

〔醸酵工学 第55巻 第1号 22-29, 1977〕

メタン発酵における重金属化合物, 無機塩類, 炭化水素系化合物および抗生物質の影響について*

園田 頼和・清古 義雄

工業技術院微生物工業技術研究所

Effects of heavy metal compounds, inorganic salts, hydrocarbon compounds and antibiotics in methane fermentation.* SONODA, Y. and Y. SEIKO (*Fermentation Research Institute, Inage, Chiba*) Hakkokogaku 55: 22-29, 1977.

In an earlier paper, the biodegradability and toxicity of various carbohydrates and alcohols under the anaerobic digestion were reported. In this paper, the effects of heavy metal compounds, inorganic salts, hydrocarbon compounds and antibiotics on the gas production are reported.

Studies were carried out through thermophilic digestion (54°C), with seed cultures made up using synthetic medium.

1. Heavy metal compounds: Effects of Cu-compounds ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, Cu_2O , CuCl , CuS etc.), Cr-compounds ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, $\text{Cr}(\text{OH})_3$, Cr_2O_3 etc.), Ni-compounds ($\text{NiSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, NiS etc.) and Hg-compounds (HgCl_2 , HgNO_3) were investigated. The permissible concentrations of toxicity were in the range of 200-400 ppm for Cu, 100-500 ppm for Cr and 40-120 ppm as Ni.
2. Inorganic salts: The permissible concentrations of NaCl and NH_4Cl were 30,000 ppm and 10,000 ppm respectively, but those of NaNO_2 , NaNO_3 and KCN , were only 100 ppm.
3. Hydrocarbon compounds: The permissible concentrations were 500-10,000 ppm for phenol, toluene and cresol, 50 ppm in ABS, 500 ppm in PCB.
4. Antibiotics: The addition of Penicillin, Streptomycin and Kanamycin at a concentration of 5,000 ppm had no effect on the gas production.

メタン発酵法は種々の有機性物質を効率よく分解するとともに燃料ガスの回収利用ができることから、近年石油資源需給事情の逼迫を契機として熱エネルギー回収の有力な手段として各国でみなおされるようになった。

このようなすう勢から発酵の対象となる廃棄物も従来の都市下水汚泥や発酵・食品工場廃水のみならず、今後は有機化学薬品や各種コンビナートの廃水、都市ごみなどの固形廃棄物の処理にも広く応用されることが期待される。

しかし、これらの廃棄物には多くの発酵阻害物質の混入が予想され、そのためメタン発酵に対する種々の

物質の阻害の有無および許容濃度を明らかにしておくことはメタン発酵法適用の可否の判定および処理プラントの設計や運転管理上きわめて重要な意義がある。

このような目的からさきに種々の炭水化合物およびアルコール類について分解性と阻害性の検討を行ったが、¹⁾今回さらに種々の重金属化合物, 無機塩類, 炭化水素系化合物および抗生物質のメタン発酵に対する影響について検討したのでその結果について報告する。

実験方法

Seed 液の調製 実験は高温発酵 (54°C) により行い、5l ジャーフェーマンター (液量 4l) を発酵槽とし Table 1 に示す合成培地を定量ポンプによって 100 ml/l/d (有機物負荷 5 g/l/d) の条件で連続的に添加して常に一定の seed 液を培養し、阻害度測定の実験に供した。

* メタン発酵における各種化合物の分解と阻害 (第2報)

Degradation and Toxicity of Various Compounds in Anaerobic Digestion (II)

Table 1. Composition of medium for seed culture.

K_2HPO_4	3 g/l
KH_2PO_4	2 //
$(NH_4)_2CO_3 \cdot H_2O$	5 //
Na_2CO_3	3 //
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	1 //
Glucose	35 //
Corn steep liquor	35 //

実験装置 阻害度の測定には Fig. 1 示す装置を用い、あらかじめ生成ガス (CH_4 約 70%, CO_2 約 30%) で置換して空気を排除した発酵フラスコ (100 ml) に上記の seed 液を 50 ml ずつ分注器で嫌氣的に分注した後、合成培地を 5 ml ずつ 5 日間添加 (同時にフラスコ内の発酵液 5 ml 抜き取り) し、各発酵フラスコのガス生成量が定常状態に達した後、阻害度の測定実験に供した。

阻害度の測定は上記フラスコに各種化合物を、標準として 0~5,000 ppm の範囲で添加し、さらにおののに対し 5% グルコース溶液 5 ml ずつ添加した後、経時的にガス生成量を測定して対照 (5% グルコース液のみ、阻害物無添加) の最高ガス生成量に対する比率 (%) で表示した。

また測定は同一条件のフラスコを 3 本ずつ作成し、さらに同一測定実験を 2 回繰り返してその平均値をとった。

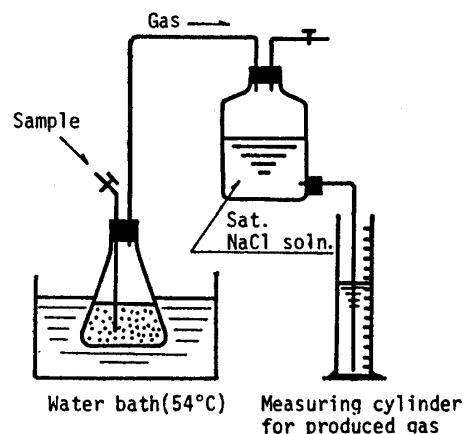


Fig. 1. Diagram of apparatus.

対照の最高ガス生成量は添加後 6~7 日目で 230~250 ml の範囲にあり、またガス生成がほとんど時間に比例して直線的に進行する添加後 1 日目までの平均ガス生成速度は 130~160 ml/d/50 ml (108~133 ml/h/l) であった。

実験結果

重金属化合物

1) 銅化合物 銅化合物として $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, Cu_2O , CuO , $CuCl$, $CuCl_2 \cdot 2H_2O$, $Cu(OH)_2$, CuS および $Cu(CN)_2$ についておのの 0~5,000 ppm の濃度範囲に添加してガス生成に及ぼす影響を検討した。

阻害の状態は Fig. 2 に示すように銅化合物の種類

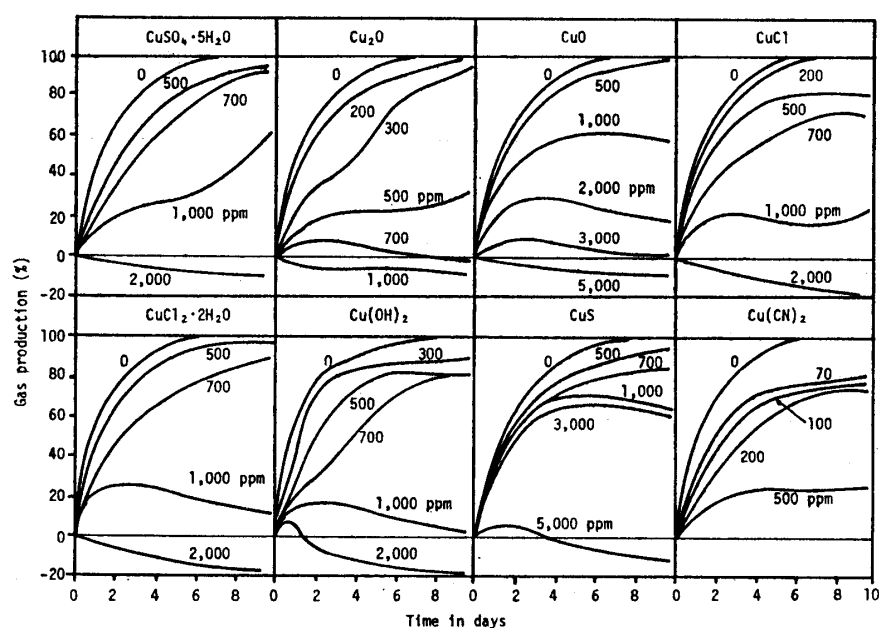


Fig. 2. Effect of Cu-compounds on gas production in thermophilic digestion.

によって異なるが、対照のガス生成量の80%までを許容限界とすれば CuS および $\text{Cu}(\text{CN})_2$ を除き Cu 濃度として 200~400 ppm の範囲にあった。 CuS は最も阻害が少なく、5,000 ppm の濃度にいたってはじめてガス生成は停止する。

これに対し $\text{Cu}(\text{CN})_2$ は最も阻害が著しく、500 ppm の添加でガス生成量は対照の20%に低下するが、これは結合する CN 基の相乗作用によるものと推察される。

2) クローム化合物 クローム化合物では Fig. 3 に示す $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, $\text{Cr}(\text{OH})_3$, Cr_2O_3 , $\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{K}_2\text{Cr}_2(\text{SO}_4)_4 \cdot 24\text{H}_2\text{O}$ および $\text{Cr}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ の6種について阻害度を測定したが、銅化合物に比較すれば阻害は一般に軽度である。

3価クロームに比し6価クロームの阻害が大きいが、3価クロームでも硝酸根を有するものは阻害が著しい。

3) ニッケル化合物 Fig. 4 に示す $\text{NiSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{Ni}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ および NiS の5種について測定した。 NiS は最も阻害が少なく、700 ppm (Ni として 453 ppm) の濃度でも7日後には対照の80%以上のガス生成量が得られたが、これ以外の化合物ではおおむね 200~300 ppm (Ni 濃

度として 40~120 ppm) の範囲であって、500 ppm 以上の濃度に達すると極端にガス生成が阻害される。またクローム化合物の場合と同様に硝酸根を有する $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ が最も強い阻害を示した。

4) 水銀化合物 HgCl_2 および HgNO_3 の影響を Fig. 5 に示す。 HgCl_2 では 2,000 ppm (Hg として 1,480 ppm) まで許容できるのに対し、 HgNO_3 では 1,000 ppm でガス生成は対照の20%以下に低下し、 NO_3 基の阻害が顕著に認められる。

5) 連続処理時における銅およびクロームの影響 以上種々の重金属化合物につき回分試験によってガス生成におよぼす影響を検討したが、さらに $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ および $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ について連続添加処理実験を行い、長期間に渉る金属塩添加の許容濃度を回分試験による測定結果と比較した。

実験は回分試験に用いたものと同じ装置 (Fig. 1) を使い、seed 液および合成培地に $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ および $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ を 0~2,000 ppm の範囲の各濃度に添加し、負荷量 5 ml/l/d の条件で約20日間の連続処理実験を行った。

実験の結果は、Fig. 6 に示すように対照のガス生成

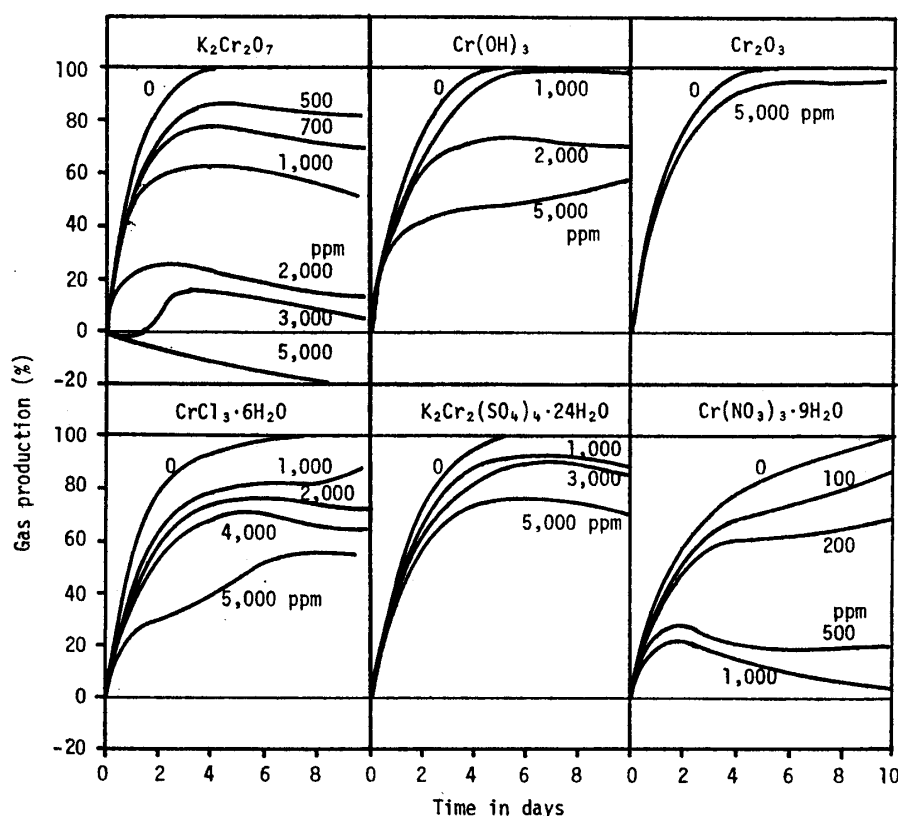


Fig. 3. Effect of Cr-compounds on gas production in thermophilic digestion.

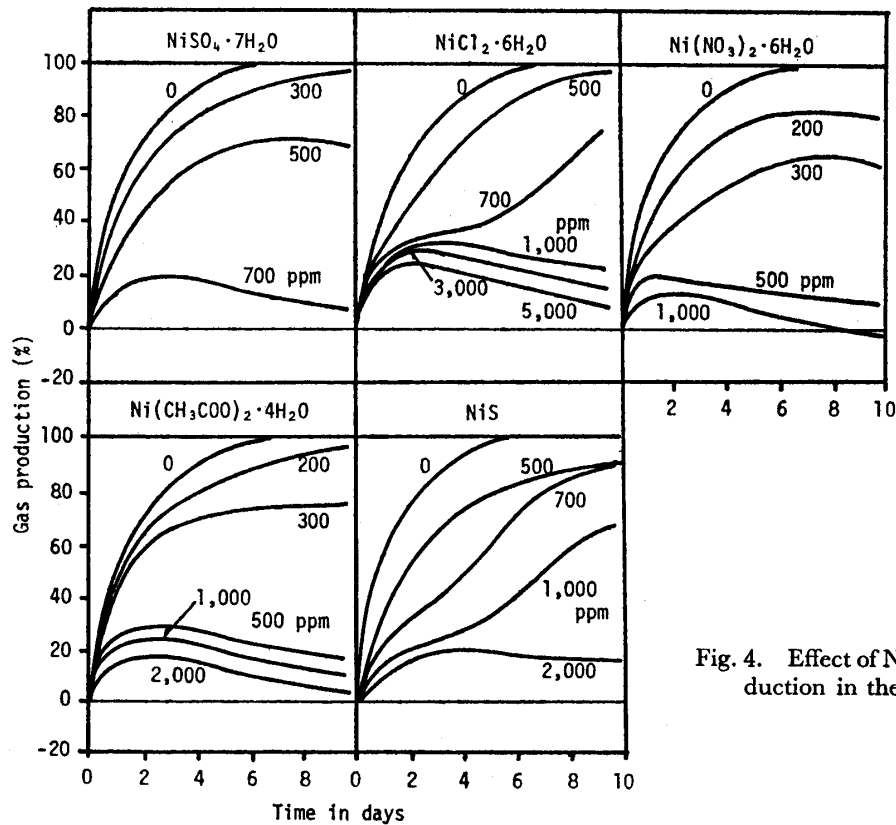


Fig. 4. Effect of Ni-compounds on gas production in thermophilic digestion.

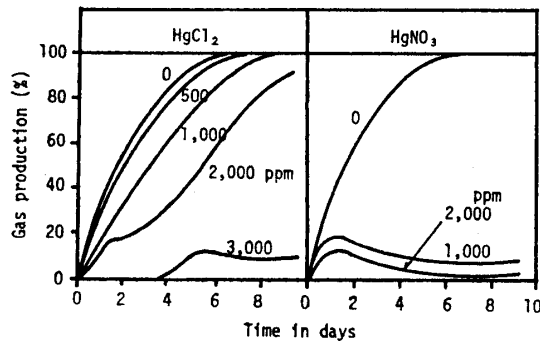


Fig. 5. Effect of Hg-compounds on gas production in thermophilic digestion.

量に対する百分率でガス生成量を表示したが、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ では 700 ppm 以下、また $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ では 500 ppm 以下の濃度で連続的に添加してもメタン発酵を維持することが可能であり、両者の回分試験により求められた許容濃度 (Fig. 2 および 3) と良く一致した結果が得られた。

連続発酵時における発酵液の pH は、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ を 0~700 ppm 添加の場合 7.8~7.9 の範囲にあって良好な発酵状態を示しているが、1,000 ppm 添加の場合には pH は次第に低下して 17 日目には 5.7 となり、ガス生成の阻害による有機酸の蓄積を示している。さらに

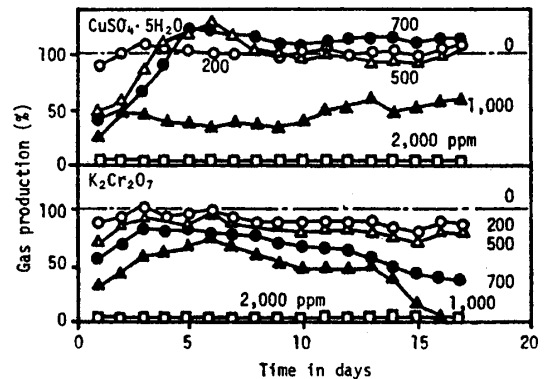


Fig. 6. Effect of CuSO_4 and $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ on gas production in continuous digestion.

2,000 ppm 添加の場合は同じく 17 日目に pH は 7.8 を示し、ガス生成と同時に酸生成の過程まで阻害されていることが認められた。

また $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 添加の場合では、0~500 ppm 添加では pH は 7.2~7.7 を示し、700 ppm 添加では 17 日目に 5.7、同じく 1,000 ppm 添加では 5.5 を示した。

生成ガスの組成は両者とも許容濃度以下の場合には CH_4 65~70%、 CO_2 30~35% の範囲にあったが、ガス生成に阻害を受けた $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1,000 ppm 添加の場合には 17 日目に CH_4 45%、 CO_2 55% の組成を示

Table 2. Permissible concentrations of heavy metal compounds in anaerobic digestion.

Compound	Permissible conc. (ppm)	
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	700 (	178 as Cu)
Cu_2O	300 (	266 //)
CuO	500 (	399 //)
CuCl	500 (	321 //)
$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	700 (	261 //)
$\text{Cu}(\text{OH})_2$	700 (	456 //)
CuS	700 (	465 //)
$\text{Cu}(\text{CN})_2$	70 (	38 //)
$\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$	500 (	88 as Cr)
$\text{Cr}(\text{OH})_3$	1,000 (	505 //)
Cr_2O_3	>5,000 (>3,422	//)
$\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1,000 (	195 //)
$\text{K}_2\text{Cr}_2(\text{SO}_4)_4 \cdot 24\text{H}_2\text{O}$	3,000 (	156 //)
$\text{Cr}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	100 (	13 //)
$\text{NiSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	300 (	63 as Ni)
$\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	500 (	123 //)
$\text{Ni}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	200 (	40 //)
$\text{Ni}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	300 (	71 //)
NiS	700 (	453 //)
HgCl_2	2,000 (	1,478 as Hg)
HgNO_3	1,000 (<	764> //)

した。

6) 考察 以上の実験で求められた重金属化合物のメタン発酵に対する許容濃度を総括して Table 2 に示す。 NO_3 , CN 基を含む一部の化合物を除き, 化合物量として 300~700 ppm の比較的高い範囲にあり, 好気処理法に比し嫌気処理法は重金属に対してはかなり耐性が強い傾向にあることが認められた。

金属量レベルで比較すると硫化物が最も阻害が少なくこれについて水酸化物, 酸化物など不溶性の形のものが阻害が少ない。

都市下水処理における汚泥消化に関する報告で McDermott²⁾ は硫酸銅として 410 mg/l までの添加では消化機能の低下は生じなかったと報告しているが, 消化槽中の溶解態銅の濃度は最大 0.7 mg/l であって, 数千 mg/l という全銅濃度値に比しきわめて少ないことを認めている。

また同じく汚泥消化に対するニッケルの阻害に関する実験では, ニッケルとして 40 mg/l の濃度で支障の

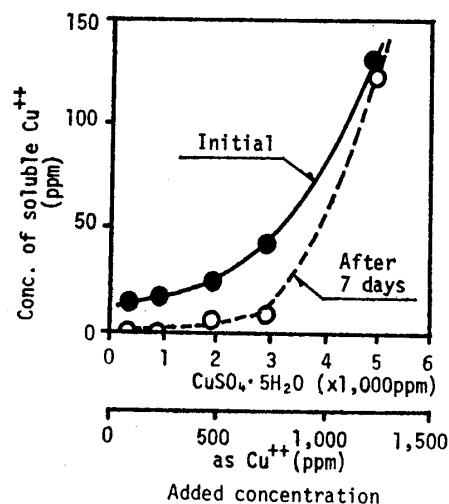


Fig. 7. Decrease of soluble copper in digestive fluid under thermophilic digestion.

ないことを認め, 溶解性のニッケルが消化槽内で不溶性の形に変わることは興味があると報告している。³⁾

ここで述べられた重金属の嫌気消化における挙動は, 可溶性の重金属塩が発酵液中の硫化物と結合して不溶性の塩を形成することを示しているが, この現象は, さきに報告した可溶性硫化物除去のため鉄塩を添加して行った筆者らの実験⁴⁾によっても証明される。

これらの事項に関し, 硫酸銅を用い, その添加量と発酵液中の可溶性銅の関連を検討した。

実験は合成培地 (Table 1) を用い, seed 液 50 ml に対し 5 ml/d の添加を10日間行って定常状態とした後, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ を 0~5,000 ppm (Cu として 0~1,275 ppm) の範囲に5本の発酵フラスコに対しおのおの添加した。

銅濃度の測定は添加直後および7日後の発酵液を採取し, 遠心分離によってスラッジを分離, 上澄液中の銅濃度を測定して可溶性銅濃度とした。結果は Fig. 7 に示すように添加直後で既に添加銅の75~90%が不溶化されている。7日後ではさらに上澄液中の可溶性銅は減少し, 1,000 ppm 以下の添加ではほとんど検出されなかった。

硫酸銅の阻害について行った回分および連続試験の結果 (Fig. 2 および 6) では添加量が 1,000 ppm 以上の濃度になるとガス生成に対する阻害があらわれており, これを Fig. 7 の結果から考察すると発酵液中に可溶性銅が現れるようになると阻害が顕著になると考えてよい。

従ってメタン発酵に対する重金属塩の許容濃度は, 発酵液中の特に可溶性硫化物濃度の多少によって大き

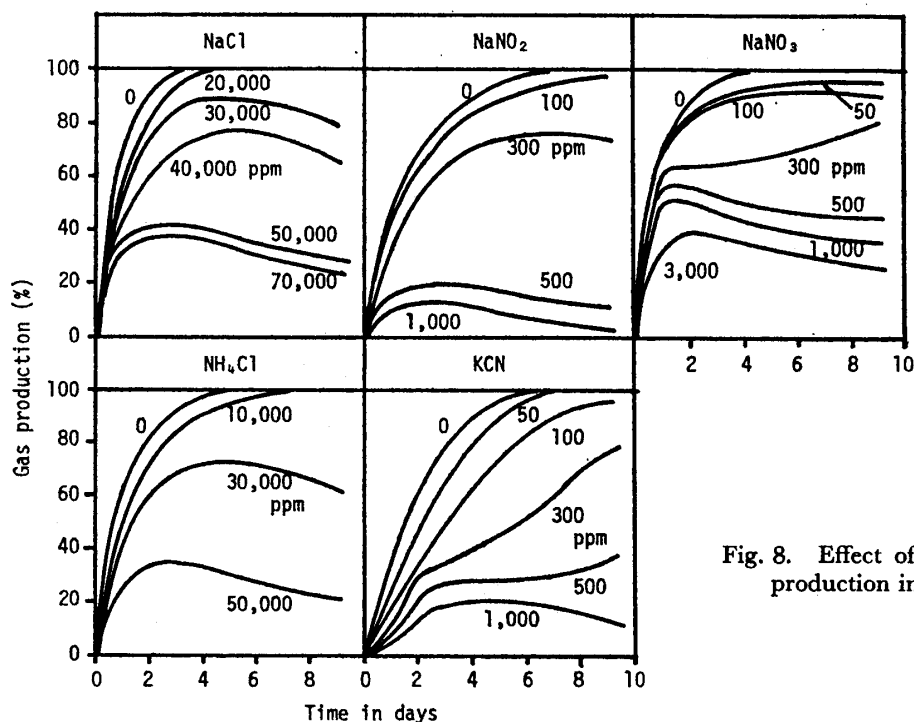


Fig. 8. Effect of inorganic salts on gas production in thermophilic digestion.

く影響される。また Yamada および Tonomura⁵⁾ は筆者の合成培地および seed を用いて嫌気下における水銀化合物の挙動を検討した実験で、添加した Hg^{++} が発酵液中の硫化鉄と置換、不溶化することを報告している。

以上の結果から重金属の阻害に対しては発酵槽に Na_2S などの可溶性硫化物、または槽内で還元されて硫化物を生成する硫酸根の添加によって、メタン発酵に対する重金属の阻害作用を軽減することができる。

無機塩類 NaCl , NH_4Cl , NaNO_2 , NaNO_3 および KCN について阻害度の測定を行った。その結果を Fig. 8 に示す。

NaCl では 20,000 ppm までほとんどガス生成に対する影響はなく、30,000 ppm まで許容できる。

これに対し同じ Na 塩でも NO_2 , NO_3 基を有するものでは前項の重金属化合物の場合と同様にガス生成に対する阻害は著しく、 NaNO_2 , NaNO_3 とともに許容限界は 100 ppm であった。また NH_4Cl は NaCl に比較すればわずかに阻害が強い。

KCN の場合は K イオンの影響というよりは CN 基の阻害であるが、100 ppm 以上の濃度になると阻害が著しい。しかし活性スラッジなどの好気性菌に比較すれば、嫌気性菌ははるかに強い耐性を示している。

Table 3 に各塩類の許容限界濃度を総括して示す。

炭化水素系化合物 フェノール類, ABS や PCB

Table 3. Permissible concentration of Na-, NH_4 - and K-salts in anaerobic digestion.

Compound	Permissible conc. (ppm)
NaCl	30,000
NaNO_2	100
NaNO_3	100
NH_4Cl	10,000
KCN	100

等の有機化成品および重油などの炭化水素系化合物について検討した。

フェノール類としてフェノール、トルエン、ペンタクロルフェノール (PCP), *o*-, *m*- および *p*-クレゾールの影響について測定した結果を Fig. 9 に示す。

PCP 以外は約 500 ppm 以下の濃度ではガス生成はほとんど影響されず、2,000 ppm 以上の濃度になって強く阻害をうける。活性スラッジ法などの好気処理ではフェノール濃度 300 ppm 以上になると強く阻害されるが、⁶⁾ 嫌気処理の方は耐性が強く、それ程鋭敏に阻害されない。

PCP の阻害は著しく、わずか 15 ppm の濃度でガス生成は対照の約 40% に減少する。

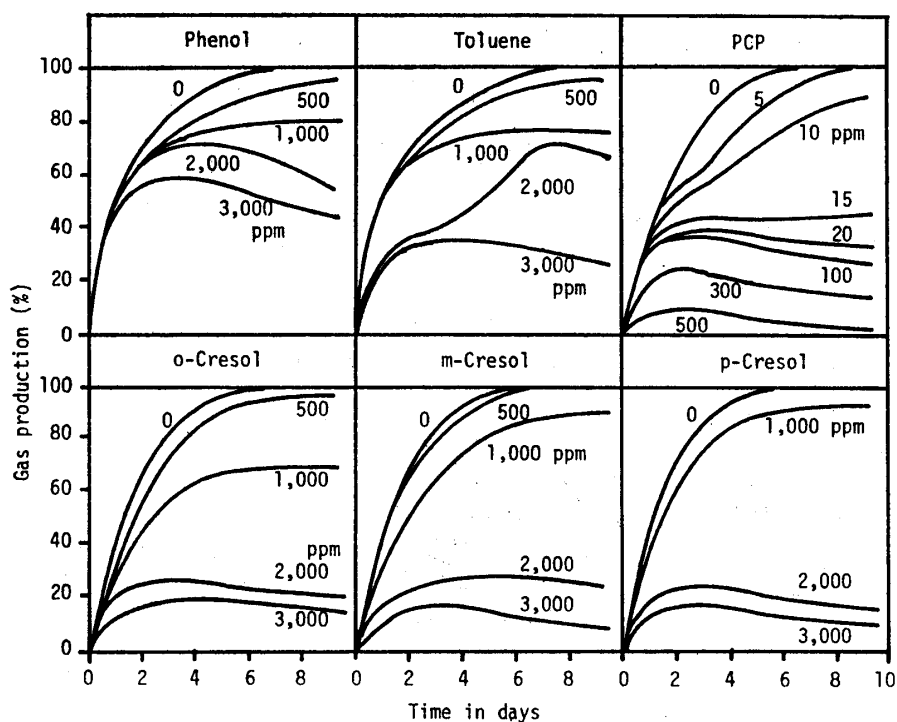


Fig. 9. Effect of phenol compounds on gas production in thermophilic digestion.

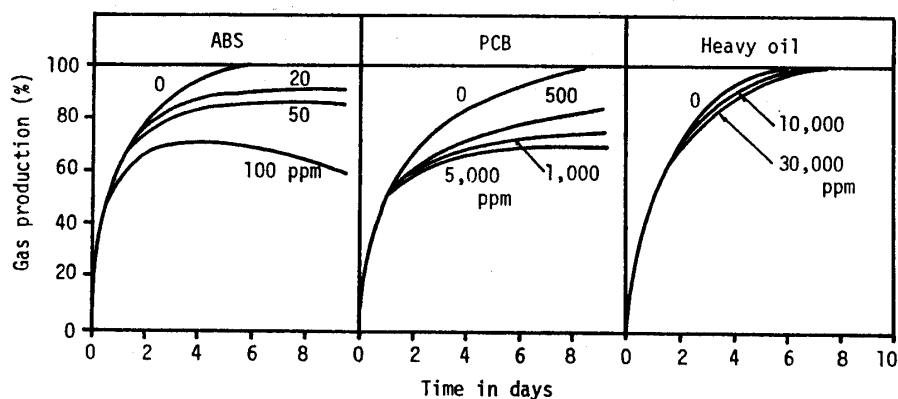


Fig. 10. Effect of hydrocarbon compounds on gas production in thermophilic digestion.

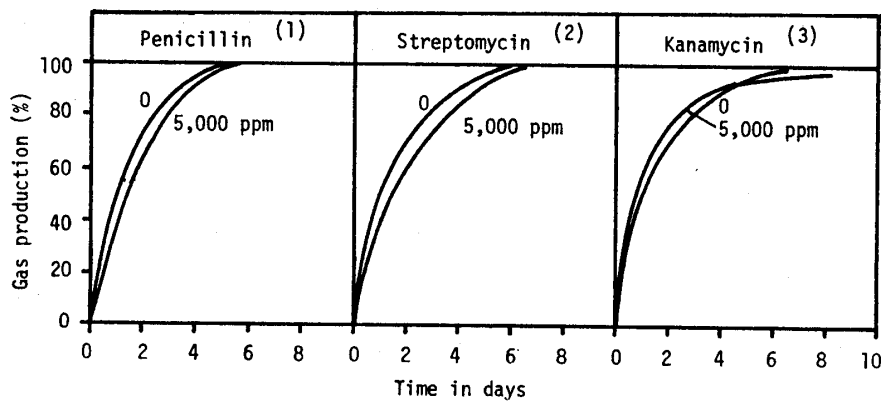


Fig. 11. Effect of antibiotics on gas production in thermophilic digestion.

- (1) pyrimidin penicillin G (Cryst.): $C_{22}H_{27}O_5N_5S$ (200,000 U/g)
 (2) dihydrostreptomycin sulphate : $(C_{21}H_{41}O_{12}N_7)_2 \cdot 3H_2SO_4$ (1g potency/1.32g)
 (3) kanamycin sulphate : $C_{18}H_{36}N_4O_{11} \cdot H_2SO_4 \cdot H_2O$ (1g potency/1.38g)

Table 4. Permissible concentrations of organic compounds in anaerobic digestion.

Compound	Permissible conc. (ppm)
Phenol	1,000
Toluene	500
PCP	10
<i>o</i> -Cresol	500
<i>m</i> -Cresol	1,000
<i>p</i> -Cresol	1,000
ABS	50
PCB	500
Heavy oil	30,000
Penicillin	5,000
Streptomycin	5,000
Kanamycin	5,000

ABS, PCB (三塩化物) および重油 (C 重油) の影響を Fig. 10 に示す. PCB および重油は水に不溶性のためマイクロピペットによって発酵フラスコに添加し, 一日数回フラスコを振盪, 攪拌して測定を行った. PCB は余り大きな阻害を示さないが, 500 ppm 以上の濃度になるとガス生成は対照の80%以下になる.

重油は 30,000 ppm の高濃度までほとんど影響なく, またその分解によるガス生成も全く認められなかった.

抗生物質 ピリミジンペニシリン G (20万単価/g), 硫酸ジヒドロストレプトマイシン (1g 力価/1.32g) および硫酸カナマイシン (1g 力価/1.38g) の3種について検討した.

実験は製剤濃度として 0, 1,000, 3,000 および 5,000 ppm の濃度に添加して測定を行ったが, Fig. 11 に示すようにいずれも 5,000 ppm の濃度までガス生成に対する阻害は認められなかった.

最後に, 炭化水素系化合物および抗生物質のメタン発酵に対する許容限界濃度をまとめて Table 4 に示す.

要 約

種々の重金属化合物, 無機塩類, 炭化水素系化合物および抗生物質についてメタン発酵に及ぼす影響を検討し, またそれらの許容限界濃度を明らかにした.

1) 各種銅化合物のメタン発酵に対する許容限界濃度は, Cu 量として約 200~400 ppm であった. クローム化合物は銅化合物に比較すれば阻害程度は一般に

軽度であるが, 3 価クロームに比し 6 価クロームの阻害が大であった. ニッケル化合物は, Ni 量として 40~120 ppm が許容範囲であった.

2) 以上の金属化合物について金属量レベルが比較すれば, 硫化物が最も阻害が少なく, これについて水酸化物, 酸化物等の不溶形態のものが阻害が少ない. 一方, NO₃, CN 基を有するものは低濃度でも阻害が著しい.

3) メタン発酵は好気性処理法に比しはるかに重金属類の阻害をうけにくい傾向にあるが, これは重金属が発酵液中に生成する硫化水素と結合して不溶性塩になることによる. 従ってその許容濃度は発酵液中の可溶性硫化物濃度によって影響をうける.

4) Na 塩のうち NaCl は 30,000 ppm まで許容できるが, NO₂, NO₃ 基を有するものは阻害が著しく, NaNO₂ および NaNO₃ の許容限界濃度は 100 ppm であった. また NH₄Cl は NaCl に比しわずかに阻害が大きい. KCN は 100 ppm まで許容できるが, 活性スラッジ法に対する阻害と比較すればメタン発酵の場合かなり強い耐性を示した.

5) フェノール, トルエン, クレゾールは 500 ppm 以下ではほとんど阻害は認められず, 2,000 ppm 以上になって阻害が著しくなる, ペンタクロルフェノールは 15 ppm 程度の低濃度でもきわめて阻害が強い. ABS は 50 ppm 以上, PCB は 500 ppm 以上で阻害が認められる. 重油は 30,000 ppm の濃度でも影響はなく, またその分解によるガス生成も認められない.

6) 抗生物質のピリミジンペニシリン G, 硫酸ジヒドロストレプトマイシンおよび硫酸カナマイシンでは 5,000 ppm の濃度まで阻害は認められなかった.

文 献

- 1) 園田, 清古: 醸工, **46**, 796 (1968).
- 2) McDermott, G. N., Moore, W. A., Post, M. A., Ettinger, M. B.: *WPCF*, **35**, 655 (1963).
- 3) McDermott, G. N., Post, M. A., Jackson, B. N., Ettinger, M. B.: *WPCF*, **37**, 163 (1965).
- 4) 田中, 園田, 清古, 小野: 醸協, **19**, 510 (1962).
- 5) Yamada, M., Tonomura, K.: *J. Ferment. Technol.*, **50**, 901 (1972).
- 6) 福岡, 小野, 江藤: 醸工, **43**, 191 (1965).

(昭51. 7.16受付)