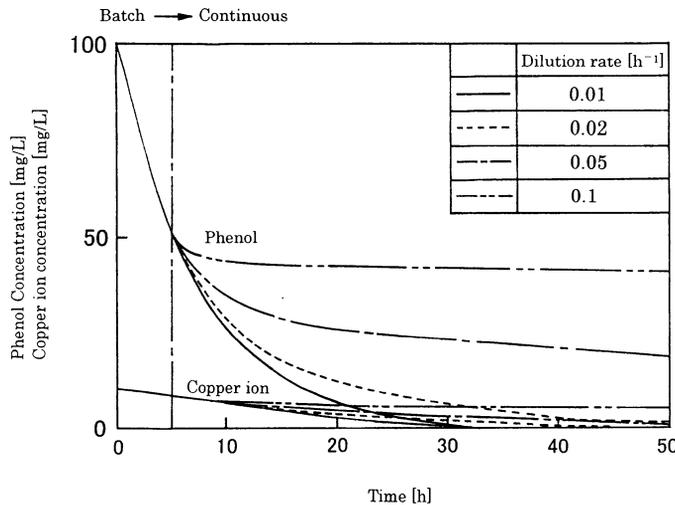


Fig. 8 Dynamic behaviors of phenol concentration and copper ion concentration in the change from a batch operation to a continuous operation by immobilized cells (initial phenol concentration, 100mg/l; initial copper ion concentration, 10mg/l)

になった。希釈率が高くなるとフェノール濃度の減少が遅くなり、希釈率が 0.05h^{-1} や 0.1h^{-1} では50hの処理でもフェノール濃度は $20\text{mg}/\ell$ 以上であった。希釈率が高い時フェノール濃度の低下が少なかったのはフェノールや阻害物質の銅イオンの流入量が大きいためにフェノールの蓄積速度が菌による分解速度よりも高くなった結果である。また、固定化ゲルビーズの数が増加すると菌の処理能力や銅イオンの吸着能力が増加するので、希釈率の高い連続処理も可能になると思われる。

要約

固定化菌による銅イオン含有フェノールの処理の効果をゲルビーズ内へのフェノールおよび銅イオンの浸透の動的挙動などから検討した。ゲルビーズ内のフェノールと銅イオンの濃度分布を測定した結果、ゲルビーズ中心部では銅イオン濃度が低いためにフェノール菌の増殖阻害のない領域が存在し、この領域ではフェノールが比較的容易に処理できることがわかった。固定化菌は $1\sim 10\text{mg}/\ell$ の比較的高濃度の銅イオン含有フェノールをほぼ完全に分解した。固定化ゲルビーズ内の菌の増殖やフェノールの処理を表す数式モデルが提出され、回分処理における計算値が実験的に検証された。固定化菌は回分処理だけでなく連続処理でも銅イオン含有フェノールを効果的に処理できることが示唆された。

謝辞

本研究を行うにあたり、フェノール分解菌 *Acinetobacter calcoaceticus* AH 株を提供頂いた大阪大学大学院工学研究科教授藤田正憲先生に深謝致します。

文献

- 高田 實監修：公害防止管理者試験 大気・水質・騒音, pp412, 弘文社, 大阪 (1991)
- 公害防止技術と法規編集委員会：公害技術と法規 [水質編], pp22-39, 丸善, 東京 (1987)
- 橋本 奨, 藤田正憲：活性汚泥より分離した3種のフェノール分解菌の同定とその性質について, 下水道協会誌, **24**, 27-33 (1987)
- 橋本 奨, 岩堀恵祐, 岩上昭夫：*Acinetobacter calcoaceticus* AH株のフェノール分解活性, 醗酵工学会誌, **70**, 267-271 (1992)
- Yang, R.D. and Humphrey, A.E.: Dynamic and steady state studies of phenol biodegradation in pure and mixed culture. *Biotechnol. Bioeng.*, **17**, 1211-1235 (1975)
- Jung, J., Sanji, B., Godbole, S. and Sofer, S.: Biodegradation of phenol, *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, **56**, 73-76 (1993)
- 平山けい子, 飛田修作, 平山公明：*Rhodotorula* 属酵母によるフェノールおよびモノクロロフェノールの分解, 水処理技術, **33**, 551-555 (1992)
- 戸田 清：固定化とは, 水質汚濁研究, **9**, 680-683 (1986)
- 橋本 奨：生物処理技術と微生物固定化技術の問題点, 水質汚濁研究, **9**, 684-689 (1986)
- 中村嘉利, 沢田達郎, 小森正樹：固定化菌による重金属イオン存在下のフェノールの微生物分解, 環境化学, **9**, 581-587 (1999)
- Jang, L.K., Lopez, S.L., Eastman, S.L. and Pryfogle, P.: Recovery of copper and cobalt by biopolymer gels. *Biotechnol. Bioeng.*, **37**, 266-273 (1991)
- Nakamura, Y., Origasa, H. and Sawada, T.: Mathematical modeling for diauxic growth in immobilized cell culture. *J. Ferment. Technol.*, **78**, 361-367 (1994)
- Kurosawa, H., Matsuno, M. and Tanaka, H.: Oxygen diffusivity in gel beads containing viable cells. *Biotechnol. Bioeng.*, **34**, 926-932 (1989)