

(19) 固定化細菌による芳香族化合物含有排水の処理に関する研究

STUDY ON TREATMENT OF WASTEWATER CONTAINING
AROMATIC COMPOUNDS BY IMMOBILIZED LIVING CELLS

橋 本 奨*, 藤 田 正 憲*

Susumu HASHIMOTO*, Masanori FUJITA*

ABSTRACT: It was investigated to treat the wastewater containing phenol and salicylate using both phenol degrading bacteria and recombinant degrading phenol and salicylate immobilized in polyvinyl alcohol (PVA). Immobilization of living cells was suggested to mitigate the inhibiting action of phenol. Using immobilized phenol degrading bacterial cells, high phenol loading operation could be achieved in comparison with suspended cells or activated sludge such as 3.0g/l·day of volumetric loading. Salicylate degrading gene from NAH plasmid was transformed into phenol degrading bacteria and recombinant degrading both phenol and salicylate was bred. Using activated sludge with recombinant cells immobilized in PVA, wastewater containing both phenol and salicylate could be treated effectively. Stability of plasmid in the recombinant was also investigated under conditions with or without selection pressures. It was concluded that immobilization of special kinds of living cells such as phenol degrading bacteria and/or recombinants containing aromatic compounds degradation-genes has many advantages for wastewater treatment.

KEYWORDS: IMMOBILIZED LIVING CELLS, PHENOL AND SALICYLATE DEGRADATION, RECOMBINANT, ACTIVATED SLUDGE WITH IMMOBILIZED CELLS

1. 緒 論

固定化活性汚泥法は、高汚泥濃度で曝気剪断の緩やかな高酸素溶解能を持つ嫌気・好気断続曝気運転により処理水の白濁現象もなく、最終沈殿池への固形物負荷軽減が計れ、高負荷処理が可能となるなどの利点を有している¹⁾が、それ以外にも特定の微生物への棲息場所を与え、処理系外への流出を防止するなどの効用が注目されている。さらに、芳香族化合物のような生育阻害作用を示す物質に対しては、固定化による微生物への阻害作用の緩和も期待されるため、分解微生物を固定化して処理に活用する方法は、極めて有利となる。また、現時点では規制を受けているが、組換え微生物の排水処理への活用においては、組換えプラスミドの安定性が重要で、微生物の固定化はその安定性を増すので²⁾、長期連続処理には不可欠な方法となる。これらの点を考慮すれば、将来の排水処理、特に特殊排水の処理では、ますます固定化法が注目されると予想される。

ここでは、固定化細菌の特殊排水処理への活用に関する基礎的知見を得ることを目的に、以下の研究を行っている。まず、芳香族化合物としてフェノールとサリチル酸を取り上げ、フェノール分解菌をPVA包括固定化し、固定化によるフェノール毒性の緩和効果を調べると共に、フェノールの連続処理実験より、固定化細菌による高負荷排水処理を検討した。次に、遺伝子組換えによりフェノール分解菌にサリチル酸分解能を賦与した菌を、PVA包括固定化して活性汚泥中に添加し、回分培養による両基質の分解速度を調べ、固定化組換え菌併用活性汚泥法と通常の活性汚泥法の芳香族化合物含有排水の処理機能を比較した。最後に、固定化組換え菌による排水の連続処理の可能性について考察している。

* 大阪大学工学部環境工学科, Dept. of Environmental Engineering, Osaka University

2. 実験材料ならびに方法

2.1 実験材料

1) 使用菌株 フェノール分解には, *Acinetobacter calcoaceticus* AH株³⁾, フェノールとサリチル酸の同時分解には, *Pseudomonas putida* BH株³⁾の栄養要求変異株である *P. putida* BH-M 21株(グリシン, シスチン要求性)に, pKT 230 ベクターにサリチル酸ヒドロキシラーゼ遺伝子(nah G)断片をつないで挿入した, *P. putida* BH-M 21 (pHF 400)株を使用した。

2) 培地 基礎フェノール培地として, フェノール1,000mg, K_2HPO_4 1,000mg, $(NH_4)_2SO_4$ 1,000mg, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 200mg, $FeCl_3$ 20mg, NaCl 100mg, $CaCl_2$ 100mgをイオン交換水1 lに溶解したもの(pH 7.6)を用いた。また, 合成排水として, 肉エキス 400mg, ペプトン 600mg, NaCl 30.3mg, KCl 14.0mg, $CaCl_2$ 18.54mg, $MgSO_4$ 20.5mg, $NaHCO_3$ 21.0mgをイオン交換水1 lに溶解したもの(pH 7.2, TOC 400mg/l)を用いた。増殖, 保存用には Bacto-peptone 10g, Bacto-yeast extract 5g, NaCl 5g, Glucose 1gをイオン交換水1 lに溶解した, あるいはそれを寒天で固化した, L培地(pH 7.6)を用いた。またL培地は, 必要に応じてストレプトマイシンを30mg/l添加して, プラスミドの脱落を防いだ。

3) 実験装置 *A. calcoaceticus* AHならびに *P. putida* BH-M 21 (pHF 400)株の大量培養には, 10 l容のジャーファーマンターを用いた。固定化細菌によるフェノールの連続処理では, 容積0.192 lのアクリル樹脂製円筒を曝気槽として使用し, その中に工業用パッドを使用したフィルターを浸水して, 固液分離を行った。実験ではこれを恒温水槽に入れて $25^\circ C \pm 1^\circ C$ に保持した。一方, 組換え菌によるフェノールとサリチル酸同時分解は, 三角フラスコによる $30^\circ C$ 回転振盪培養を行った。

2.2 実験方法

1) 固定化方法 *A. calcoaceticus* AH株を, ジャーファーマンターにて $30^\circ C$, 24時間培養後, 遠心集菌して105.8g/lの細胞懸濁液20gを準備した。これと20%PVA溶液を1:1の割合で混合し, 飽和ホウ酸溶液中に滴下して, ビーズ(平均直径3.6mm)を作成した。同様にして, *P. putida* BH-M 21 (pHF 400)株も固定化した。

2) 固定化細菌の再活性化 固定化操作中に低下した活性の回復を図るため, *Acinetobacter* では, フェノール濃度を300mg/lとした基礎フェノール培地を, *Pseudomonas* ではこれに更にサリチル酸を同量と, 要求アミノ酸各20mg/lを加えた培地を使用して, 約1日以上培養した。

3) 連続処理実験 フェノール濃度を, 100mg/l から1,000mg/lまで漸次増加させ, フェノール負荷量を高めた。期間中流入量は1.5 l/日, 滞留時間3.1時間, 通気量0.8 l/分, ビーズ充填率31.3%の一定運転条件を保った。また, 2~3日毎に曝気槽内よりビーズを取り出して洗浄し, ビーズ表面への浮遊物質の付着を防いだ。

4) 活性污泥の前培養 合成排水で培養された活性污泥混合液5mlをイオン交換水で4倍に希釈し, 20分間超音波発振器にて処理した。これの上澄液を滅菌合成排水に植菌して24時間振盪培養したものを, 活性污泥前培養液とした。

5) 回分処理実験 500 ml容の三角フラスコに, 滅菌合成排水250 mlにフェノールおよびサリチル酸を等量ずつ100 mg/l, 300 mg/lあるいは500 mg/lとなるように加えた培地を入れ, そこに乾燥重量で23 mg/lの活性污泥前培養液あるいは13 mg/lの活性污泥と固定化初期の乾燥重量で計算した10 mg/lの固定化組換え菌を植菌し, $25^\circ C$ にて回転振盪培養した。

6) フェノール初期分解速度の測定 500 ml容の三角フラスコに, 十分にフェノールで誘導した固定化細菌あるいは懸濁細菌を, 1,200 mg/lとなるように加え, それに1/15 M 磷酸緩衝液15 ml, 各種濃度のフェノール5 mlを入れて全容を250 mlとし, 回転振盪培養した。経時的にフェノール濃度を

分析して半対数図表にプロットし、その初期分解の傾きから、分解速度係数 $K(1/hr)$ を求めた。この時、反応液中の細胞濃度は、固定化および懸濁系共にほぼ同濃度に調整した。

7) 呼吸活性の測定 水切りしたビーズ 20g を 200ml 容の三角フラスコに入れ、酢酸ソーダ 1,000 mg/l と無機塩からなる培地を満たして、マグネティックスターラーで撹拌した。その時の DO 減少曲線より呼吸速度を求め、これをビーズ湿重量で除した値を、比呼吸活性 (mg/l/hr·g ビーズ) とした。

8) 試料の分析 試料はすべて、10,000 rpm, 10 分間遠心分離したのち、フェノール、サリチル酸、TOC の各濃度を測定した。フェノールは 4-アミノアンチピリン法⁴⁾で、サリチル酸は Schell⁵⁾ に準じて分析した。また、細胞濃度は OD_{600} あるいはそれを乾燥重量に換算して表した。ビーズ湿重量は、14 メッシュのふるい上で 15 分間水切りした後、その重量を測定した。また、ビーズの窒素含有量は、水切りしたビーズ 3~4 粒の TKN をケルダールにて測定し、ビーズ単位湿重量当りで表現した。

3. 実験成績

3.1 固定化によるフェノール阻害作用の緩和効果

固定化細菌ならびに懸濁細菌について、フェノール初期分解速度係数 K を求めて、それを初期フェノール濃度に対してプロットすると、図-1 のようになった。フェノール濃度の低いあいだは、懸濁細菌の方が分解係数は高いが、約 2,000mg/l を越えると、逆に固定化細菌の方がわずかではあるが分解係数が高くなった。さらに高濃度の 3,000mg/l 付近では固定化細菌も阻害を強く受け、懸濁細菌との間に差がみられなくなった。しかし、ある濃度幅を持っているとはいえ、明らかに固定化による阻害の緩和効果が認められた。

3.2 連続処理における固定化細菌の変化

次に、固定化細菌のみでフェノール排水の処理を行ったときの、処理性能について検討した。まず、連続運転期間中のビーズの湿重量、比呼吸活性、窒素含有量およびフェノール容積負荷量の経時変化をまとめると図-2 のようになった。ビーズ湿重量および比呼吸活性はともに負荷量が 1.0 g フェ

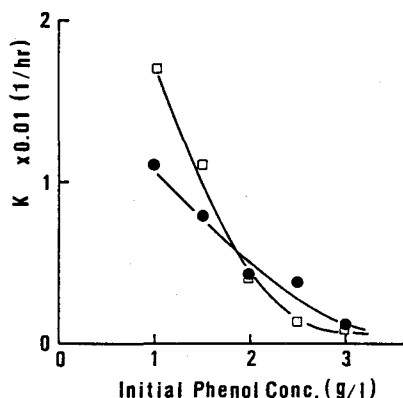


Fig.1 Effects of Initial Phenol Concentrations on the Degradation Coefficient of the Phenol in Both Suspended and Immobilized Cells. Symbol: □, Suspended cell; ●, Immobilized cell.

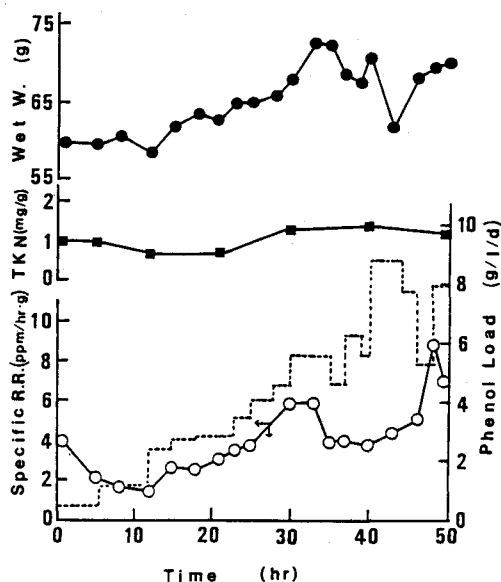


Fig.2 Daily Changes of Characteristics of Immobilized Cell in Continuous Phenol Treatment. Symbol: ○, Specific Respiration Rate; ●, Wet Weight of Bead; ■, TKN Content of Bead; ---, Phenol Loading Rate.

ノール/1/日以下では、若干の減少を示したが、それ以上では負荷量の上昇とともに増加した。特に負荷量が3.0 g/l/日以上になると、比呼吸活性は急激な増加を示したが、これに対して窒素含有量はほとんど変動せず、ビーズ内微生物濃度に、ほとんど変化がないことが示唆された。

3.3 連続処理における水質の変化

連続処理実験期間中の、流入水と処理水のフェノール濃度の変化を図-3に示す。負荷量が急激に増加した40日頃に処理水のフェノール濃度が400~500 mg/lを越えたが、全体に良好な水質の処理水が得られた。また、このデータより、フェノール容積負荷量に対する、フェノール除去率および処理水フェノール濃度の関係を求めると、図-4のようになった。フェノール容積負荷量が3.0 g/l/日以下では、処理水フェノール濃度は1.0 mg/l以下となり、それ以上の負荷量では処理水フェノール濃度は急激に悪化し、それにつれて除去率も低下した。

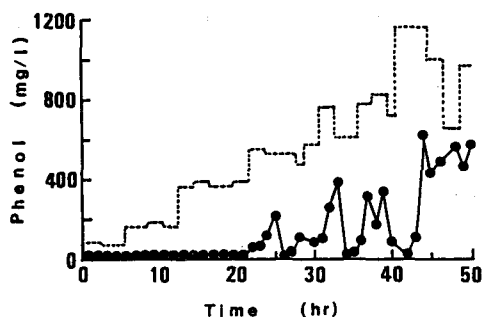


Fig.3 Daily Changes of Phenol Concentrations of Both Influent and Effluent in Continuous Phenol Treatment.

Symbol: ●, Phenol Conc. of Effluent;
---, Phenol Conc. of Influent.

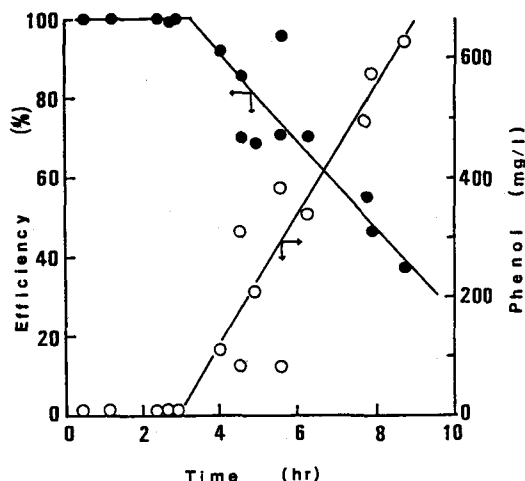


Fig.4 Effects of Volumetric Phenol Loadings on Phenol Removal Efficiency and Effluent Phenol Concentration.

Symbol: ●, Phenol Removal Efficiency;
○, Phenol Concentration of Effluent.

3.4 固定化組換え菌と活性汚泥の混合による処理

実際の排水では、フェノール単独で流入することはまれであるので、ここでは有機性排水にフェノールとサリチル酸が各種濃度で混合した場合を想定し、これに対処するため通常の活性汚泥に固定化細菌を投入した、固定化細菌併用活性汚泥法について検討した。ここで、フェノールやサリチル酸は、殺菌剤として広く使用されており、工場排水等への混入の可能性が高いことから、実験対象として選択された。また、フェノールとサリチル酸の同時分解を行うため、フェノール分解菌に遺伝子操作によりサリチル酸分解能を賦与した、組換え菌を固定化して使用した。ただし実験の都合で、フェノール分解菌は *Acinetobacter* の代りに *Pseudomonas* を使用している。本株は、フェノールは染色体上の遺伝子により分解するが、サリチル酸は導入されたサリチル酸ヒドロキシラーゼ遺伝子と染色体上のカテコール代謝経路の共同で分解する。また、組換え菌を使用するため、実験後の菌の管理を考えて、回分培養とした。

フェノール、サリチル酸の各濃度が300 mg/lの場合の、回分培養における活性汚泥菌体、TOC、フェノールおよびサリチル酸の各濃度変化を、半対数図表に示すと図-5~図-8のようになった。すべての図で直線関係が成立したが、フェノールおよびサリチル酸への誘導期と分解期に分かれ、その結果分解、増殖共に2本の直線で表された。

菌体濃度は、培養初期では固定化組換え菌を入れた併用法の方が浮遊細菌が少ないにもかかわらず、培

養と共に併用法の菌体濃度が、活性汚泥法を上まわった。一方、図-6のTOC除去では、培養初期から併用法の方がTOC除去速度が高く、最後までその差は縮まらなかった。フェノール分解速度は、活性汚泥法と併用法の間に、わずかの差しかみられなかった。しかし、サリチル酸の分解では、併用法はすみやかにサリチル酸を分解したのに対し、活性汚泥法では分解速度が大きくなるまでに長時間必要であった。全実験を通じて、活性汚泥単独でもフェノールおよびサリチル酸は分解除去されたが、これは活性汚泥中

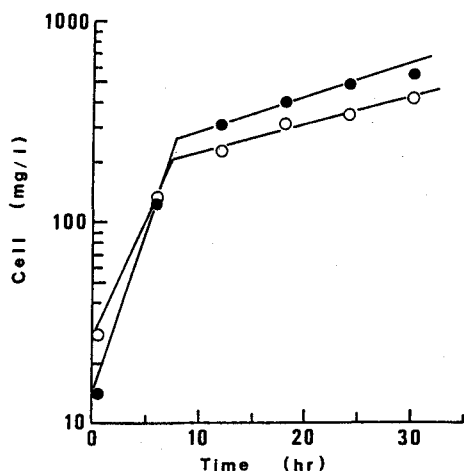


Fig.5 Time Course of Activated Sludge Cell in Treatment of Wastewater Containing Phenol and Salicylate.

Symbol: ○, Activated Sludge;
●, Activated Sludge with Immobilized Recombinant.

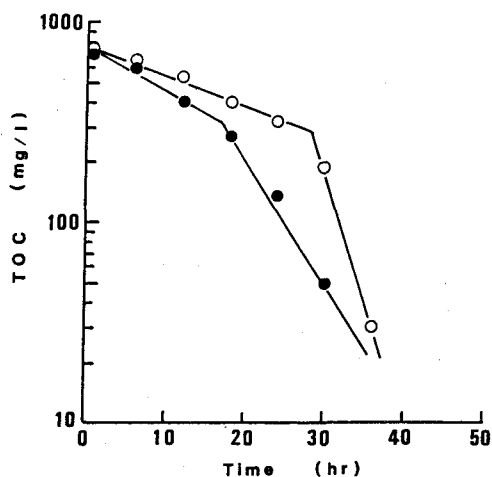


Fig.6 Time Course of TOC Removal in Treatment of Wastewater Containing Phenol and Salicylate.

Symbol: ○, Activated Sludge;
●, Activated Sludge with Immobilized Recombinant.

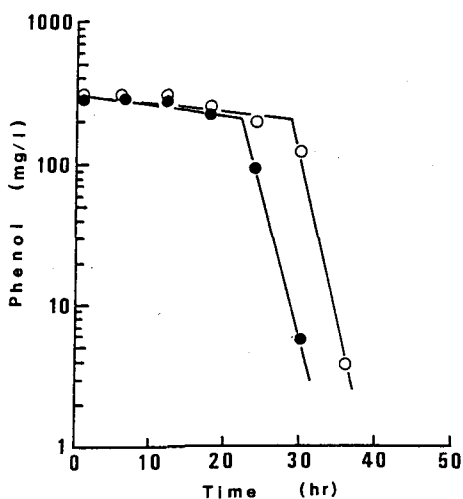


Fig.7 Time Course of Phenol Degradation in Treatment of Wastewater Containing Phenol and Salicylate.

Symbol: ○, Activated Sludge;
●, Activated Sludge with Immobilized Recombinant.

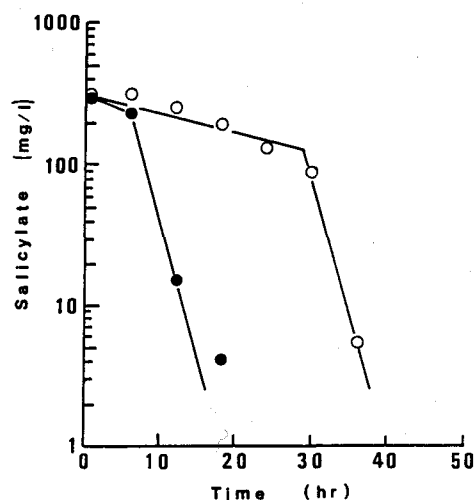


Fig.8 Time Course of Salicylate Degradation in Treatment of Wastewater Containing Phenol and Salicylate.

Symbol: ○, Activated Sludge;
●, Activated Sludge with Immobilized Recombinant.

に存在していた分解菌が、馴養されたためと考えられる。

フェノールおよびサリチル酸濃度、各 100mg/l と 500mg/l についても同様に分解実験を行った。これらの結果を比較するため、各実験について菌体濃度の時間変化より対数増殖期初期の比増殖速度 μ (1/day) を求め、また、TOC、フェノールおよびサリチル酸濃度の経時変化より、それらが 90% 除去されるまでに必要な時間 T_{90} (hr) を求めて、表-1 に一括表示した。表から明らかなように、比増殖速度はいずれの濃度も、併用法の方が大きかった。また、各基質が 90% 除去に必要な時間も、併用法の方が短かった。特に、サリチル酸の分解でその差が顕著であった。

Table 1 Summaries of Specific Growth Rates and 90% Removal Times in Treatment of Wastewater Containing Phenol and Salicylate.

Item	Phenol & Salicylate Conc.	Activated Sludge	Activated Sludge with Immobilized Recombinant
μ	100 mg/l	8.06 1/day	10.03 1/day
	300 "	6.22 "	8.64 "
	500 "	3.82 "	7.10 "
T_{90} of TOC	100 mg/l	29 hours	17 hours
	300 "	33 "	27 "
	500 "	42 "	38 "
T_{90} of Phenol	100 mg/l	15 hours	9 hours
	300 "	32 "	16 "
	500 "	42 "	38 "
T_{90} of Salicylate	100 mg/l	23 hours	9 hours
	300 "	33 "	11 "
	500 "	41 "	14 "

μ : Specific Growth Rate at Early Log Phase.

T_{90} : Times Required for 90% Removal of Each Substrate.

4. 考 察

包括固定化法の利点として、一般的に pH や温度などの環境条件の変動に対して安定になることが認められている⁶⁾。従って、フェノールの場合、ビーズ表面の細菌は阻害あるいは殺菌されても、基質がビーズ内部に拡散する過程で、低濃度になって分解されるので、ビーズ内のある一定深さ以上では、阻害効果が薄れてしまうと考えられる。データは少ないが、図-1 から明らかなように、固定化細菌は懸濁細菌に比べ、低濃度では基質の拡散が律速になり、分解速度は低い、高濃度では逆に拡散律速により阻害効果が緩和され、活性が保たれたと推測される。しかし、より高濃度になると、ビーズ内部まで阻害作用をひき起こすレベルのフェノールが浸透し、懸濁細菌と同様に、活性が失われてしまったと考えられる。Tanaka *et al*⁷⁾ は、ゲルビーズ中に微生物阻害効果を持つ有機溶剤を吸収しうる植物油を封入し、阻害剤のビーズ内への拡散速度を遅くして、微生物活性を維持したと報告しているが、これは本実験結果を裏づけるものと言えよう。また本実験では、すべてのフェノール濃度において、フラスコ内の溶存酸素は 5mg/l 以上の十分高い濃度に保たれていた、Hashimoto *et al*⁸⁾ のシミュレーション結果を参照すれば、ビーズでの溶存酸素律速はなかったと考えられる。

固定化細菌により、実験室的には簡単なフィルターを曝気槽内に浸水するだけで、沈殿池を設けなくとも、連続的にフェノールを高負荷処理することができた。これが直ちに沈殿池が不要であることに短絡するのではなく、固定化活性汚泥法も含めこれらの実用化においては、澄明な処理水を得るために、ビーズ

からの剝離微生物や浮遊活性汚泥の分離やビーズの分離・返送などに、沈殿池やそれに相当する固液分離装置を使用しなければならないと考えられる。しかし、高濃度活性汚泥法を採用しても、沈殿池などへの負荷は、従来に比して極めて低くなることが期待される。

さらに、馴養活性汚泥による処理では、一旦、高フェノール負荷により損傷を受けた場合、活性の回復には長時間を必要とした⁹⁾が、固定化細菌では、図-2の48日目の比呼吸活性やビーズ湿重量の変化から明らかなように、負荷をさげると直ちに活性の回復が見られた。もちろん処理水回復までには時間が必要であるが、活発な微生物がビーズ内に存在しているため、回復にはあまり時間がかからないと考えられる。以上より、フェノールのような特殊な排水には、固定化細菌処理が優れていることが明らかにされた。

つぎに、フェノールやサリチル酸のような特殊排水が、普通の有機性排水に混合された場合の対策として、通常の活性汚泥に固定化された分解細菌を添加した、固定化細菌併用活性汚泥法で対応することが考えられる。これは、通常の活性汚泥に懸濁細菌を投入しても、流出する危険性があるので、固定化により分解細菌に棲息地を与えて、生態学的安定性を増す効果が期待される。また、難分解性の2基質が混合した場合、一般に2種類の微生物を固定化しなければならないが、1つの菌に2種類の基質分解能を持たせれば、取扱う微生物は1種類でよいことになる。そのため、ここでは自然界より分離したフェノール分解菌を育種し、その排水処理への活用を検討した。

フェノール、サリチル酸共に生物阻害作用を有しているが、その阻害強度は区別せず、実験には同濃度を採用した。表-1から明らかなように、フェノール、サリチル酸濃度が高いほど、比増殖速度は小さくなり、両基質による生育阻害が表れていた。しかし、活性汚泥法に比べ、併用法の比増殖速度が高いのは、固定化細菌によりフェノールとサリチル酸が分解され、阻害作用が取り除かれたためと考えられる。さらに両基質の分解で増殖した固定化細菌の遊離や、両基質の分解で生じた利用しやすい中間体が放出され、これを活性汚泥微生物が利用したため、全菌体濃度が高くなったと推測される。また、図-7,8に示されるように、固定化細菌を入れなくても活性汚泥は馴養され、フェノールおよびサリチル酸を分解するようになる。しかし、90%除去に必要な時間 T_{90} から明らかなように、固定化細菌併用法では極めて短時間で分解される。これは、実排水の処理において、フェノールやサリチル酸の流入が変動したときに、ビーズ内に常に分解微生物が大量に存在するため、ただちに対応しうることを示唆している。また、フェノールやサリチル酸分解菌のように活性汚泥中に広く分布する微生物では、活性汚泥単独処理でも馴養期間は短くてすむが、ポリビニルアルコールのように分解菌が必ずしも自然界に広く分布していない場合、本固定化細菌併用法は有効であろう。

また表-1から明らかなように、フェノールの90%除去に必要な時間より、サリチル酸の方が短い。これは、導入された外来遺伝子によるサリチル酸分解の方が、細菌本来の染色体遺伝子によるフェノール分解より、活性が高いことを示している。この理由は、使用したベクターのコピー数が多いので酵素生産量が多くなったことや、十分に誘導しなくてもベクターのプロモーターによりサリチル酸ヒドロキシラーゼがすばやく生産されたためと推察される。

最後に、組換え菌の排水連続処理への応用では、導入されたプラスミドの安定性が問題となる。本菌の組換えプラスミドは、懸濁培養中でもベクターの抗生物質（ストレプトマイシン）耐性遺伝子に、選択圧をかけておれば100%安定しており、サリチル酸単独培地での培養でも同様の効果が認められた。しかし、有機性基質にサリチル酸が混在しているような本研究の場合には、プラスミドの安定性は少し低下する（24時間培養で約70%以上が保持する）。ところが、固定化した場合、脱落しやすい細菌でも、プラスミドの安定性は大幅に増加すると報告されている²⁾。従って、組換え菌を固定化して使用方法は、阻害性の緩和、棲息地の提供、プラスミドの安定化などの利点を最大限活用する、有効な方法であることが明らかとなった。

5. 要約ならびに結論

固定化細菌の特殊排水処理への活用に関する基礎的研究として、固定化フェノール分解菌によるフェノール単独排水の処理ならびに固定化組換え菌併用活性汚泥法によるフェノール、サリチル酸含有合成排水の処理について検討し、以下の結論が得られた。

(1) 固定化により基質の阻害作用が緩和されるので、フェノールのような排水の高負荷処理には有利であることが明らかとなった。

(2) 本実験では、曝気槽に浸水したフィルターによる固液分離装置だけで、固定化細菌による連続高負荷運転が可能であった。また、高負荷により分解菌が損傷を受けても、ただちに活性が回復することが示唆された。

(3) 連続処理実験において、フェノール容積負荷量が 3.0 g/l/日までは、処理水フェノール濃度は 1 mg/l 以下となったが、それ以上の負荷量では急激に水質は悪化した。

(4) 固定化組換え菌併用活性汚泥法により、フェノールとサリチル酸を含有する合成排水を効率よく分解処理できた。特に、サリチル酸の分解が早く、遺伝子組換えによる分解促進効果が示唆された。

(5) 選択圧の有無による外来プラスミドの安定性について考察した。ついで固定化によりプラスミドの安定性が向上することから、固定化組換え菌による長時間連続処理の可能性を示唆した。

以上の結果より、分解菌や組換え菌を固定化して使用することは、阻害作用の緩和、分解細菌への棲息地の提供、さらにプラスミドの安定性の増大などの利点から、排水の連続処理に有効な方法であることが示された。

本研究の一部（固定化フェノール分解菌による処理）は、第 22 回下水道研究発表会（昭和 60 年度）および第 23 回下水道研究発表会（昭和 61 年度）にて発表した。また、実験に多大の御協力をいただいた、当時大学院生の岩上昭夫ならびに卒論学生の加藤正一の両君に感謝致します。

参 考 文 献

- 1) 橋本 奨・古川憲治・濱 宏：“ポバールによる活性汚泥の固定化に関する研究”，衛生工学論文集，Vol. 22，pp.195-203，(1986)
- 2) Nasri, M., Sayadi, S., Barbotin, J. N., Dhulster, P., Thomas, D.: “Influence of Immobilization on the Stability of pTG201 Recombinant Plasmid in Some Strains of *Escherichia coli*”, Appl. Environ. Microbiol., Vol. 53, pp.740-744, (1987)
- 3) 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，Vol. 24, (273), pp.27-33, (1987)
- 4) Yan, R. D., Humphrey, A. E.: “Dynamic and Steady State Studies of Phenol Biodegradation in Pure and Mixed Culture”, Biotech. & Bioeng., Vol. 17, pp.1211-1235, (1975)
- 5) Schell, M. A.: “Cloning and Expression in *Escherichia coli* of the Naphthalene Degradation Genes from Plasmid NAH7”, J. Bacteriol., Vol. 153, pp.822-829, (1983)
- 6) 千畑一郎編：“固定化酵素”，講談社サイエンティフィク，東京，(1875)
- 7) Tanaka, H., Harada, S., Kurosawa, H.: “A New Immobilized Cell System with Protection against Toxic Solvents”, Biotech. & Bioeng., Vol. XXX, pp.22-30, (1987)
- 8) Hashimoto, S., Hama, H., Sugano, E.: “Model Analysis of Immobilized Activated Sludge Process”, Technology Reports of the Osaka University, Vol. 38, No. 1946, pp.327-336, (1988)
- 9) 橋本 奨・藤田正憲：“活性汚泥によるフェノール排水処理の効率化に関する研究(1) フェノール馴養活性汚泥による処理”，下水道協会誌，Vol. 23, (270), pp.39-46, (1986)