

JERZY CHMIELOWSKI

# KINETYKA I MECHANIZM FERMENTACJI METANOWEJ

POLITECHNIKA ŚLĄSKA ZESZYT NAUKOWY Nr 86 – GLIWICE 1963

## SPIS TREŚCI

	atu
DR7FDMOWA	str.
WSTED	0 E
ΟΖΕΘΟ ΤΕΟΡΕΤΥΟΖΝΑ	0
Bostlanowww.mostland.gubatan	9
cji organicznych	9
Kinetyka wytwarzania gazu	
zbiornikowej z metum za-	
szczepieniem	13
Kinetyka wytwarzaniu gazu	
fermentacyjnego w próbie	
zbiornikowej z wystarczają-	10
Kinotulo unteresti result	10
w fermentacij ciaglej z du-	
żym zaszczepieniem i mie-	
szaniem	18
Kinetyka reakcji enzyma-	
tycznych	21
CZĘSC DOSWIADCZALNA .	28
METODYKA BADAN	28
Laboratoryjne komory fer-	90
Applizy kontrolno	40
Domiary wytwarzania dozu	29
Interpretacia kinetyki meta-	49
nogenezy	32
Chromatograficzna analiza	
gazu	35
Chromatografia bibułowa	
kwasów lotnych	41
Oznaczenie filtracyjności	49
DRZEDIEC DOŚWIADCZEŃ	49
I WYNIKI BADAŃ	44
Fermentacia metanowa osa-	
dów organicznych metodą	
ciągłą	44
Substraty i opis doświad-	4.4
Czenia	44
nicznych	•48
Wytwarzanie gazu fermen-	
tacyjnego	49
Skład gazu fermentacyj-	
nego	52
Filtracyjność osadów .	52
Fermentacja metanowa osa-	
kach periodycznych	54
Substraty i opis doświad-	
czenia	54

	str.
Rozkład osadów organicz- nych i produkty pośrednie fermentacji metanowej	55
Wytwarzanie gazu fermen-	50
Fermentacja metanowa kwa- su masłowego i kapronowe-	90
go w warunkach periodycz- nych	60
Substraty i opis doświad-	60
Rozkład beztlenowy kwasu	00
masłowego i kapronowego Wytwarzanie gazu fermen-	61
tacyjnego Kinetyka fermentacji meta-	64
nowej sześciu niższych kwa- sów tłuszczowych	65
Substraty i przebieg do- świadczenia	65
Wytwarzanie gazu fermen- tacyjnego	71
Biochemiczna redukcja dwu- tlenku węgla do metanu w obecności wodoru	74
Substraty i przebieg do- świadcz <b>e</b> nia	74
Wpływ objętości fermen- tującej masy na przebieg przemiany dwutlenku wę- gla w metan	79
Wpływ wielkości ładunku dwutlenku węgla na prze-	
bieg przemiany w metan Kinetyka biochemicznej	80
redukcji dwutlenku wę- gla do metanu	84
OMÓWIENIE WYNIKÓW .	86
Reakcje kinetyczne pierw- szego i zerowego rzędu w fermentacji metanowej .	86
Mechanizm i produkty fer- mentacji metanowej	94
Fermentacja metanowa me- todą ciągłą z wysokim ob- ciażeniem	102
Test na przeciążenie komo- ry fermentacyjnej	106
STRESZCZENIE	108
LITERATURA	112

# POLITECHNIKA ŚLĄSKA

# ZESZYTY NAUKOWE

# Nr 86

JERZY CHMIELOWSKI

# KINETYKA I MECHANIZM Fermentacji metanowej

# PRACA HABILITACYJNA Nr 27

P.3345 63

Data otwarcia przewodu habilitacyjnego 31. V. 1963 r.

GLIWICE 1963

#### REDAKTOR NACZELNY ZESZYTÓW NAUKOWYCH POLITECHNIKI ŚLĄSKIEJ

Fryderyk Staub

REDAKTOR DZIAŁU

Iwo Pollo

SEKRETARZ REDAKCJI

Tadeusz Matula

1

#### ADRES REDAKCJI

Katedra Technologii Wielkiego Przemysłu Nieorganicznego Gliwice, ul. M. Strzody 19 tel. 51-54

Dział Nauki — Sekcja Wydawnictw Naukowych — Politechniki Śląskiej Gliwice, ul. Konarskiego 23

Nakład 200+45	Objętość ark.	wyd. 6	ark. druk. 7,5
Oddano do składania 12. VI. 1963 r.	Podpisano d	lo druku	15. VII. 1963 r.
Druk ukończono	25. VII. 1963 r.		
Zam 873 15. VI. 1963 r.	D-22		Cena zł 7,50

Zakład Graficzny Politechniki Śląskiej w Gliwicach

Zasadnicze doświadczenia i studia, które dały podstawę niniejszej pracy przeprowadziłem w latach 1957-1959 w King's College Uniwersytetu Durham w Newcastle.

Jestem głęboko wdzięczny Profesorowi P.C.G. ISAACowi za stworzenie doskonałych warunków pracy w Laboratory of Public Health Engineering, żywe zainteresowanie badaniami oraz za cenne dyskusje.

Moje szczere podziękowanie należy się The British Council i King's College za udzielenie stypendium umożliwiającego prowadzenie tych doświadczeń.

Dziękuję Ministerstwu Szkolnictwa Wyższego i Władzom Politechniki Śląskiej za wyrażenie zgody na mój wyjazd do Wielkiej Brytanii jak również za udzielenie stypendium naukowego w latach 1961-62 na kontynuowanie badań na Politechnice Śląskiej. Część tych doświadczeń mogłem przeprowadzić dzięki dotacjom z Polskiej Akademii Nauk.

J.C.

3

W ciągu ostatnich lat przeprowadzono intensywne studia biochemicznej degradacji substancji organicznych. Ułatwiły one ustalenie podstawowych prawidłowości kinetyki rozkładu substancji organicznych zależnych od rozwoju populacji drobnoustrojów. Mikroorganizmy zużywają substancje organiczne dla uzyskania energii i materiałów umożliwiających syntezę nowego materiału komórkowego. Wskutek takiego metabolizmu związki organiczne ulegają częściowej lub całkowitej mineralizacji oraz przemianie w masę biologiczną. W tych procesach degradacji czynne są mieszane populacje biologiczne. Warunki środowiska nadają tlenowy lub beztlenowy charakter przebiegającym procesom i powodują dominację jakiejś grupy organizmów.

Znajomość zasad tlenowego rozkładu substancji organicznych przez populacje mieszane okazała się szczególnie przydatna dla poprawnego projektowania procesów i urządzeń biologicznego oczyszczania [21, 22, 23, 57]. Znajomość ta wpłynęła na bardziej wydajną eksploatację istniejących urządzeń lub na opracowanie modyfikacji zmierzających do zintensyfikowania metod technologicznych. Natomiast beztlenowy rozkład substancji organicznych, zwany niekiedy fermentacją metanową, pomimo pewnych ulepszeń ruchowych ostatnich lat [1, 17, 28, 50, 55, 56, 73] nastręcza wiele problemów teoretycznych i technologicznych.

Niektóre zadania biochemicznej degradacji substancji organicznych dadzą się łatwiej przeprowadzić w warunkach beztlenowych; stąd rosnące zainteresowanie tymi metodami. Koszty budowy komór i urządzeń do fermentacji metanowej są jednak znacznie wyższe od innych elementów biologicznego oczyszczania. Względy ekonomiczne wymagają więc racjonalnego projektowania i maksymalnego wykorzystania czynnych przestrzeni tych urządzeń. Zagadnienie to łączy się ze stosowaniem wysoko obciążonych komór fermentacyjnych i określeniem należytego czasu przebywania substratów w takim reaktorze przepływowym. Czas przebywania, który jest zasadniczym parametrem ruchowym systemu, można wyznaczyć doświadczalnie dla określo-

WSTĘP

nych warunków fermentacji, Jednak w ten sposób trudno ściśle określić moment pojawienia się "przeciążenia" komory fermentacyjnej i zaburzeń procesu wynikających z tego przeciążenia. W tym celu do opisu zjawiska należy zastosować niektóre teoretyczne konsekwencje kinetyki i mechanizmu beztlenowego rozkładu substancji organicznych.

Fermentacja metanowa z mikrobiologicznego punktu widzenia jest procesem złożonym. Przebiega w dwu wyraźnie zaznaczających się fazach wywoływanych przez dwie różne grupy drobnoustrojów. Bakterie saprofityczne powodują degradację złożonych substancji organicznych do niższych kwasów tłuszczowych i związków pokrewnych. W drugiej fazie procesu bakterie metanowe zużywają te produkty fazy upłynnienia i hydrolizy w metanogenezie. W warunkach ruchu ciągłego komory fermentacyjnej lub po dostatecznie wielkim zaszczepieniu w fermentacji periodycznej, obie te fazy przebiegają równocześnie w ustalonej równowadze.

Miernikiem przebiegu rozkładu beztlenowego może być ubytek masy substancji organicznych w jednostce czasu. Najdogodniej jest jednak obserwować proces przez pomiar ilości wytwarzanego gazu fermentacyjnego. Pomimo dwufazowości, w ustalonych warunkach fermentacji metanowej prowadzonej metodą zbiornikową (batch digestion), proces da się opisać z wystarczającym przybliżeniem przez równanie kinetyczne pierwszego rzędu [24]. Szybkość rozkładu beztlenowego jest funkcją chwilowego stężenia substancji organicznych. Równanie takie ułatwia projektowanie komór fermentacyjnych o ruchu ciągłym. Wtedy czas przepływu substratów przez reaktorczas przebywania - powinien zapewnić wymagany stopień przemiany biochemicznej.

Równanie opisujące przebieg wytwarzania gazu zasadniczo odpowiada reakcji monomolekularnej. Użycie tego równania nie musi być równoznaczne z przyjęciem poglądu o monomolekularnej kinetyce procesu fermentacji. Jednocząsteczkowy charakter kinetyki rozkładu beztlenowego można uważać za dogodny, wyidealizowany sposób reprezentowania wyników doświadczeń. Można jednak również przyjąć założenie, że fermentacja metanowa podlega podobnym prawidłowościom jakie obserwuje się w przebiegu innych biochemicznych zjawisk enzymatycznych [5, 23, 62, 67]. W takim przypadku proces ten powinien podporządkować się prostym równaniom kinetycznym.

W teoretycznych rozważaniach kinetyki procesów biochamicznych często rozpatruje się proces enzymatyczny jako łańcuch następujących po sobie reakcji. Szybkość procesu enzymatycznego zależy od szybkości reakcji najpowolniejszej, która wskutek tego kontroluje system. Jeżeli jest to reakcja monomolekularna, system taki podporządkuje się równaniu kinetycznemu pierwszego rzędu.

Szybkość reakcji enzymatycznych wskutek "efektu nasycenia" ograniczonej ilości enzymu wykazuje szczególną zależność od stężenia substratów. W obecności dużych stężeń substratu szybkość reakcji przybiera wartość stałą, niezależną od steżenia i proces podlega równaniu kinetycznemu rzedu zerowego W miarę obniżania się stężenia, reakcja zaczyna przebiegać zgodnie z kinetyką reakcji pierwszego rzędu. Wskutek tego końcowe stadia jakiejkolwiek reakcji enzymatycznej zdają się przebiegać zgodnie z reakcją monomolekularną. Złożony aparat matematyczny, stosowany w badaniu kinetyki łańcucha reakcji enzymatycznych, wymaga przyjęcia wyraźnego przejścia pomiędzy reakcją zerowego i pierwszego rzędu. Z teorii szybkości reakcji wynika, że oddzielna reakcja nie może podlegać prawom kinetyki zerowego rzędu [5, 67]. Dlatego jeżeli obserwuje się zjawiska, które podporzadkowuja się tym prawom - wskazuje to na występowanie systemu reakcji.

Przed kilku laty opisano występowanie, w pewnym przedziale stężeń substratu, stałej szybkości wytwarzania gazu. Efekt pojawiał się w szczególnych warunkach periodycznie prowadzonej fermentacji metanowej [12, 13]. Zjawisko to, jak się wydaje, można łączyć właśnie z wystąpieniem procesów przebiegających zgodnie z kinetyką zerowego rzędu. Obecnie również niektóre procesy spotykane w tlenowym biologicznym oczyszczaniu określa się jako reakcje zerowego rzędu [23, 90, 91].

We wspomnianych badaniach fermentacji metanowej zaobserwowano, że zwiększone obciążenie komór powodowało w ruchu ciągłym zadowalający rozkład substancji organicznych tylko do pewnego obciążenia krytycznego. Powyżej tej wielkości pojawiały sie zaburzenia procesu. Jeżeli po pewnym okresie małego "przeciążania" komory wstrzymało się zasilanie reaktora, przez pewien czas szybkość wytwarzania gazu utrzymywała sie na stałym poziomie, po czym malała w sposób zgodny z krzywą wygaszania. Na tej podstawie zaproponowano "test przeciążenia" komory fermentacyjnej. Można spodziewać się, że w Komorach fermentacyjnych pojawia się wskutek przeciażenia, przekroczenie stosunku ilości substratów do enzymatycznie czynnej masy drobnoustrojów. Wtedy układ znajduje sie w przedziale stężeń substratów, w którym nie spełnia równania piery zego rzedu. Szybkość rozkładu substancji organicznych przestaje być zależna od stężenia substratów. W ruchu ciągłym o określonym czasie przebywania w reaktorze traci się kontrolę nad stopniem przereagowania substratów.

Wydawało się ciekawe wytłumaczenie tego zjawiska z kinetycznego punktu widzenia. Procesy zachodzące w wysoko obciążonych komorach fermentacyjnych należałoby uważać za określone przez warunki bliskie tym, które definiuje punkt przecięcia się dwu funkcji kinetycznych pierwszego i zerowego rzędu. Przekroczenie krytycznego obciążenia powoduje przejście układu z zakresu kontrolowanego przez reakcję monomolekularną do warunków przeciążenia, podporządkowanych kinetycznej reakcji zerowego rzędu.

Zadaniem niniejszej pracy było doświadczalne stwierdzenie poprawności tej tezy. W tym celu należało wykazać w kinetyce fermentacji metanowej istnienie punktu załamania krzywej, określonego przez przecięcie się dwu funkcji kinetycznych. Wydawało się, że będzie można wywołać to zjawisko w różny sposób.

Przeciążenie komory można było spowodować w sposób powolny w ciągłym ruchu komory fermentacyjnej. Zaprzestanie zasilania stwarzało warunki fermentacji periodycznej, dla której można było bezpośrednio wyznaczyć przebieg wytwarzania gazu w czasie fermentacji, W takiej próbie zbiornikowej czas stawał się zmienną niezależną. W warunkach fermentacji periodycznej przeciążenie powinno pojawiać się wskutek wprowadzenia do reaktora dużego ładunku substratów fermentacji przy równoczesnym, wystarczającym zaszczepieniu układu przez populacje bakterii czynnych w fermentacji metanowej.

Wydawała się interesująca obserwacja przeciążenia komór przez substraty o różnym charakterze biochemicznym. W tym celu zastosowano złożone substancje organiczne podlegające obu fazom fermentacji metanowej lub niższe kwasy tłuszczowe, które występują jako półprodukty w tej fermentacji. Dwutlenek węgla w obecności wolnego wodoru był innym, szczególnym substratem metanogenezy niektórych gatunków bakterii metanowych [14].

W czasie tej pracy należało również rozwiązać niektóre problemy metodyczne, które umożliwiły przeprowadzenie badań nad kinetyką fermentacji metanowej. Dotyczyły one konstrukcji laboratoryjnych komór fermentacyjnych umożliwiających manometryczny pomiar wytwarzania gazu. Zastosowanie chromatograficznej analizy gazowej oraz chromatograficznego badania kwasów lotnych jako półproduktów beztlenowego rozkładu złożonych substancji organicznych, ułatwiało bardziej wnikliwy pogląd na mechanizm fermentacji metanowej.

#### CZĘŚC TEORETYCZNA

#### Beztlenowy rozkład substancji organicznych

Ogólnie, beztlenowy rozkład substancji organicznych polega na upłynnieniu i hydrolizie związków nierozpuszczalnych oraz na zgazowaniu powstałych produktów pośrednich. Towarzyszy temu częściowe lub całkowite zmineralizowanie i humifikacja substancji organicznych. Upłynnienie i gazyfikacja stanowią więc dwie podstawowe fazy procesu beztlenowego rozkładu powodowanego przez mieszane populacje bakterii saprofitycznych i metanowych [35, 45, 48]. Taki złożony metabolizm schematycznie ilustruje rys.1.[60].

Z inżynierskiego punktu widzenia można upłynnienie uważać za wstępną fazę wytwarzania materiałów dla ostatecznego rozkładu i przemiany w gaz fermentacyjny [39]. Fazę upłynnienia można pominąć przez wprowadzenie do układu rozpuszczalnych substancji, które mogłyby wprost przenikać do komórek bakteryjnych i ulegać wewnątrzkomórkowemu zgazowaniu do metanu i dwutlenku węgla.

Stopień rozkładu różnych substancji organicznych zależy w dużym stopniu od ich charakteru chemicznego. Prawie wszystkie związki organiczne z wyjątkiem weglowodorów ulegają przemianie w gaz fermentacyjny. Substancje rozpuszczalne ulegają daleko posuniętej destrukcji. Materiały drzewiaste dają okoto 40% nierozpuszczalnych substancji humusopodobnych [7, 35]. W czasie prawidłowo uformowanego rozkładu beztlenowego proces upłynnienia i zgazowania odbywa sie równocześnie. Należyty przebieg rozkładu zależy od właściwej synchronizacji obu tych faz. W warunkach dobrego zaszczepienia przez mieszane populacje bakterii obie fazy biegną z równą szybkością, bez nagromadzenia się produktów pośrednich. W pewnych warunkach upłynnienie może powodować gromadzenie się produktów pośrednich szyboiej, niż mogą one ulec dalszemu rozkładowi przez zgazowanie. Te półprodukty bedą wywozywały zakwaszenie środowiska fermentacyjnego i hamowanie fazy zgazowania. Może to prowadzić do nadmiernej akumulacji kwasów organicznych. produktów pośrednich, oraz do zaniku fermentacji metanowej.







Rys. 2. Schemat obrotowych komór laboratoryjnych do fermentacji ciągłej

Zjawisko nagromadzenia się półproduktów oraz hamowanie wytwarzania gazu wydaje się wskazywać, że zgazowanie jest powolniejszą fazą procesu i bardziej podatną na wpływy środowiska [35]. Z drugiej jednak strony są dowoły, że fermentacja metanowa rozpuszczalnych związków organicznych, szczególnie niższych kwasów tłuszczowych, przebiega szybciej od fermentacji osadów organicznych[35]. Mogłoby to znaczyć, że faza upłynnienia jest czynnikiem kontrolującym szybkość fermentacji.

W badaniach beztlenowego rozkładu dotychczas posługiwano się dwoma wskaźnikami, które określają przebieg tego dwufazowego zjawiska w sposób ogólny. Jest to wytwarzanie gazu fermentacyjnego i redukcja substancji lotnych. Okazało się, że pomiar wytwarzania gazu jest lepszym wskaźnikiem procesu [24] i służy do badania kinetyki fermentacji metanowej.

Teoretyczna podstawa zastosowania równań reakcji pierwszego rzędu do opisu kinetyki biochemicznego utleniania wywodzi się z faktu, że wiele prostych dyfuzji i procesów jednostkowych można podporządkować reakcjom monomolekularnym. Pracom FAIRa i MOOREA [24] zawdzięcza się, że stwierdzenie to ma charakter raczej doświadczalny niż teoretyczny. Nie jest to jednak zasadnicze, jeżeli reakcja przebiega w przybliżeniu zgodnie z zależnością monomolekularną. Według sugestii różnych autorów [24, 53] matematyczne sformułowanie beztlenowej degradacji substancji organicznych opiera się również na kinetyce wzrostu mikrobiologicznego [63], jaki występuje w tym systemie bioksydacyjnym.

Szybkość wzrostu bakterii metanowych można śledzić przez pomiar ilości wytwarzanego gazu. Można przyjąć założenie, że jedna komórka bakteryjna wytwarza na jednostkę czasu stałą ilość gazu g. Sumaryczna ilość gazu G jest przeto proporcjonalna do ilości komórek N, w danej chwili t:

$$d G = g N dt$$

Szybkość przyrostu komórek jest proporcjonalna w każdym momencie do ich liczby N.

$$\frac{dN}{dt} = k N_t$$
 (2)

11

(1)

w którym wielkość k oznacza współczynnik proporcjonalności. Określa on w tym wypadku tempo przyrostu, czyli tę część komórek, które ulegają podziałowi w jednostce czasu. Rozwiązanie równania daje:

$$N_t = N_o e^{kt}$$

w którym N oznacza początkową, zaszczepioną ilość bakterii. Jest to typowe równanie pierwszego rzędu określające fazę logarytmicznego wzrostu populacji. Przez podstawienie znaczenia N w równaniu 1 otrzymuje się teoretyczne związanie wytwarzania gazu ze wzrostem populacji bakterii metanowych:

$$G = g N_o e^{kt}$$
 (4)

(3)

Odczuwa sie brak ścisłych danych, które określają szybkość wzrostu bakterii metanowych. W pracy HEUKELEKIANa i HEINEMANNa [33, 34] podano informacje o czasie inkubacji tych bakterii. Czas ten wynosi 1 do 10 tygodni, zależnie od wielkości zaszczepienia i warunków hodowli. Dla porównania warto przypomnieć, że bardziej rozpowszechnione drobnoustroje - Bacterium coli, wymagają 24 do 48 godzin dla pełnego wzrostu z zaszczepienia przez kilka komórek bakteryjnych. Można więc stwierdzić, że wzrost bakterii metanowych jest powolny. Wpływa to na charakter procesów, w których uczestalczą te bakterie. W warunkach spontanicznego rozkładu beztlenowego, bez wyraźnego zaszczepienia, obserwuje się występowanie dwu oddzielnie zaznaczających mię faz fermentacji kwasowej i metanowej. Wtedy w pierwszy stadium dominuje nagromadzenie się produktów pośrednich o charakterze kwasów przy minimalnej szybkości wytwarzania gazu. Zgazowanie półproduktów następuje w drugiej fazie fermentacji. Zaszczepienie środowiska fermentacyjnego przez mieszane populacie powoduje ustalenie się równowagi między tymi fazami. Mała \_\_ybkość wzrostu bakterii metanowych wyjaśnia potrzebę użycia znacznych ilości fermentującego medium w celu wszczęcia należycie zrównoważonego procesu.

Z punktu widzenia kinetyki fermentacji metanowej należało rozpatrzeć przebiegi periodycznej fermentacji spowodowanej przez małe oraz dostatecznie duże zaszczepienie. Należało również przeprowadzić analizę kinetyki fermentacji w warunkach metody ciągłej, spotykanej w praktyce technologicznej.

> Kinetyka wytwarzania gazu fermentacyjnego w próbie zbiornikowej z małym zaszczepieniem

Jeżeli ilość zaszczepiającego materiału jest mała w porównaniu z objętością środowiska fermentacyjnego- krzywa ogólnego wytwarzania gazu w czasie fermentacji ma kształt litery S. Oznacza to, że w początkowym przebiegu procesu ilość gazu wytwarzana w jednostce czasu stale zwicksza sic. Trwa to do chwili wywiązania się w przybliżeniu połowy całkowitej ilości gazu. Po osiągnięciu tego punktu przegięcia na krżywej gazowania, szybkość wytwarzania gazu stale zmniejsza się i powoli zanika, a ogólna ilość wytwarzanego gazu fermentacyjnego zbliża się do jakiejś granicznej wielkości G. W doświadczeniach można te graniczną wielkość G zastapić przez praktycznie osiagalna maksymalna ilość gazu. Opracowano kilka równań umożliwiających opisanie tak przebiegającej fermentacji metanowej z wyraźna opóźniająca faza lag. Jedno z takich równań podanych przez FAIRa i MOORa [24] odnosi się do reakcji monomolekularnej, przyspieszanej przez katalityczne działanie produktów reakcji.

Zgodnie z zasadami chemii fizycznej szybkość reakcji jest funkcją stężenia reagujących substratów. W wypadku reagowania dwu lub więcej substancji, szybkość reakcji określają względne stężenia każdego z tych związków. Jeżeli jednak wszystkie substraty, z wyjątkiem jednej substancji będą w nadmiarze, szybkość reakcji będzie kontrolowana przez zmiany stężenia tej właśnie jednej substancji. Reakcja będzie miała charakter monomolekularny. Rozkład beztlenowy jest zjawiskiem złożonym. Ogólnie jednak szybkość tej fermentacji jest funkcją G, stężenia substancji organicznych ulegających rozkładowi w chwili t. Uzasadnione wydaje się zakożenie, że fermentację metanową można opisać przez reakcję pierwszego rzędu. Równanie to ma postać różniczkową:

$$\frac{dy}{dt} = k G_t = k(G - y)$$
(5)

13

w którym:

- G ogólna ilość gazu praktycznie osiągalna w czasie fermentacji,
- G<sub>t</sub> ilość gazu, która utworzy się z substancji organicznych od chwili t do zaniku fermentacji,
- y ilość gazu wytworzona w czasie t,
- t czas fermentacji,
- k stała szybkość reakcji.

Równanie to stwierdza, że arytmetycznym zmianom czasu odpowiada logarytmiczny spadek chwilowego stężenia substancji organicznych. Jest zrozumiałe, że to równanie nie opisuje krzywej gazowania w kształcie litery S, doświadczalnie stwierdzonej w przypadku nikłego zaszczepienia środowiska fermentacyjnego. W takim procesie szybkość gazowania nie może być zależna od chwilowego stężenia substratów. FAIR i MOORE [24] przyjmuje, że w procesie enzymatycznym, jakim jest fermentacja metanowa, przejawia się autokatalityczny wpływ produktów rozkładu beztlenowego na całkowity przebieg wytwarzania gazu.

Równanie reakcji autokatalitycznej, określające wytwarzanie gazu z fazą lag, spowodowaną przez nikłe zaszczepienie, ma postać różniczkową:

 $\frac{dy}{dt} = k_1 (G - y) y + k_2 (G - y)$  (6)

Równanie to opisuje krzywą gazowania w kształcie litery S, która rozpoczyna się w punkcie y = 0, gdy  $G_t = G$ , t = 0. W równaniu tym występują dwie stałe szybkości reakcji k i k. Proces gazowania rozpoczyna się z małą szybkością. W miarę przebiegu fermentacji szybkość wzrasta wskutek katalitycznego wpływu produktów reakcji. W tym samym czasie jednakże zużywają się substancje organiczne układu. Szybkość wytwarzania gazu po dojściu do maksimum w punkcie przegięcia krzywej, opada i ostatecznie zdaża do zera. Ogólna ilość gazu zbliża się wtedy do granicznej wartości G.

Alternatywne matematyczne ujęcie krzywej gazowania podał FAIR i MOORE [24]. Opiera się ono na oczywistej analogii przebiegu wytwarzania gazu i wzrostu populacji drobnoustrojowej w środowisku zawierającym określoną ilość materiału pożywkowego. Opis ten składa się z kombinacji dwu funkcji nieciągłych, które odpowiadają dwu gałęziom krzywej gazowania o kształcie litery S. Oba równania należy uważać za nieciągłe w punkcie przegięcia t =  $t_{\pm}$ , w którym wartość wytwarzania gazu y osiąga połowę granicznej wielkości G. Dla wygody opisu można mówić o pierwszym i drugim stadium wytwarzania gazu. Wartość tego przybliżenia podnosi fakt, że szybkość wzrostu populacji jest rzeczywiście funkcją nieciągłą [22].

W pierwszym stadium krzywa gazowania wskazuje wzrost szybkości wytwarzania gazu od początku przebiegu do punktu przegięcia. W obecności nadmiaru substancji pożywkowych szybkość wzrostu populacji ogranicza tylko minimalny czas generacji organizmów w danej temperaturze. Wskutek tego populacja bakteryjna i wytwarzanie gazu podlega prawu nieorganicznego wzrostu zgodnie z równaniem wykładniczym:

$$\frac{dy}{dt} = k_1 y \quad dla \quad t \leq t_t$$
(7)

Koniec pierwszego stadium gazowania nastąpi w punkcie przegięcia t<sub>t</sub>, gdy ilość substancji pożywkowych układu jest właśnie wystarczająca do spełnienia wymagań istniejącej populacji. Po przekroczeniu tego krytycznego stężenia substratu, populacja musi zamierać. Od tej chwili szybkość wzrostu jest kontrolowana i proporcjonalna do ograniczonego stężenia substratów. Uwidacznia się to w progresywnie zmniejszającej się szybkości wytwarzania gazu. Szybkość fermentacji staje się proporcjonalna do chwilowego stężenia substratów. Osiąga ona wartość zerową, gdy ogólna ilość gazu zbliża się do granicznej wielkości G. Naturalne wydaje się założenie, że drugie stadium gazowania przebiega jako proces monomolekularny, w którym następuje wyczerpywanie substratu reakcji zgodnie z równaniem 5:

 $\frac{dy}{dt} = k_2 (G - y) \quad dla \quad t \ge t_t$ (8)

W pracach FAIRa i MOOREA [24] obserwuje się zgodność pomiędzy punktami doświadczalnymi i obliczonymi z autokatalitycznego równania 6 oraz dwustopniowym układem równania 7 i 8. Zgodność ta jest lepsza dla równania dwustopniowego, które szczególnie nadaje się do interpretacji obserwacji inżynierskich. Należy jednak pamiętać, że wyrażenie dwustopniowe powstaje z kombinacji dwu funkcji nieciągłych o czterech stałych (k., k., t., G). Równanie autokatalityczne jest prostsze i zawiera trzy stałe (k., k., i G).

Drugie stadium równania dwustopniówego zasadniczo wskazuje na jednocząsteczkowy charakter procesu fermentacji. Jednak usiłowania zmierzające do wytłumaczenia tego zjawiska na podstawie hipotetycznych reakcji, które mogą przebiegać w środowisku fermentacyjnym, są wyłącznie spekulatywne [24].

Sformułowanie głównej fazy wytwarzania gazu można niekiedy oprzeć na modyfikacji kinetycznego równania pierwszego rzędu, którą podaje THOMAS [87]. Można wyłączyć fazę lag przez odrzucenie dolnej części esowatej krzywej i dostosowanie procesu do przebiegu górnej gałęzi krzywej gazowania. Wtedy krzywa podporządkowana równaniu pierwszego rzędu rozpocznie się nieco później od czasu t = 0. Odpowiada to ekstrapolacji początku krzywej od końcowego punktu fazy lag. Odrzucona faza lag trwa przez czas t od początku układu do punktu ekstrapolacji. Równanie określające fermentację w sposób przybliżony ma postać całkową:

$$y = G (1 - e^{-k(t-t_0)})$$
 (9)

w którym t oznacza wartość t w końcu fazy lag, gdy zgodnie z założeniem y = 0.

Kinetyka wytwarzania gazu fermentacyjnego w próbie zbiornikowej z wystarczająco dużym zaszczepieniem

Szybkość wytwarzania gazu w periodycznym procesie rozkładu beztlenowego została sformułowana w oparciu o równanie autokatalityczne [24]. W takim procesie, gdy ilość materiału zaszczepiającego jest bardzo duża w porównaniu z objętością substratów, krzywa wytwarzania gazu nie wykazuje fazy lag i punktu przegięcia. Właściwa fermentacja rozpoczyna się natychmiast po zaszczepieniu. W matematycznej interpretacji tego zjawiska można brać pod uwagę późniejsze stadium reakcji autokatalitycznej [40]. Równanie różniczkowe szybkości takiej reakcji pierwszego rzędu przybiera postać równania 5:

$$\frac{dy}{dt} = k (G - y)$$
(5)

W tym równaniu kinetycznym stężenie substancji organicznych w dowolnej chwili t umownie wyrażono przy pomocy różnicy granicznej ilości wytworzonego gazu G i ilości gazu y wytworzonego w czasie t. Dla wyznaczenia tej ilości (G - y) w danej chwili t należy zcałkować to równanie. W tym celu należy rozdzielić zmienne:

$$k dt = \frac{dy}{(G - y)}$$
(10)

wtedy po scałkowaniu wyrażenia:

$$k \int dt = \int \frac{dy}{(G - y)}$$
(11)

otrzymuje się całkę nieoznaczoną

$$kt = -ln (G - y) + C$$
 (12)

W równaniu tym C jest dowolną stałą całkowania. Stałą C oznacza się całkując równanie w granicach określonych wartości obu zmiennych, przy czym te graniczne wartości powinny odpowiadać warunkom doświadczenia. Przy założeniu, że dla t = O również y = O, czyli (G - y) = G, na stałą całkowania przypada wartość C = ln G. Podstawiając tę wartość do równania 12 otrzymuje się:

$$kt = -\ln (G - y) + \ln G$$
 (13)

skąd

$$kt = \ln \frac{G}{G - y}$$
(14)

a więc

$$y = G (1 - e^{-kt})$$
 (15)

17

Graficznie odpowiada to równanie eksponencjalnie rosnącej krzywej, którą w inżynierskim przybliżeniu można porównać z przebiegiem wytwarzania ogólnej ilości gazu w czasie dobrze zaszczepionej fermentacji periodycznej.

Przez podstawienie wartości y z równania 15 do równania 5 otrzymuje się alternatywną postać różniczkową równania szybkości reakcji pierszego rzędu:

$$\frac{dy}{dt} = k G e^{-kt}$$
(16)

Wzór ten opisuje krzywą wygaszania. Z wystarczającym przybliżeniem można zamienić nieskończenie małe przyrosty różniczkowe na przyrosty różnicowe:

$$\frac{\Delta y}{\Delta t} = k G e^{-kt}$$
(17)

Dla jednostkowego przyrostu czasu t = 1, porcja wytworzonego gazu  $\Delta y = r$ , zaś dla czasu t szybkość reakcji r określa równanie:

$$\mathbf{r} = \mathbf{k} \mathbf{G} \mathbf{e}^{-\mathbf{k}\mathbf{t}} \tag{18}$$

Wzór ten w przybliżeniu określa przebieg szybkości wytwarzania gazu w czasie próby zbiornikowej należycie zaszczepionej fermentacji periodycznej. Na odstępstwa od tej regularności wskazują prace CHMIELOWSKIego i współpracowników [12], które opisują wpływ przeciążenia substratów na przebieg fermentacji.

### Kinetyka wytwarzania gazu w fermentacji ciągłej z dużym zaszczepieniem i mieszaniem

Proces ciągły przebiega w reaktorze przepływowym. Do reaktora doprowadza się w sposób ciągły substraty reakcji i z określoną prędkością odbiera mieszaninę o określonym stopniu przereagowania, Reaktory przepływowe są zazwyczaj dwu typów: w postaci cylindra o wielokrotnym stosunku długości do średnicy lub też zbiornika - cysterny. Istotne różnice wynikają z odmiennej intensywności mieszania w obu tych przypadkach.

W reaktorze przepływowym typu rurowego zakłada się, że nie występuje mieszanie w kierunku przepływu. Założenie to jest usprawiedliwione dla każdego naczynia, w którym wymuszona szybkość w kierunku przepływu jest duża w stosunku do drugorzednych szybkości mieszania wynikających z naturalnej konwekcji lub dyfuzji. W takim reaktorze przy ustalonym przepływie w każdym przekroju reaktora utrzymuje się pewne stałe, charakterystyczne stężenie produktów, Stężenie substratów progresywnie maleje wzdłuż długości reaktora. Jeżeli zostana zachowane warunki podtrzymujące trwale stan układu, gdy uzyska się stan stacjonarny, w metodzie przepływowej czas przestaje być parametrem potrzebnym do rozpatrywania szybkości reakcji. Stężenie reagentów zmienia się, gdy mieszanina przepływa przez naczynie reakcyjne. W ten sposób objetość reaktora staje się parametrem dla tej metody dynamicznej. Stad równania definiujące szybkość reakcji w przypadku przepływu bedą odmienne niż dla metody zbiornikowej. Ważne jest więc rozróżnienie między statyczną - zbiornikową i dynamiczna - przepływową metodą uzyskiwania danych o szybkości reakcji. Jednak ogólne równania kinetyczne można zastosować dla obu sposobów prowadzenia procesów.

W reaktorze przepływowym można wybrać dowolny element objętościowy mieszaniny reakcyjnej dV. Można pominąć nieznaczne zmiany składu chemicznego, które powstają wskutek dyfuzji z sąsiedztwa rozpatrywanego elementu. Wtedy kinetyka reakcji zachodzącej w opisanym elemencie dV będzie zgodna z kinetyką procesu periodycznego.

Jeżeli reaktor przypływowy jest zaopatrzony w urządzenia do mechanicznego mieszania, można uzyskać zupełne wymieszanie masy reagującej. Mieszanie odgrywa doniosłą rolę w reaktorach typu cysterny [78]. Wskutek wymieszania uzyskuje się w reaktorze jednakowe stężenie i temperaturę masy reagującej, co z kolei powoduje, że szybkość reakcji jest stała w całym przekroju reaktora. Reaktor taki spełnia zasadę procesu guasi - ciągłego i różni się od typowych reaktorów ciągłych.

W aparaturze typu cysternowego z mieszadłem, reakcja biegnie ze stałą szybkością wyznaczoną przez skład mieszaniny opuszczającej reaktor. Ponieważ szybkość reakcji na ogół obniża się ze wzrostem stopnia przemiany, reaktor cysternowy pracuje na najniższym poziomie szybkości. Jest ona zawarta w granicach pomiędzy dużą szybkością odpowiadającą składowi wprowadzanego ładunku i małą szybkością odpowiadającą składowi mieszaniny opuszczającej reaktor. Nowoczesne komory fermentacji metanowej odpowiadają warunkom pracy reaktora typu cysterny. Są zaopatrzone w urządzenia mieszające, które zapewniają całkowite zmieszanie substratów z zawartością komory. Proces przebiega w stałej temperaturze, bliskiej optimum rozwoju bakterii metanowych. Nie wdając się w dokładniejszą analizę procesu można stwierdzić, że głównym parametrem układu jest czas przebywania mieszaniny reakcyjnej w komorze. Ten czas fermentacji określa stosunek czynnej objętości reaktora do szybkości zasilania substratów.

**POPEL** [69] stwierdził, że wytwarzanie gazu wzmaga się bardzo szybko po każdym zasilaniu wpracowanej komory fermentacyjnej. Szybkość gazowania osiągała punkt szczytowy po dwu godzinach od chwili zasilania po czym opadała najpierw szybko, potem coraz wolniej. Wytwarzanie gazu w takim quasi ciągłym procesie fermentacji można sobie wyobrazić jako sumę procesów o kinetyce periodycznej, wielokrotnie powtarzających się z częstotliwością zasilania.

Jeżeli to zasilanie bedzie równomierne, uzyska się równomierne wytwarzanie gazu. W praktyce technologicznej [28, 71, 73] mała ilość substratu wprowadza się do komory, w której ulega ona całkowitemu zmieszaniu z masą fermentującą. Wskutek tego ciagła fermentacje metanowa można uważać za wielokrotnie powtarzany proces zbiornikowy z wystarczająco dużym zaszczepieniem. Obciążenie komór jest związane z czasem przebywania reagującej masy w komorze. Można podać biologiczne uzasadnienie maksymalnie dopuszczalnego obciażenia komór fermentacyjnych pracujących w sposób ciągły. Polega ono na tym. że ubytek bakterii metanowych spowodowany odprowadzeniem przereagowanej masy, jest uzupełniony przez wzrost drobnoustrojów. Liczne obserwacje wskazują, że najbardziej efektywny rozkład biologiczny następuje w komorach wówczas, gdy szybkość przepływu przez reaktor jest równa szybkości wzrostu biochemicznie czynnej mikroflory [47, 53]. Wtedy substraty ułegają przemianie w nowe komórki mieszanych populacji i inertne produkty metabolizmu. W ten sposób można utrzymać maksymalne steżenie równowagi w komorze fermentacyjnej.

Zmniejszenie czasu przebywania powoduje zmniejszenie czasu umożliwiającego całkowity rozkład substancji organicznych i metabolizm produktów pośrednich. Skrócenie czasu fermentacji poniżej wartości krytycznej wywołuje pojawienie się przeciążenia i związanych z tym zaburzeń ruchowych [1, 28, 50, 73]. Utrudnia to uzyskanie stabilnych produktów końcowych fermentacji. W komorze, w której wymieszanie jest całkowite, skład reagującej mieszaniny jest taki sam jak skład masy usuwanej z reaktora. Z prac CHMIELOWSKIego [12] wynika, że stabilny produkt fermentacji osadów organicznych można otrzymać, gdy komory fermentacyjne są obciążone w granicach umożliwiających przebieg rozkładu zgodny z reakcją pierwszego rzędu. Podane rozważania określają podstawowe teoretyczne parametry projektowania i eksploatacji komór fermentacyjnych. Technologia fermentacji metanowej wymaga również uwzględnienia irnych warunków procesu.

#### Kinetyka reakcji enzymatycznych

Liczne procesy biochemicznego rozkładu substratów określa się jako reakcje zerowego lub pierwszego rzędu [5]. Szybkość reakcji pierwszego rzędu jest proporcjonalna do stężenia reagujących substancji. Biologiczne utlenienie małych stężeń substancji organicznych zwykle podperządkowuje się reakcji pierwszego rzędu [22, 23, 57]. Natomiast reakcje zerowego rzędu przebiegają w obecności dużych stężeń substratów. Szybkość tych reakcji jest stała i niezależna od stężenia substratów. Jest to częsty przypadek w reakcjach enzymatycznych. CHMIELOWSKI [12] opisał występowanie reakcji zerowego rzędu w okresach przeciążenia komór fermentacyjnych. Dotychczas jednak reakcji tych nie uwzględniono w opisie kinetyki fermentacji metanowej.

Opracowano liczne równania kinetyczne, które opisują reakcje enzymatyczne w sposób mniej lub bardziej udany. Często rozwiązuje się równania różniczkowe, określające coraz bardziej złożone układy łańcuchów reakcji z wieloma stadiami pośrednimi lub z wieloma substratami. Różne postacie równań kinetyki enzymatycznej dyskutuje się w opracowaniach monograficznych i podręcznikowych [5, 18, 27, 67, 89].

Warto jednak rozpatrzyć najprostszy opis reakcji enzymatycznej. Na tej podstawie można bowiem wyjaśnić istotę zjawiska złożonego przebiegu wytwarzania gazu przez przeciążone komory fermentacyjne. Opis taki wynika z zasad kinetyki formalnej. Układ rozpatruje się w warunkach roztworu idealnego, w którym stężenia reagentów są równe ich aktywności. Stosowanie takiego uproszczenia w procesach biochemicznych wprowadza błąd, który można uznać za dopuszczalny. W celu wyjaśnienia złożonej zależności szybkość reakcji enzymatycznej od stężenia substratu należy rozpatrzyć układ dwu następujących po sobie reakcji:

$$k_{+1} k_{+2}$$
  
 $E + S E S E + P$  (19  
 $k_{-1} k_{-2}$ 

W pierwszym stadium reakcji enzym E w stanie wolnym reaguje z substratem S i tworzy się kompleks enzym-substrat ES. W drugim stadium procesu następuje rozkład tego kompleksu z wytworzeniem produktu P i regeneracją wolnego enzymu E.

Jeżeli założy się, że w początkowej fazie procesu występuje znaczny nadmiar substratu, a produkt praktycznie nie istnieje, szybkość powstawania kompleksu ES jest złożona. Ckreśla ją różnica szybkości powstawania kompleksu z substratu i enzymu oraz szybkości jego zanikania w przemianie odwrotnej. Część kompleksu jest również zaangażowana w reakcji tworzenia się produktu. W warunkach równowagi dynamicznej azybkość rozkładu kompleksu ES jest równa szybkości tworzenia się tego związku pośredniego:

$$k_{+1} (e-c) s - k_{-1} e = k_{+2} c - k_{-2} (e-c)p$$
 (20)

szybkość tworzenia ES szybkość rozkładu ES

W stanie stacjenarnym szybkość reakcji v określa wzór:

$$v = \frac{ds}{dt} = \frac{dp}{dt}$$
(21)

22

Natomiast stężenie produktu pośredniego ES jest stałe czyli

$$\frac{dc}{dt} = 0$$
 (22)

Stan stacjonarny może utworzyć się tylko w układzie otwartym, do którego w sposób ciągły doprowadza się substraty i usuwa produkty reakcji. W takim układzie otwartym pracują reaktory przepływowe, podczas gdy pomiary kinetyczne przeprowadza się z reguły w układzie zamkniętym, w próbach zbiornikowych.

Układ zamknięty ma tę własność, że każda reakcja w systemie może przebiegać do końca. W rezultacie stężenie substratu w takim układzie powoli maleje. Wraz z tym powinno maleć również stężenie kompleksu enzym-substrat. Występują przy tym stany quasi-stacjonarne, w których warunek de = 0 jest pierwszym przybliżeniem.

Podstawienie i rozwiązanie w równaniu 20 daje:

$$k_{-2}(e-c)p + k_{+2}(e-c)s = k_{-1}c + k_{+2}c$$
 (23)

$$c(k_{-1} + k_{+2}) = (e-c)(k_{-2}p + k_{+1}s)$$
 (24)

$$\frac{c}{(e-c)} = \frac{\frac{k_{-2}p + k_{+1}s}{k_{-1} + k_{+2}}}{\frac{k_{-1} + k_{+2}}{k_{-1} + k_{+2}}} = \frac{\frac{k_{-2}p}{k_{-1} + k_{+2}}}{\frac{k_{-1} + k_{+2}}{k_{-1} + k_{+2}}}$$
(25)

Ponieważ w początkowym stadium reakcji stężenie produktu p jest bardzo małe, całe wyrażenie zawierające tę wielkość można pominąć, co prowadzi do równania:

$$\frac{(e - c)}{c} = \frac{\frac{k_{-1} + k_{+2}}{k_{+1}s}$$
(26)

Jeżeli podzieli się przez c obie strony równości:

$$(e - c) = e - c$$
 (27)

przeto:

$$\frac{(e-c)}{c} = \frac{e-c}{c} = \frac{e}{c} - 1 = \frac{k-1+k+2}{k+1}$$
(28)

stad:

$$\frac{e}{c} = \frac{k_{-1} + k_{+2}}{k_{+1}s} + 1$$
(29)

Szybkość reakcji katalizowanej przez enzym osiąga wartość maksymalną V, gdy enzym jest całkowicie nasycony substratem. Maksymalna szybkość reakcji V jest proporcjonalna do całkowitego stężenia enzymu e:

$$V = k_{\pm 2} e \tag{30}$$

Wypadkowa szybkość reakcji v jest jednakże proporcjonalna do ilości enzymu reagującego w danej chwili czyli zależy od stężenia c kompleksu enzymi-substrat. Można więc napisać:

$$\frac{e}{c} = \frac{V}{v} = \frac{\frac{k_{-1} + k_{+2}}{k_{+1}s} + 1$$
(31)

po przekształceniu:

$$\mathbf{v} = \frac{\mathbf{v}}{\frac{\mathbf{k}_{-1} + \mathbf{k}_{+2}}{\mathbf{k}_{+1}\mathbf{s}} + 1}$$
(32)

Stosunek stałych szybkości reakcji w tym równaniu można zastąpić przez K<sub>m</sub> - stałą MICHAELISa:

$$\frac{k_{-1} + k_{+2}}{k_{+1}} = K_{m}$$
(33)

Jeżeli licznik i mianownik tak zmodyfikowanego równania pomnoży się przez s, otrzymuje się zwykłe równanie MICHAELISa i MENTENa [5, 67]:

$$v = \frac{Vs}{K_m + s}$$

Dla danego enzymu maksymalna szybkość reakcji V i wartość K są stałe, aczkolwiek mogą one zmieniać się niezależnie od siebie w różnych warunkach. Jak można wykazać algebraicznie, stałą MICHAELISa określa się jako stężenie substratu, które odpowiada połowie maksymalnej szybkości reakcji erzymatycznej.

Zależność szybkości reakcji enzymatycznej od stężenia substratu wynika w sposób oczywisty z wzoru MICHAELISa i MENTENa. Jeżeli stężenie substratu s jest liczbowo bardzo duże w porównaniu z wielkością K - można pominąć wartość stałej MICHAELISa w mianowniku rownania 34. Upraszcza się ono do postaci:

$$\mathbf{v} = \frac{\mathbf{V} \mathbf{s}}{\mathbf{s}} \equiv \mathbf{V} = \mathbf{k}_{+2}$$
 (35)

Na początku reakcji, gdy stężenie substratu jest duże, cała ilość enzymu występuje w postaci kompleksu enzym - substrat i szybkość reakcji zbliża się do wartości maksymalnej. Oznacza to, że maksymalna szybkość w reakcji w obecności nadmiaru substratu nie zależy od stężenia substratu. Wtedy układ spełnia warunki kinetycznej reakcji zerowego rzędu. Jeżeli stężenie substratu s jest małe w porównariu z wartością stałej K, można pominąć wartość s w mianowniku równania 34. Przybiera ono postać:

$$V = \frac{V s}{K_m}$$

Szybkość reakcji staje się proprocjonalna do stężenia substratu i reakcja podporządkowuje się równaniu kinetycznemu pierwszego rzędu.

Z przytoczonych rozważań wynika, że w reakcjach enzymatycznych rzędowość reakcji zmienia się pomiędzy pierwszym

(36)

(34)

i zerowym rzędem względem substratu przy wzroście stężenia substratu. W stosunku do enzymu reakcja jest stale pierwszego rzędu. Dla uproszczenia sformułowań matematycznych opisujących te zjawiska, przyjmuje się, że reakcje enzymatyczne są pierwszego lub zerowego rzędu z ostrym przejściem pomiędzy tymi stanami. Z przesłanek teoretycznych wynika, że oddzielna reakcja nie może podlegać prawom kinetyki zerowego rzędu. Dlatego też jeżeli obserwuje się zjawisko, które podporządkowuje się tym prawom - wskazuje to na występowanie systemu reakcji.

W ogólnej charakterystyce systemów złożonych z konsekutywnych reakcji pierwszego i zerowego rzędu można posługiwać się najprostszym schematem:



w którym k<sub>1</sub> i k oznacza stałe szybkości reakcji pierwszego i zerowego rzędu w przemianie substancji A, B, C o stężeniach chwilowych a, b i c. Początkowe stężenie substratu A oznacza A. Dla takiego systemu można podać równania ckreślające szybkość reakcji:

$$-\frac{da}{dt} = k_1 a$$
 (38)

$$\frac{db}{dt} = k_1 - k_0 \tag{39}$$

$$\frac{\mathrm{d}\mathbf{e}}{\mathrm{d}\mathbf{t}} = \mathbf{k}_{0} \tag{40}$$

Przez całkowanie tych równań otrzymuje się:

$$a = a_0 e^{-k_1 t}$$
(41)

$$b = a_0(1-e^{-k_1 t})$$
 (42)

 $c = k_0 t$  (43)

W takim układzie proces najpowolniejszy kontroluje ogólną szybkość przemiany. Zwykle reakcja zerowego rzędu jest sterująca. Zgodnie z tym szybkość nagromadzenia się substancji C jest stała. Stężenie substancji A zmniejsza się eksponencjalnie zaś stężenie substancji B początkowo rośnie, po czym spada. Podane równania opisują zachowanie się systemu tylko w pewnym przedziale stężeń substratu. Przy dostatecznie małych stężeniach substancji B druga reakcja nie podlega reakcji zerowego rzędu. Wtedy obie reakcje podporządkują się kinetyce pierwszego rzędu; reakcją sterującą będzie powolniejsza z nich.

Reakcję zerowego rzędu charakteryzuje stała szybkość przemiany. Wytwarzanie gazu podporządkowane temu procesowi można opisać przez równanie:

$$y = k_0 t$$

oznacza to, że ilość gazu y wytworzona w czasie t jest wprost proporcjonalna do czasu. W równaniu tym k oznacza stałą szybkość reakcji zerowego rzędu.

Szybkość wytwarzania gazu r, stałą w tym procesie określa równanie:

$$\mathbf{r} = \mathbf{k}_{o}$$
 (4)

Analogiczna sytuacja pojawia się w rozpatrywaniu układów heterogennych, w przypadku nasycenia katalizatora przez całkowite zablokowanie jego powierzchni. Wytwarza się określona ilość produktu pośredniego, który jest nietrwałym połączeniem katalizatora z substratem. Nietrudno zauważyć, że tego rodzaju mechanizm musi znaleźć odbicze w specyficznej kinetyce reakcji. Przebieg jej bowiem i ilości produktu nie są zdeterminowane przez stężenie początkowe substratów lecz przede wszystkim przez stężenie i kinetykę rozpadu związku pośredniego.

27

(44)

5)

### CZĘŚĆ DOŚWIADCZAINA

#### Metodyka badań

#### Laboratoryjne komory fermentacyjne

Fermentacje metanowa osadów organicznych prowadzono w skali laboratoryjnej metoda ciagłą w komorach obrotowych (rys.2). Były to 10-litrowe butle szklane o dokładnie wyznaczonej objetości przez cechowanie woda. Wewnatrz butli znajdowała się trwale zamocowana rama z przejrzystego tworzywa. Rura zasilająca z plastyku, zakończona wężem gumowym ze ściskaczem śrubowym. umożliwiała pobór prób lub wprowadzenia świeżych porcji osadu do wnętrza komory. Operacje te przeprowadzono przy pomocy metalowej strzykawki o objętości 250 ml. Aby zapobiec przenikaniu powietrza do komory w czasie poboru lub zasilania osadu, rurę zasilającą umieszczono pod powierzchnia cieczy. W tym celu stosowano także małe nadciśnienie gazu w komorze w czasie operacji. Komory fermentacyjne były umieszczone w pozycji leżącej na napędzanych mechanicznie, obracających się wałkach okrytych gumą. Urządzenie obracało się w sposób ciągły z szybkością 7 obr/min. Obracanie komór fermentacyjnych powodowało dokładne mieszanie materiału reagującego, zabezpieczało przed tworzeniem sie kożucha i rozwarstwieniem osadu. Zawartość komór podlegała mieszaniu, w czasie którego błonka fermentującego osadu, odnawiająca się w sposób ciągły na wewnętrznych ścianach komory, była w ścisłym kontakcie z faza gazowa.

Membrana z mięsistej guny w szklanym lub plastykowym uchwycie służyła jako zawór gazowy. Umożliwiało to wymianę gazu, pomiar ciśnienia i pobór prób gazu przy pomocy urządzeń zaopatrzonych w igły iniekcyjne, które służyły do przebijania membrany. Membrany te, nawet po kilkudziesięciokrotnym przekłuciu igłą iniekcyjną, były szczelne dla ciśnień rzędu 1,5 atn.

Periodyczną fermentację metanową osadów organicznych i kilku niższych kwasów alifatycznych lub redukcję dwutlenku węgla do metanu w obecności wodoru, przeprowadzano w butlach szklanych z tubusem dolnym. Objętość komór, dokładnie wyznaczona przez cechowanie wodą, była różna zależnie od serii doświadczeń. Zawartość tych komór podlegała tylko jednokrotnemu wstrząsaniu na dobę. Zawory umożliwiały pobór prób i pomiar wytwarzanego gazu. Pobór prób fermentujących substratów ciekłych następował przez urządzenia umieszczone w dolnym tubusie komór. Operowanie szklanymi komorami pod ciśnieniem gazu stwarzało pewne niebezpieczeństwo. Aby zapobiec ewentualnemu rozerwaniu butli szklanej doświadczenia prowadzono z takimi objętościami fermentujących substratów, które powodowały wzrost ciśnienia gazu nie przekraczający 400 mm Hg na dobę.

Komory fermentacyjne znajdowały się w termostacie, w którym grzejnik sprzężony z wentylatorem pozwałał na utrzymywanie kontrolowanej temperatury 32 + 1°C. Ta temperatura odpowiadała optimum dla mezofilnej fermentacji metanowej [26].

#### Analizy kontrolne

Jednorodne próbki fermentujących substratów pobierane z komór fermentacyjnych miały objętość 150 do 200 ml. Służyły one do przeprowadzenia analizy na zawartość kwasów lotnych, suchej pozostałości ogólnej i lotnej oraz oznaczeń alkaliczności i pH.

Analizy przeprowadzano zgodnie z zaleceniami STANDARD METHODS [84]. Wyniki analiz podawano jako średnie arytmetyczne co najmniej dwu oznaczeń. W niektórych seriach doświadczeń pobrane próby ze środowiska fermentacyjnego służyły do chromatograficznej identyfikacji i ilościowego oznaczania niższych kwasów alifatycznych.

Nie prowadzono prób izolowania lub identyfikacji mikroorganizmów czynnych w fermentacji metanowej, niekiedy jednak obserwowano mikroskopowo fermentujący osad lub ciecz nadosadową dla określenia morfologicznych form rozwijających się drobnoustrojów.

#### Pomiary wytwarzania gazu

Opracowana metoda pomiaru wytwarzania gazu fermentacyjnego wykluczała konieczność budowy oddzielnej aparatury dla zbierania i pomiaru objętości gazu pod ciśnieniem atmosferycznym. Aparatura taka jest zwykle kłopotliwa w użyciu, a byłaby szczególnie trudna do skonstruowania w połączeniu z obrotowymi komorami użytymi dla laboratoryjnej fermentacji osadów organicznych.

Pod względem fizykalnym metoda przedstawia przemianę izochoryczno izotermiczną. Parametrem niezależnym jest ciśnienie gazu panujące wewnątrz komory fermentacyjnej. Przebiegające procesy biochemiczne powodują zmiany ciśnienia gazu; natomiast ogólna objętość butli, objętość masy fermentującej i temperatura pozostają stałe w trakcie doświadczenia. W niektórych wypadkach objętość substratu zmieniała się wskutek pobierania prób w znany sposób, co korygowano w obliczeniach.

Znając ogólną objętość komory, objętość fermentującego osadu, temperaturę i ciśnienie w komorze, można było obliczyć objętość gazu wytworzonego przez fermentację. Warunkach przeprowadzanych doświadczeń użycie w obliczeniach praw gazów doskonałych nie powodowało popełnienia znaczniejszych błędów. Również zaniedbywano błędy wywołane przez rozpuszczalność gazów w fazie ciekłej. Należało natomiast przeprowadzić korektę pomiarów gazowych na ciśnienie cząstkowe pary wodnej, temperaturę i zmiany ciśnienia atmosferycznego. W celu zredukowania odczytów do warunków normalnych gazu suchego pod ciśnieniem 760 mm Hg w temperaturze O<sup>o</sup>C zastosowano zwykły wzór redukcyjny:

$$V_{\rm N} = V \frac{b_{\rm gs} T_{\rm N}}{b_{\rm N} T}$$
(46)

i

$$b_{gg} = b_m + b - b_w \tag{47}$$

w którym:

V<sub>N</sub> - objętość gazu suchego w warunkach normalnych,

V - objętość przestrzeni gazowej komory fermentacyjnej,

T<sub>N</sub> - temperatura normalna w skali bezwzględnej,

- ciśnienie absolutne gazu suchego w komorze w mm Hg,

- b<sub>m</sub> ciśnienie gazu w komorze odczytane z manometru w mm Hg
- b ciśnienie atmosferyczne w mm Hg,
- b ciśnienie cząstkowe pary wodnej w temperaturze komory fermentacyjnej.

Ponieważ objętość przestrzeni gazowej komory V i temperatura fermentacji T jest stała, równanie przybiera postać:

$$V_N = b_{gS}$$
 const. (48)

W obliczeniu wartości b dla podstawienia w podanym wzorze pominięto korektę odczytu barometrycznego i manometrycznego ponieważ błędy wynikłe ze zmian ciśnienia atmosferycznego okazały się nieistotne w obserwacjach seryjnych.

Objętość gazu przed wyrównaniem ciśnienia gazu w komorze do ciśnienia atmosferycznego wynosiła c.b., przy czym c oznacza "stałą komory". Po usunięciu nadmiaru gazu i doprowadzeniu komory do ciśnienia atmosferycznego, objętość gazu była równa c(b-b.). Z tego wynika, że objętość gazu wytworzonego w czasie fermentacji, a następnie usuniętego przez doprowadzenie układu do ciśnienia atmosferycznego (V<sub>prod</sub>), określa wzór:

$$V_{\text{prod}} = c b_{gs} - c (b-b_{w})$$
(49)

$$V_{\text{prod}} = c b_{\text{m}}$$
 (50)

Wzór ten służył do wyliczenia szybkości wytwarzania gazu i ogólnej produkcji gazu fermentacyjnego. Umożliwiał również obliczenie zmian zachodzących w fazie gazowej w czasie biochemicznej redukcji dwutlenku węgla do metanu. Objętości gazów podawano w mililitrach w warunkach normalnych w odniesieniu do jednostki czasu i 1 litra fermentującej masy w komorze.

W określonych odstępach czasu przed poborem prób lub wymianą substratów, dokonywano pomiarów ciśnienia w komorach fermentacyjnych, używając manometru rtęciowego. Manometr byż wyposażony w cienki wąż igelitowy o średnicy 2 mm, zakończony igłą iniekcyjną dla perforacji membran zaworów gazowych. Równocześnie notowano temperaturę fermentacji i ciśnienie atmosferyczne. Aby uchwycić przyrosty gazowania, po tych pomiarach nadmiar wytworzonego gazu wypuszczano z komory fermentacyjnej przez przebicie membrany zaworu gazowego igłą iniekcyjną i wyrównanie ciśnienia z atmosferą. Było jednak pożądane pozostawianie niewielkiego ciśnienia szczątkowego, które zabezpieczało komorę przed przedostaniem się powietrza w czasie poboru prób lub wymiany substratów, po czym ciśnienie to likwidowano.

Rozpowszechniona metoda pomiaru gazu w badaniach fermentacji metanowej polega na mierzeniu przyrostów objętości przy stałym ciśnieniu [79]. Ponieważ podstawą prowadzonych doświadczeń był sposób odwrotny polegający na wykorzystaniu wzrostu ciśnienia gazu zamkniętego w stałej objętości, należało przeprowadzić próbę porównania wyników obu tych metod.

Wyniki obserwacji dobowej szybkości produkcji gazu w czasie 20 dni periodycznej fermentacji osadów wykazały, że wytwarzanie gazu obliczone z pomiarów ciśnienia było w przybliżeniu o 10% wyższe od wyznaczonego przez bezpośredni pomiar objętości.

#### Interpretacja kinetyki metanogenezy

Przebieg przemian gazowych w czasie metanogenezy opisywano przy pomocy równań kinetycznych pierwszego i zerowego rzędu. Obserwacje te dotyczyły układu zamkniętego typu zbiornikowego. Interpretację kinetyki fermentacji metanowej małych stężeń substratów oparto na obu alternatywnych równaniach reakcji pierwszego rzędu. Zależność ogólnej ilości wytwarzanego gazu y od czasu reakcji t określa równanie 15:

$$y = G(1 - e^{-kt})$$
 (15)

Zmiany szybkości wytwarzania gazu r w czasie reakcji t wyznacza równanie 18 krzywej wygaszania:

$$\mathbf{r} = \mathbf{k} \mathbf{G} \mathbf{e}^{-\mathbf{k}\mathbf{t}}$$
(18)

Jeżeli w początkowym okresie fermentacji występowało przeciążenie spowodowane nadmiarem substratu, ujawniało się ono przez stałą szybkość wytwarzania gazu w okresie czasu t. Proces interpretowano w tym okresie jako reakcję rzędu zerowego, określoną przez równanie 44:

$$y = k_0 t$$
 dla  $t \le t_0$  (44)

Wykres tej funkcji daje prostą dla t $\leq$ t przecinającą początek układu współrzędnych. Tworzy ona z osią czasu kąt, k którego tangems jest liczbowo równy stałej k dla reakcji zerowego rzędu. Szybkość wytwarzania gazu r, stałą w czasie t\_, podaje równanie 45:

$$\mathbf{r} = \mathbf{k} \qquad \text{gdy} \quad \mathbf{t} \leq \mathbf{t} \qquad (45)$$

Wystąpienie fazy zerowego rzędu, która trwała przez czas t wymagało korygowania czasu przebiegu późniejszej fazy reakcji pierwszego rzędu do wartości  $t' = (t - t_0)$ . Ogólną ilość gazu Z, wytworzoną w czasie całego procesu, należało pomniejszyć o ilość gazu y reagującą w warunkach reakcji rzędu zerowego. W ten sposób określano produkcję gazu w reakcji pierwszorzędowej:

$$\mathbf{G} = \mathbf{Z} - \mathbf{y}_{\mathbf{Q}} \tag{51}$$

Wówczas równanie 15 i 18 przybiera postać:

$$y = G(1 - e^{-k(t - t_0)})$$
 (52)

$$r = k G e \qquad -k(t - t)$$
 dla  $t \ge t_0 \qquad (53)$ 

Wartość t określa na wykresie punkt przecięcia się funkcji kinetycznych zerowego i pierwszego rzędu, którym podporządkowano ogólny przebieg fermentacji. Wyznaczenie stałej szybkości reakcji pierwszego rzędu k można przeprowadzić metodami obliczeniowymi lub graficznymi. Przez całkowanie równania 5 określającego szybkość reakcji monomolekularnej:

$$\frac{dy}{dt} = k(G - y)$$
(5)

biorąc pod uwagę warunek początkowy, to dla t = 0; y = 0, otrzymuje się wyrażenie, które pozwala na obliczenie stałej k:

$$k = \frac{1}{t} \ln \frac{G}{G - y}$$

Różniczkowa metoda obliczenia stałej k opiera się na założeniu, że szybkość reakcji r określa:

$$\mathbf{r} \equiv \frac{\mathrm{d}\mathbf{y}}{\mathrm{d}\mathbf{t}} = \mathbf{k}(\mathbf{G} - \mathbf{y}) \tag{5}$$

wtedy:

$$\ln r = \ln k + \ln (G - y)$$

Jeżeli kinetyka rozpatrywanego procesu odpowiada reakcji pierwszorzędnej, wykres ln r jako funkcji ln(G - y) jest prostoliniowy. Tangens kąta nachylenia prostej od osi czasu w skali logarytmicznej jest równy około 1. Ustalenie wartości liczbowych równania wyznacza wartość stałej k.

Inna metoda graficzna polega na wykreśleniu zależności ln(G - y) względem czasu reakcji t. W przypadku reakcji pierwszego rzędu wykres daje prostą. Stałą szybkości reakcji k wyznacza tangens kąta nachylenia tej prostej do osi czasu. Najbardziej dogodny i zupełnie wystarczający dla przeprowadzanych badań okazał się uproszczony sposób wyznaczania wartości stałej k [12, 75]. Sposób ten polega na konstruowaniu wykresu zależności ogólnego wytwarzania gazu od czasu doświadczenia. Jeżeli w zcałkowanym równaniu 15 wartość k staje się równa  $\frac{1}{+}$  to równanie przybiera postać:

$$y_1 = G(1 - e^{-1}) = 0,63 G$$
 (54)

w którym y<sub>1</sub> oznacza wartość y w czasie t<sub>1</sub>. Posługując się wartościami liczbowymi tych wielkości, można obliczyć k jako odwrotność czasu, w którym powstało 63% ogólnej ilości gazu wytworzonego w reakcji. Na przykład, jeżeli wielkość y<sub>1</sub> wynosi 3351 ml (G = 5352 ml) i na wykresie odpowiada to t<sub>1</sub> = 3,3 dni, wtedy k = \_\_\_\_, czyli k

jest równe około 0,3.

Zastosowano również praktyczny sposób graficznej korelacji wielkości stałych k i k w procesach złożonych z obu funkcji kinetycznych. Jeżeli w równaniu 53 szybkości reakcji:

$$-k(t - t_{o})$$

$$r = k G e$$
(53)

wielkość  $(t - t_0) = 0$ , a więc w punkcie  $t_0$  przecięcia się obu funkcji, szybkość procesu zerowego i pierwszego rzędu jest równa:

$$\mathbf{r} = \mathbf{k} \mathbf{G} = \mathbf{k} \tag{55}$$

zaś wartość k<sub>o</sub>, jak wspomniano, określa współczynnik kierunkowy na wykresie y = k<sub>o</sub> t dla t $\leq$ t<sub>o</sub>.

#### Chromatograficzna analiza gazu

Zastosowano chromatografię gazową do analizy gazu fermenta yjnego [12, 29, 32] i badania przemian zachodzących w czasie biochemicznej redukcji dwutlenku węgla do metanu [14]. Opracowano dwie różne metody chromatograficznej analizy gazowej.

Jedna z nich opierała się na zastosowaniu argonu i komory jonizującej ze Stroptem -90 [51, 52, 10, 12] do badań
nad fermentacją metanową. Drugi sposób polegał na zmodyfikowaniu metody JANAKa [41, 42, 43, 15] i adaptowaniu jej do przeprowadzonych badań. Metoda ta umożliwiała bezpośredni objętościowy pomiar rozdzielonych chromatograficznie składników gazu przy użyciu dwutlenku węgla jako gazu nośnego i alkalicznej absorpcji.

W pierwszym przypadku poszczególne składniki gazu ulegały rozdzieleniu w czasie wymywania argonem z kolumny adsorpcyjnej, wypełnionej węglem aktywowanym. Detekcja tych składników następowała w komorze jonizującej z promieniowaniem beta. Metoda opierająca się na tej zasadzie umożliwiała oznaczenie wodoru, azotu, metanu i dwutlenku węgla w czasie jednego postępowania analitycznego. Aparatura do chromatografii gazowej pokazana na rys 3 składała się z urządzenia do wprowadzania próby, kolumny chromatograficznej w termostatowanej osłonie grzejnej, komory jonizacyjnej jako detektora, przepływomierza, manometru i cylindra z argonem przechodzącym przez zawór redukcyjny.

Kolumnę chromatograficzną zbudowano z rury szklanej o średnicy około 4 mm, długości 125 cm, napełnionej przez 6,5 g węgla aktywowanego (Sutcliffe, Speakman, No B-206) o granulacji 30 - 70. Elektryczna osłona grzejna, zaopatrzona w termometr kontaktowy dla kontroli temperatury, okrywała kolumnę chromatograficzną i komorę jonizacyjną. Dla zabezpieczenia stałości chromatograficznego procesu sorpcyjnego ustalono temperaturę 50°C  $\pm$  0,5°. Szybkość przepływu argonu, służącego jako gaz nośny, wynosiła 46 ml/min. Spowodowanie takiego przepływu wymagało ciśnienia argonu 230 mm Hg u wejścia do kolumny. Próby 10 ml gazu fermentacyjnego odmierzano pod ciśnieniem atmosferycznym przy pomocy wycechowanej strzykawki szklanej i wprowadzano do strumienia nośnego argonu przez przebicie gumowej membrany zaworu gazowego, umieszczonego u wejścia do kolumny chromatograficznej.

Detektor jonizacyjny był wykonany z mosiądzu i miał kształt cylindryczny. Świeca iskrownika (Champion C-5), centralnie umieszczona w komorze jonizacyjnej służyła jako elektroda kolektora. Została ona zmodyfikowana przez dodanie cylindrycznej nasadki mosiężnej. Kolektor był elektrycznie izolowany od korpusu detektora. Elektrodę centralną otaczał cylinder z folii srebrnej zawierającej materiał radioaktywny w ilości 10 mc Strontu -90. Cylinder ten mechanicznie i elektrycznie łączył się z wewnętrzną ścianą korpusu komory. Gaz znajdujący się w detektorze ulegał jonizacji wskutek bombardowania cząstkami beta, emitowanymi przez radioaktywny stront. Stabilizator napięcia włączony pomiędzy centralną elektrodę



Rys. 3. Schemat aparatury do chromatografii gazowej z radioaktywną komorą jonizacyjną



Rys. 4. Typowy przebieg serił analiz chromatograficznych gazu fermentacyjnego w okresie zasilania komory

kolektora i korpus komory z elektrodą radioaktywną wytwarzał różnicę potencjałów około 300 V. W tych warunkach prąd jonizacyjny płynący do centralnej elektrody kolektora podlegał wzmocnieniu w amplifikatorze i zapisowi przez rejestrator potencjometryczny (Honeywell-Brown). Konstrukcja wzmacniacza umożliwiała ustawienie pisaka w dowolnie wybranym położeniu zerowym, które odpowiadało przepływowi czystego argonu przez komorę jonizacyjną. Wychylenia od tego położenia pojawiały się w przypadku wnoszenia przez argon innych gazów do komory jonizacyjnej. Składniki gazowe notował rejestrator w postaci oddzielnych pik na wykresie zależności wychylenia potencjometru od czasu analizy.

Ustalono zależność wysokości pik od objętości wodoru, azotu, metanu i dwutlenku węgla w wybranych stałych warunkach doświadczenia. Te krzywe cechowania służyły dla analitycznego oznaczania składu gazu wytwarzanego w czasie fermentacji metanowej. Obserwowano wyższą czułość detektora jonizacyjnego dla wodoru i azotu i niższą dla dwutlenku węgla. Wskutek tego błędy popełniane przy oznaczeniu gazów zależały od rodzaju analizowanego gazu. Błędy te nie przekraczały kilku procent.

Oznaczenia dwutlenku węgla w dużym stopniu zależały od procesu sorpcji na węglu aktywowanym kolumny. Krzywa cechowania dwutlenku węgla miała kształt izotermy adsorpcji. Nie było to dogodne dla ilościowych oznaczeń stężeń dwutlenku węgla większych od 40%. Takie wielkości nie zdarzały się w przeprowadzanych badaniach. Okazało się jednak, że dla oznaczenia wyższych stężeń dwutlenku węgla lepiej nadaje się pomiar powierzchni piku, a nie jego wysokości [12]. Próbki gazu pobierano z każdej komory fermentacyjnej i analizowano dla śledzenia zmian w składzie gazu, zachodzących w czasie fermentacji metanowej (rys.4).

Dla analizy gazu fermentacyjnego i badanych redukcji dwutlenku węgla do metanu zastosowano metodę chromatografii gazowej JANAKa. W doświadczeniach posługiwano się zmodyfikowaną aparaturą, przystosowaną do przeprowadzanych badań [15].

Aparatura była wyposażona w butlę z czystym CO<sub>2</sub>, który był gazem nośnym pomiarów chromatograficznych. Manometr i urządzenie do pomiaru przepływu pozwalały na regulację ilości tego gazu. Zawór z mięsistej gumy umożliwiał wprowadzanie próby analizowanego gazu do kolumny chromatograficznej, z której gazy przepływały do pochłaniacza CO<sub>2</sub> i miernicy (rys.5).

Próbę badanego gazu wprowadzono do strumienia gazu nośnego kalibrowaną strzykawką szklaną o pojemności 2,0 ml, Kolumnę chromatograficzną stanowiła rura szklana o długości 2,5 m i średnicy 4 mm, wypełniona przez 22,0 g węgla aktywowanego (Sutcliffe, Speakman No B-206) o granulacji 30-70. Kolumna chromatograficzna była połączona z kranem trójdrożnym umożliwiającym skierowanie strumienia gazu do pochłaniacza CO<sub>2</sub> względnie do miernicy; która służyła do pomiaru prędkości przepływu CO<sub>2</sub>. Przepływomierz gazu nośnego składał się z miernicy kalibrowanej do 0,1 ml umieszczonej w płaszczu wodnym dla utrzymania stałej temperatury. Miernica łączyła się z naczyniem zawierającym roztwór mydła. Pomiar przepływu następował przez określenie szybkości poruszania się dysku błony mydlanej w miernicy.

Jako pochłaniacz CO<sub>2</sub> służył zbiornik szklany długości 20 cm i średnicy 2 cm, wypełniony stężonym roztworem ługu (100 g KOH w 100 ml wody). Dwutlenek węgla ulegał absorpcji w czasie przepływu przez alkaliczny roztwór, natomiast inne składniki mieszaniny przechodziły do miernicy gazowej. Miernica ta była kalibrowana z dokładnością do 0,01 ml i zaopatrzona w naczynie wyrównawcze, umożliwiające pomiar objętości pod ciśnieniem atmosferycznym. Miernicę gazową wypełniała ciecz manometryczna (23 g NaCl, 0,5 g cholanu sodu z dodatkiem fluoresceiny w 100 wody). Pomiar objętości gazu w miernicy wykonywany w odstępach 30-sekundowych umożliwiał wykreślenie krzywej chroma ograficznej. Typowe krzywe chromatograficzne tego typu demonstruje rys.6.

" celu wyznaczenia optymalnych warunków pomiarów chromatograficznych, wykonano szereg analiz tego samego gazu fermentacyjnego przy różnych szybkościach przepływu gazu nośnego i dla różnych objętości analizowanej próby. Dobre rozdzielenie poszczególnych składników mieszaniny gazowej następowało w ciągu kilkunastu minut po wprowadzeniu ze strzykawki lekarskiej 2.0 al badanego gazu do strumienia gazu nośnego o szybkości przepływu 18 ml/min w 20°C. Przepływ taki wywoływało ciśnienie 100 mm Hg dwutlenku wegla u wejścia do kolumny. W wypadku gdy przez aparaturę przepływał czysty CO. gaz ulegał całkowitemu pochłonięciu, tak że w ciągu 18 minut pomiaru nie obserwowano istotnego wzrostu objetości gazu w miernicy. Umożliwiało to pomiar ilości dwutlenku węgla zawartego w badanym gazie. Odpowiadała ona różnicy objętości wprowadzonej próby gazu i sumarycznej objętości frakcji gazów zebranych w miernicy w czasie analizy tej próby.

W celu określenia błędów analizy w ustalonych warunkach pomiarów, powtórzono dziesięciokrotnie próbę wprowadzenia 2,0 ml wodoru lub czystego azotu i badano jego odzyskanie



Rys. 5. Schemat aparatury do chromatografii gazowej według zmodyfikowanej metody JANAKa

100



Rys. 6. Analiza gazowo-chromatograficzna mieszan'ny gazowej zawierającej wodór, azot, metan i dwutlenek węgla

w miernicy aparatu. Okazało się, że błąd popełniany przy wprowadzaniu próby wynosił + 1,5%. Również dziesięciokrotnie powtórzono analizę wybranego gazu fermentacyjnego. Analiza statystyczna wyników wykazała, że błąd pomiaru dla metanu wynosił około - 0,6% dla dwutlenku węgla około - 1,5% i dla azotu około - 5%.

Do chromatografii gazowej należało stosować CO<sub>2</sub> o wysokiej czystości, nie zawierający zanieczyszczeń gazowych, które by nie ulegały absorpcji alkalicznej. W tym celu techniczny CO<sub>2</sub> oczyszczano przez zestalenie wskutek ekspansji gazu z butli. Zestalenie CO<sub>2</sub> i dokładne wypełnienie tym produktem małej butli stalowej umożliwiało otrzymanie CO<sub>2</sub> o czystości wystarczającej do analiz chromatograficznych.

#### Chromatografia bibułowa kwasów lotnych

Zastosowano chromatografię bibułową do rozdzielenia i do analizy lotnych kwasów tłuszczowych C<sub>2</sub> do C<sub>6</sub>, które występują jako półprodukty fermentacji metanowej. Do tego celu najbardziej dogodna okazała się metoda HISCOXa i BERRIDGEa [38].

Kwasy rozdziela się chromatograficznie w postaci soli etyloaminowych przy pomocy systemu rozpuszczalników, złożonego z butanolu,wody i etyloaminy. Rozdzielone związki występują w postaci czerwono zabarwionych plam po potraktowaniu roztworem czerwieni chlorofenolowej. Proporcjonalna zależność wielkości powierzchni plamy od stężenia [54] umożliwiła opracowanie przybliżonego sposobu analizy ilościowej rozdzielonych kwasów lotnych.

Próbę do badania chromatograficznego przygotowano przez destylację kwasów lotnych z parą wodną z 50 ml cieczy pobranej ze środowiska fermentacyjnego. Próbę zakwaszano 2,5 ml stężonego kwasu siarkowego, dodawano 150 ml wody destylowanej i prowadzono powolną destylację do uzyskania 150 ml destylatu. Dla oznaczenia ogólnej ilości kwasów lotnych w przeliczeniu na kwas octowy, 50 ml destylatu miareczkowano 0,1 n NaOH wobec fenolftaleiny. Pozostałe 100 ml destylatu silnie alkalizowano 33% etyloaminą i zatężano przez odparowanie do objętości mniejszej od 1 ml. W czasie zatężania prowadzono stałą kontrolę alkalizowania próby i w razie potrzeby dodawano dalsze ilości etyloaminy.

Zatężony roztwór w ilości kilku do kilkudziesięciu mikrolitrów, w zależności od przewidywanego stężenia kwasów, nanoszono na arkusze bibuły chromatograficznej WHATMAN Nr 4. W celu jakościowej identyfikacji badanych kwasów na każdy arkusz bibuły nanoszono również 40 µl roztworu standardowego zawierającego po około 64 µg kwasu octowego, propionowego, masłowego, walerianowego i kapronowego. Po wyschnięciu plam, prowadzono rozmywanie zstępujące w komorze chromatograficznej przez okres 10-12 godzin w temperaturze pokojowej.

Do chromatograficznego rozmywania soli etyloaminowych badanych kwasów stosowano n-butanel nasycony wodą z dodatkiem etyloaminy. Mieszanine rozmywającą przygotowywano przez zmieszanie 500 ml n-butanolu z 500 ml wody destylowanej. Po rozdzieleniu się faz. do 490 ml oddzielonej górnej warstwy butanolowej dodawano 10 ml 33,3% roztworu etyloaminy. Po zmieszanių i odstaniu, roztworem tym napełniano naczynie umieszczone w górnej części komory chromatograficznej. Noda nasycona butanclem i etyloaminą na dnie tej komory zapewniała należyte nawilgocenie. Po rozmyciu chromatograficznym, bibułe suszono w temperaturze pokojowej. Zanurzenie bibuły w alkoholowym roztworze czerwieni chlorofenolowej (0,2 g bawnika w 100 ml 95% etanolu) powodowało pojawienie się czerwonobrunatnych plam kwasów na tle żółto zabarwionej bibuły. Po pewnym czasie plamy kwasów zanikały, dlatego dla utrwalenia ich położenia i wielkości należało obrysowywać je ołówkiem po wybarwieniu i wyschnieciu.

Porównanie położenia plamy na chromatogramie z uniejscowieniem poszczególnych kwasów pochodzących z rozmycia chromatograficznego roztworu standardowego uzupełnione przez pomiar współczynnika R, umożliwiało jakościowe oznaczenie badanych kwasów. Wielkość plamy zależała od ilości kwasu naniesionego na bibułę. Stwierdzono dla kwasu octowego, propionowego, masłowego, walerianowego i kapronowego w ilości 10 - 240 µg zbliżoną, w przybliżeniu liniową zależność powierzchni plamy oznaczonej planimetrycznie od ilości naniesionego kwasu na bibułę. Wskutek trudności zatężenia badanego roztworu kwasów lotnych do małej objętości, dającej się oznaczyć w sposób ścisły, nie można było bez popełnienia dużych błędów pomiaru porównać wielkość powierzchni plamy z odpowiednią krzywą cechowania.

Dla uniknięcia tych błędów zastosowano przybliżone postępowanie, które polegało na oznaczeniu udziału procentowego powierzchni plam poszczególnych kwasów w sumie powierzchni plam pochodzących z rozmycia chromatograficznego badanej próby. Porównanie poszczególnych udziałów procentowych wykrywanych kwasów z ogólną ilością kwasów lotnych, oznaczoną destylacyjnie w przeliczeniu na kwas octowy; umożliwiało zorientowanie się w przybliżonym stężeniu poszczególnych kwasów w środowisku fermentacyjnym.

## Oznaczanie filtracyjności osadu

Przemianę struktury hydrofilnych, świeżych osadów organicznych w osady przefermentowane, które wykazują cechy hydrofobowe, można określić w sposób jakościowy i w sposób porównawczy na podstawie obserwacji zdolności odwadniania w czasie filtracji próżniowej.

Pomiary przeprowadzono w aparaturze do oznaczania filtracyjności [16]. Do lejka sitowego o średnicy 15 cm, zaopatrzonego w zwilżony sączek z bibuły Whatman Nr 1 wprowadzono 100 ml badanego osadu. W ciągu dwu minut doprowadzano do podciśnienia 300 mm Hg w aparaturze. W okresie 20-minutowej obserwacji notowano w odstępach minutowych zależność objętości filtratu od czasu. Wyniki tych oznaczeń służyły do wykreślania krzywych filtracyjności.

# PRZEBIEG DOŚWIADCZEŃ I WYNIKI BADAŃ

Fermentacja metanowa osadów organicznych metodą ciągłą

### Substraty i opis doświadczenia

Około 50 litrów zmieszanego osadu pochodzącego z osadnika wstępnego i wtórnego oczyszczalni po przesączeniu przez sito, przechowywano w małych pojemnikach w chłodni o temperaturze -17 do -13 C. W miarę potrzeby pojemniki przenoszono do pomieszczeń o temperaturze pokojowej, w której osad topniał. Osad taki przechowywano w lodówce w temperaturze + 4 C. W ten sposób można było zapewnić w przybliżeniu jednakowe własności osadu używanego do zasilania komór fermentacyjnych w czasie całego doświadczenia. Osad surowy analizowano dwukrotnie w ciągu tygodnia. Średnie wielkości uzyskanych wyników oznaczeń podaje tabela I.

Do zaszczepienia laboratoryjnych komór fermentacyjnych użyto osadu fermentującego z wydzielonej komory fermentacyjnej. która pracowała w warunkach mezofilowych w temperaturze 28 do 29°C. Do pięciu obrotowych, 10-litrowych komór fermentacyjnych wprowadzono 2 1 (Komora B i C) lub 3 1 (Komora A. D i E) fermentującego osadu i ewakuowano komory do podciśnienia 710 mm Hg. Tak przygotowane komory podlegały ciagłemu mieszaniu w rolkowym urządzeniu obracającym w termostacie o temperaturze 32 ± 1°C. Podciśnienie w komorach zanikało w czasie około 4 dni fermentacji. Po osiągnieciu niewielkiego nadciśnienia do trzech komór fermentacyjnych doprowadzono raz dziennie 5% (150 ml), 10% (200 ml) lub 15% (300 ml) świeżego osadu. W ten sposób uzyskano teoretyczny czas przebywania 20 dni w Komorze A, 10 dni w Komorze B i 6.7 dni w Komorze C. Masę fermentującą, równą objętości wyprowadzanego osadu, odciągano strzykawką z każdej komory fermentacyjnej tuż przed jej zasilaniem. Zasilanie rozpoczynano od 5% 🚄 dziennej wymiany osadu i stopniowo ulegało ono zwiększaniu do pożądanego stopnia wymiany zawartości komory. Od tej chwili rozpoczęto kontrolne analizy osadów i obserwacje nad przebiegiem wytwarzania gazu fermentacyjnego. Analize chromatograficzną gazu przeprowadzano codziennie przy pomocy aparatury z radioaktywną komorą jonizacyjną. Dobową szybkość wytwarzania gazu obliczano z pomiarów ciśnienia.

Tabela I

Oznaczenie	Osad	Osad przefermentowany							
	surowy	Komora A	Komora B	Komora C					
Sucha pozostałość (%)	3,14	2,89	3,50	3,54					
Sucha pozosta- łość lotna (%)	64,8	54,7	54,1	54,6					
Kwasy lotne (mg/l)	2050	915	1004	1207					
Alkaľiczność (mg/l)	1056	2111	2381	2014					
PH	5,1-5,5	6,8-6,9	6,8-6,9	6,8-6,9					

## Skład osadu surowego i przefermentowanego w komorach doświadczalnych o różnym czasie fermentacji

Dwie pozostałe komory fermentacyjne (D i E) zawierały 3 l fermentującego osadu użytego do zaszczepienia komór doświadczalnych. Nie podlegały one zasilaniu i służyły jako kontrola doświadczenia w warunkach metody zbiornikowej. Pobieranie 150 ml próbek osadu w odstępach 5 - 7-dniowych umożliwiało kontrolę analityczną przebiegu tej fermentacji periodycznej. Analiza chromatograficzna i codzienne pomiary ciśnienia gazu pozwalały na charakterystykę wytwarzania gazu fermentacyjnego.

Obserwacje przebiegały równocześnie we wszystkich komorach fermentacyjnych. Zmniejszało to wpływ przypadkowych zmian warunków doświadczenia. Badania nad ciągłym zasilaniem komór fermentacyjnych o różnym obciążeniu trwały około 32 dni. Przebieg fermentacji metanowej w komorach o 20, 10 i 6,7 dniach fermentacji podaje rys.7, 8 i 9. Wytwarzanie gazu fermentacyjnego w czasie zasilania komór o różnym obciążeniu porównano na rys.10 z przebiegiem produkcji gazu w kontrolnej komorze w warunkach fermentacji periodycznej.

Po tym kilkutygodniowym okresie fermentacji ciągłej wstrzymano zasilanie komory A, B i C. W czasie następnych 14 dni

45





o 20-dniowym czasie fermentacji



-

fermentacja przebiegała w warunkach metody zbiornikowej w sposób periodyczny, podobnie jak w kontrolnych Komorach D i E. W tym czasie obserwowano wpływ warunków poprzedniego zasilania komór na fermentację periodyczną, kończącą to doświadczenie. W tym okresie notowano dobową szybkość wytwarzania gazu (rys.11 i 12). Codzienne przeprowadzano analizę chromatograficzną gazu fermentacyjnego. Analizom kontrolnym poddano osad na początku i po zakończeniu próby zbiornikowej.

### Rozkład substancji organicznych

Osad surowy i osady przefermentowane pobierane z komór fermentacyjnych analizowano na zawartość kwasów lotnych, alkaliczność, suchą pozostałość ogólną i lotną oraz pH. Średnie wielkości wyników analiz wielokrotnie pobieranych prób podaje tabela I. Wysokie stężenie kwasów lotnych w osadzie surowym i niskie pH wskazywało na rozpoczęcie się pierwszej, kwaśnej fazy fermentacji jeszcze przed dostarczeniem osadu do laboratorium. Pewna część łatwo rozkładalnych substancji organicznych uległa degradacji do kwasów lotnych.

Nie było zasadniczej różnicy w składzie osadów z komór o różnym czasie fermentacji. Stwierdzono, że ogólna sucha pozostałość i steżenie kwasów lotnych zmniejsza się ze zwiekszeniem czasu fermentacji w komorze. Przefermentowany osad zawierał ponad 54% substancji lotnych suchej pozostałości i wykazywał pH około 6,8 do 6,9. Wyniki analiz przeprowadzonych w czasie badań graficznie podaje rys.7. 8 i 9 dla Komory A. B i C. Przebieg krzywych wskazuje, że nie było wyraźnej różnicy w zachowaniu się Komory A i B. Komora B otrzymywała dwukrotnie wiekszy ładunek osadu zasilającego w porównaniu z komorą fermentacyjną A. Powodowało to w przybliżeniu dwukrotnie większe wytwarzanie gazu przez Komore B. We wszystkich komorach odczyn wahał się w zwykłych konwencjonalnych granicach pH 6.8 - 7.2. Można było zauważyć, że Komora B wytwarzała nieco wyższą alkaliczność od dwu pozostakych komór fermentacyjnych.

Na podstawie wyników analiz (rys.7, 8 i 9) nie można stwierdzić, że komory fermentacyjne w ciągu 32 dni obserwacji osiągnęły stan pełnej równowagi ruchowej. Wydaje się jednak, że Komora A i B zachowywała się w sposób stabilny; natomiast Komora C była raczej nieustabilizowana. Wytwarzanie gazu w tej komorze podlegało hamowaniu wskutek przeciążenia.

#### Wytwarzanie gazu fermentacyjnego

Obserwacje kilku komór fermentacyjnych pracujących równocześnie w warunkach ciągłego zasilania, umożliwiła zebranie informacji dotyczących ilości wytwarzanego gazu zależnie od czasu fermentacji. Dobową szybkość wytwarzania gazu w okresie zasilania komór podaje rys.10. Te szybkości wytwarzania gazu porównano na wykresie z szybkością wytwarzania gazu w czasie fermentacji periodycznej (kontrolna Komora D i E) osadu, który służył do zaszczepienia i uruchomienia komór doświadczalnych.

Po upływie czasu, który był potrzebny na wymianę zaszczepiającego obadu przez osad zasilający, wprowadzony w określonych codziennych porcjach do komór, ilość wytwarzanego gazu można było uważać za charakterystyczną dla danej komory. Średnie wielkości dobowego wytwarzania gazu wynosiły 900, 1600 i 1350 ml na litr czynnej objętości komory o 20, 10 i 6,7 dniach fermentacji osadu (rys,10). Statystyczna ocena pomiarów gazowania wykazała, że przy współczynniku prawdopodobieństwa 0,95 błąd w powtarzalności tych wielkości wynosi - 5,5%.

Wyniki oberwacji gazowania wskazują na indywidualne różnice w zachowaniu się komór o różnym obciążeniu. Ws rzymanie codziennego zasilania komór i rozpoczecie fermentacji periodycznej w warunkach metody zbiornikowej spowodowało jeszcze wyraźniejsze zróżnicowanie zachowania się tych trzech komór fermentacyjnych. Doświadczenia te wskazuja, że Komora A i B. w której przebiegała zadowalająca fermentacja w okresie fermentacji ciagłej, natychmiast reaguje na wstrzymanie zasilania. Przejawia się to spadkiem dobowej szybkości wytwarzania gazu. W przypadku Komory C początkowa szybkość wytwarzania gazu utrzymywała się na stałym poziomie przez pięć dni od chwili rozpoczęcia próby zbiornikowej. Wytwarzanie gazu było w tym czasie w przybliżeniu równe produkcji gazu w okresie zasilania świeżym osadem (rys.10) po czym dobowa szybkość wytwarzania gazu zmniejszyła się. Wpływ wielkości zasilania, poprzedzającego okres fermentacji periodycznej na szybkość dobowego wytwarzania gazu podaje rys.12. Obserwacje te wskazują, że w czasie zasilania Komora C uległa przeciążeniu. Substancje organiczne z substratów lub produkty pośrednie ich degradacji uległy w jakiś sposób odłożeniu w fermentujacym osadzie.



Rys. 11. Ogćlne wytwarzanie gazu fermentacyjnego wyznaczone doświadczalnic i teoretycznie w próbie zbiornikowej po okresie ciągłego zasilania komór fermentacyjnych



Rys. 12. Doświadczalne i teoretyczne szybkości wytwarzania gazu w próbie zbiornikowej po okresie ciąglego zasilania komór fermentacyjnych

Wartości liczbowe, charakteryzujące kinetykę wytwarzania gazu w czasie 14-dniowej fermentacji periodycznej Komory A B i C podaje tabela VI.

Przeprowadzono próbę porównania doświadczalnych krzywych ogólnego wytwarzania gazu i krzywych określających zmiany szybkości gazowania – z przebiegiem teoretycznych krzywych obu alternatywnych postaci równania reakcji pierwszego rzędu. Obliczona wielkość stałej szybkości reakcji k wynosiła około 0,3. Poprawność tego obliczenia dało się potwierdzić przez wykreślenie teoretycznych krzywych gazowania wyznaczonych przez równanie 15.

Krzywe te przebiegały przez punkty otrzymane doświadczalnie dla nieprzeciażonych Komór A i B (rys.11). Natomiast teoretyczne krzywe wynikające z równania 15 (k = 0,3 lub k = 0,19) nie pokrywały się z przebiegiem doświadczalnych wielkości gazowania przeciażonej Komory C. Krzywe teoretyczne leżały po obu stronach przebiegu tych punktów. Okazało sie jednak, że krzywa eksponencjalna, która odpowiada Równaniu 52 dla k = 0.3 wystarczająco ściśle spełnia przebieg doświadczalnie stwierdzonej produkcji gazu przez komore C. Ogólna ilość wytworzonego gazu G w równaniu 52 należy obliczyć z różnicy całkowitej ilości gazu wyprodukowanego przez przeciążoną Komorę C i ilości gazu utworzonego w okresie stałej szybkości gazowania w pierwszym okresie fermentacji t (nównanie 51, tabela VI). W tym czasie /t = 5 dni) wytwarzanie gazu jest podporządkowane reakcji zerowego rzędu określonej przez równanie 44. Dalsza fermentacja przebiega zgodnie z reakcja pierwszego rzedu, którą określa równanie 52.

Teoretyczną krzywą gazowania przeciążonej komory wyznaczają dwa następujące po sobie równania reakcji zerowego i pierwszego rzędu (równanie 44 i 52). Krzywa ta odłożona na ryś.11 przebiega zgodnie z doświadczalnie stwierdzonym wytwarzaniem gazu przez Komorę C.

Zjawisko złożonego przebiegu wytwarzania gazu przez przeciążoną Komorę C w czasie fermentacji periodycznej można wyraźniej uwidocznić przez śledzenie zmian dobowej szybkości gazowania. Doświadczalnie stwierdzoną szybkość produkcji gazu przez komory doświadczalne porównano na rys.12 z przebiegiem teoretycznych krzywych wygaszania. Zmiany szybkości fermentacji w nieprzeciążonej Komorze A i B wykazują od początku obserwacji regularność spełniającą równanie kinetyczne pierwszego rzędu (równanie 18). Natomiast szybkość wytwarzania gazu przez przeciążoną Komorę C można przedstawić w początkowym przebiegu fermentacji ( $t_0 = 5$  dni) przez poziomy odcinek prostej równoległej do osi czasu. Odpowiada to stałej szybkości wytwarzania gazu w reakcji zerowego rzędu (równanie 45). Dalsza fermentacja przebiega zgodnie z krzywą wygaszania podporządkowaną równaniu 53 dla reakcji pierwszego rzędu (rys.12).

### Skład gazu fermentacyjnego

Zawartość metanu, dwutlenku węgla i azotu w gazie wytwarzanym przez komory fermentacyjne o różnym obciążeniu oznaczone przy pomocy chromatografii gazowej. Typową serię krzywych zarejestrowanych w wyniku analizy chromatograficznej gazu fermentacyjnego w czasie obserwacji wstępnych jednej z komór podaje rys.4. Nie stwierdzono wyraźnych różnic w składzie gazu pochodzącego z różnych komór fermentacyjnych. Gaz zawierał metan w stężeniu 70 do 79% (obj.), dwutlenek węgla w ilości 21 do 30% oraz śladowe ilości azotu. Różnice w składzie gazu mogły zależeć od błędów doświadczalnych. Stosunkowo niewielkie wahania zawartości dwutlenku węgla w gazie wytwarzanym przez Komorę A, B i C oraz komorę kontrolną - wykazuje rys.13.

Azot w gazie fermentacyjnym mógł pochodzić z przedostawania się powietrza do komór. Rysunek 4 wskazuje na widoczną zawartość azotu w gazie w początkowym okresie fermentacji. W dalszym przebiegu procesu azot zanikał do ilości śladowych wskutek rozcieńczenia i wypłukania przez gaz fermentacyjny.

## Filtracyjność osadów

łatwość z jaką osad surowy lub przefermentowany może ulegać odwadnianiu oznaczano przez pomiary filtracyjności. Obserwowano wyraźne zmiany filtracyjności w czasie przebiegu fermentacji. Rysunek 14 podaje serię krzywych, które można uważać za reprezentatywne w tych badaniach. W tej serii filtracyjność osadu pobranego z Komory A, B i C w dziesiątym dniu fermentacji ciągłej porównuje się z filtracyjnością osadu świeżego. Komora A i B wytwarzała osad przefermentowany o podobnej filtracyjności; natomiast filtracyjność osadu z Komory C była znacznie niższa. Wskazuje to na niedostateczne zniszczenie struktury hydrofilnej wskutek zbyt krótkiego czasu przebywania fermentującego osadu w Komorze C. Csad surowy wykazywał również ubogie własności odwadniające. Większość obserwacji filtracyjności przebiegała zgodnie z tymi



Rys. 13. Zawartość CO<sub>2</sub> w gazie fermentacyjnym w czasie fermentacji ciąglej osadów organicznych



Rys. 14. Filtracyjność osadu surowego i osadów przefermentowanych w komorach o różnym obciążeniu

.

spostrzeżeniami. Ogólnie dało się zauważyć, że rozbieżne wyniki pomiarów filtracyjności otrzymywano w okresie poprzedzającym stabilizację warunków pracy komór fermentacyjnych.

# Fermentacja metanowa osadów organicznych w warunkach periodycznych

## Substraty i opis doświadczenia

Osad organiczny użyty w tych doświadczeniach pochodził z osadników wstępnych oczyszczalni. Do zaszczepienia laboratoryjnych komór fermentacyjnych zastosowano osad technicznie przefermentowany z mezofilowej wydzielonej komory fermentacyjnej. Pobrane osady użyto po przecedzeniu przez sito.

Jako komory laboratoryjne służyły 15 l lub 10 l butle szklane z tubusem dolnym, który umożliwiał pobór prób masy fermentującej. Komory były zaopatrzone w zawór z mięsistej gumy do obserwacji wytwarzania gazu. Komory podlegały jednokrotnemu zmieszaniu w ciągu doby przez wstrząsanie i były one umieszczone w termostacie o temperaturze 32 ± 1°C.

W podanych warunkach obserwowano fermentację periodyczną osadów w 15 l Komorze F i G zawierającej 3 l osadu zmieszanego z równych objętości osadu surowego i technicznie przefermentowanego. W ten sposób wywoływano przeciążenie komory fermentacyjnej w warunkach metody zbiornikowej. Kontrolę tego doświadczenia prowadzono w 10 l Komorze H, która zawierała 3 l osadu technicznie przefermentowanego, użytego do zaszczepienia komór doświadczalnych. Powietrze zawarte w komorach usuwano w chwili rozpoczęcia fermentacji przez przemycie gazem fermentacyjnym.

Przebieg mineralizacji substancji organicznych fermentujących osadów obserwowano na podstawie codziennych obserwacji wytwarzania gazu i analiz chemicznych prowadzonych w odstępach kilkudniowych. Do tych badań analitycznych pobierano około 200 ml masy fermentującej. Zmniejszyło to w końcowej fazie doświadczenia pierwotną objętość substratów o 2/3. Obserwacjom poddano również dynamikę przemian, którym podlegają niższe kwasy tłuszczowe - produkty pośrednie beztlenowego rozkładu złożonych substancji organicznych. W tym celu zastosowano chromatografię bibułową zagęszczonych destylatów fermentującej masy. Prowadzonc identyfikację poszczególnych kwasów lotnych i ich przybliżony względny skład ilościowy. Zmiany składu gazu fermentacyjnego śledzono przy pomocy chromatografii gazowej zmodyfikowaną metodą JANAKa.

Przebieg periodycznej fermentacji metanowej osadu surowego zmieszanego z osadem technicznie przefermentowanym w Komorze F i G podaje rys.15 i 16. Zachowanie się Komory H w czasie końcowego rozkładu osadu technicznie przefermentowanego przedstawia rys.17.

# Rozkład osadów organicznych i produkty pośrednie fermentacji metanowej

Osad technicznie przefermentowany i zmieszany z równą objetoscia surowego osadu podlegał fermentacji metanowej w prćbie zbiornikowej. W czasie kilkutygodniowej fermentacji obserwowano stały, powolny wzrost alkaliczności i pH oraz powolny, prawie liniowy spadek suchej pozostałości lotnej osadów (rys.15, 16 i 17). Wskazuje to na beztlenową destrukcję złożonych substancji organicznych osadu. Zmiany stężenia lotnych kwasów tłuszczowych w masie fermentującej wskazują na rolę tych związków jako pośrednich produktów rozkładu. Steżenie kwasów lotnych maleje w miare wytwarzania gazu fermentacyjnego. Na tej podstawie trudno jednak zorientować się w dynamice rozkładu beztlenowego. W tym celu prowadzono w odstepach kilkudniowych chromatograficzne badanie składu kwasów tłuszczowych w masie fermentującej. Dynamikę chroma tograficznie stwierdzonych zmian tego składu w czasie fermentacji jednej z prób osadu zmieszenego wykazuje rys.18. W tym okresie stężenie kwasów lotnych spadało prawie liniowo z 928 do 35 mg/l. Stwierdzone chromatograficznie ilościowe zmiany składu kwasów tłuszczowych, powstających w czasie fermentacji osadów podaje rys.19.

Badania chromatograficzne składu kwasów lotnych wykazały obecność kwasu octowego, propionowego i masłowego w osadzie surowym, technicznie przefermentowanym i w osadzie zmieszanym, użytym w tych badaniach. Z obserwacji wynika, że zawartość kwasu masłowego nieznacznie rośnie w początkowym stadium fermentacji osadu zmieszanego, wskutek degradacji złożonych substancji organicznych w kwasowej fazie fermentacji. Równocześnie jednak maleje w sposób w przybliżeniu stały ogólne stężenie kwasów lotnych. Z kolei zawartość kwasu masłowego w mieszaninie zaczyna maleć. Wzrasta natomiast udział procentowy kwasu octowego, który w początkowym stadium fermentacji odpowiadał w przybliżeniu stężeniu kwasu masłowego.



Rys. 15. Przebieg periodycznej fermentacji metanowej w Komorze F zawierającej osad surowy zmieszany z równą objętością osadu technicznie przefermentowanego



Rys. 16. Przebieg periodycznej fermentacji metanowej w Komorze G zawierającej osad surowy zmieszany z równą objętością osadu technicznie przefermentowanego



Rys. 17. Przebieg periodycznej fermentacji metanowej w Komorze H zawierającej osad technicznie przefermentowany



Rys. 18. Dynamika zmian składu kwasów lotnych w chromatograficznym badaniu periodycznej fermentacji osadu surowego zmieszanego z osadem technicznie przefermentowanym



Rys. 19. Zmiany składu kwasów lotnych w czasie periodycznej fermentacji osadu surowego zmieszanego z osadem technicznie przefermentowanym

Kwas octowy był wykrywalny nawet w końcowym stadium wytwarzania gazu. Udział procentowy kwasu propionowego systematycznie malał i kwas ten zanikał już po kilkunastu dniach fermentacji.

#### Wytwarzanie gazu fermentacyjnego

Analiza chromatograficzna nie wykazała istotnych różnic w składzie gazu fermentacyjnego wytwarzanego przez Komorę F, G i H w czasie próby zbiornikowej. W końcowych stadiach fermentacji gaz ten zawierał około 71% metanu, 27% dwutlenku węgla oraz około 2% azotu, który był składnikiem przypadkowym.

Pomiary ciśnienia umożliwiły śledzenie wytwarzania gazu przez komory fermentacyjne. Komora F i G zawierała osad surowy zmieszany z równą objętością osadu fermentującego. Te komory były przeciążone w początkowym okresie fermentacji periodycznej. Dobowe porcje gazu wytwarzane w tym okresie były w przybliżeniu stałe w ciągu 10 dni fermentacji (t ) po czym szybkość produkcji gazu malała (rys.15 i 16). Komora H natomiast wykazywała stały spadek szybkości wytwarzania gazu od chwili rozpoczęcia próby zbiornikowej z osadem technicznie przefermentowanym (rys.17).

Liczbową charakterystykę kinetyki fermentacji metanowej osadów organicznych w próbie zbiornikowej podaje tabela VI. Przeprowadzono próbę porównania doświadczalnych krzywych wytwarzania gazu i zmian szybkości gazowania - z przebiegiem krzywych teoretycznych (rys.20 i 21). Obliczona wielkość stałej szybkości reakcji k dla okresu fermentacji podporządkowanego kinetyce pierwszego rzędu, wynosiła około 0,1. Taką prawidłowość, którą określa równanie 15 wykazywało wytwarzanie gazu przez Komorę M z osadem technicznie prżefermentowanym.

Fermentacja przeciążonych Komór F i G miała przebieg bardziej złożony, który w pierwszym okresie procesu (t) cechował się stałą szybkością wytwarzania gazu. Wytwarzanie gazu przez te komory określają dwa następujące po sobie równania kinetyczne zerowego (równanie 44) i pierwszego (równanie 52) rzędu. Zgodność takiego przebiegu, wyznaczonego teoretycznie, ze średnimi wartościami wytwarzania gazu przez Komorę F i G z osadem zmieszanym podaje rys.20.

Złożony przebieg wytwarzania gazu przez przeciążone Komory F i G, które zawierały duży ładunek substancji organicznych w osadzie zmieszanym, wyraźnie uwidacznia się na rys.21,



1 1

Rys. 20. Ogólne wytwarzanie gazu fermentacyjnego wyznaczone doświadczalnie i teoretycznie w czasie periodycznej fermentacji osadu surowego zmieszanego z równą objętością osadu technicznie przefermentowanego



Rys. 21. Doświadczalne i teoretyczne szybkości wytwarzania gazu w czasie periodycznej fermentacji osadu surowego zmieszanego z równą objętością osadu technicznie przefermentowanego

Doświadczalnie stwierdzone średnie dobowe szybkości produkcji gazu przez obie przeciążone komory oraz wytwarzanie gazu w kontrolnej Komorze H, porównano z przebiegiem teoretycznych krzywych wygaszania. Szybkość wytwarzania gazu w Komorze H podporządkowała się równaniu pierwszego rzędu od początku obserwacji (równanie 18).

Wytwarzanie gazu przez Komory F i G przeciążone osadem zmieszanym można przedstawić w początkowym okresie fermentacji (t = 10 dni) przez poziomy odcinek prostej, równoległej do osi czasu (równanie 45). Przebieg ten odpowiada równaniu żerowego rzędu. Dalszy proces fermentacji jest podporządkowany krzywej wygaszania, spełniającej równanie kinetyczne pierwszego rzędu (równanie 53).

## Fermentacja metanowa kwasu masłowego i kapronowego w warunkach periodycznych

## Substraty i opis doświadczenia

W metenogenezie, która jest drugą fazą fermentacji metanowej, następuje rozkład niższych kwasów tłuszczowych. Tworzy się metan i dwutlenek węgla. Równocześnie jednak powinny powstawać produkty  $\beta$ - oksydacji tych kwasów [35, 36]. Poddamo bądaniu kwasy tłuszczowe o parzystej ilości atomów węgla w drobinie, spotykane w środowisku fermentacji metanowej.

Substratem badania było około 1,7 g kwasu masłowego lub kapronowego, wprowadzonego do 1 l nadosadowej cieczy fermentacyjnej. Użycie przefermentowanej cieczy nadosadowej zapewniało obecność odpowiedniej mikroflory, przy równoczesnym wyeliminowaniu osadu jako źródła kwasów tłuszczowych, wytwarzanych w fermentacji.

Ciecz nadosadową uzyskano przez zdekantowanie osadzonego, technicznie przefermentowanego osadu z mezofilnej komory fermentacyjnej. Badania prowadzono w 3 l butlach zawierających 1,0 l przefermentowanej cieczy nadosadowej. Komory były zaopatrzone w tubusy dolne, które umożliwiły pobór prób fermentującej cieczy. Zawór z miesistej gumy pozwalał na obserwacje wytwarzania gazu. Powietrze zawarte z komorach usuwano w chwili rozpoczęcia doświadczenia przez przemycie gazem fermentacyjnym. Komory podlegały jednokrotnemu zmieszaniu w ciągu doby przez wstrząśnięcie. Fermentacja przebiegała w termostacie o temperaturze 32 - 1°C. Po dwu dniach fermentacji wytwarzanie gazu spadało do wielkości szczątkowej. Umożliwiało to rozpoczęcie zasadniczych obserwacji. Do Komory J wprowadzono 1,76 g kwasu masłowego, zaś do Komory K 1,74 g kwasu kapronowego. Trzecia Komora L stanowiła kontrolę doświadczenia i zawierała przefermentowaną ciecz nadosadową bez dodatku badanych substratów. Przebieg rozkładu kwasów organicznych obserwowano na podstawie codziennych oznaczeń wytwarzania gazu i analiz chemicznych, które przeprowadzono w odstępach kilkudniowych. Do tych badań analitycznych pobierano około 120 ml cieczy przy pomocy strzykawki lekarskiej. Prowadzono również identyfikację poszczególnych kwasów lotnych i ich przybliżony, względny skład ilościowy. Zmiany składu fermentacyjnego badano przy pomocy chromatografii gazowej zmodyfikowaną metodą JANAKa.

Nyniki około dwutygodniowych badań fermentacji metanowej kwasu masłowego (Komora J) i kapronowego (Komora K) dodanego do przefermentowanej cięczy nadosadowej podaje rys.22 i 24. Przebieg periodycznej fermentacji metanowej cięczy nadosadowej (Komora L) przedstawia rys.26.

## Rozkład beztlenowy kwasu masłowego i kapronowego

Badania nad rozkładem kwasów tłuszczowych o parzystych atomach węgla przeprowadzono na przykładzie fermentacji metanowej kwasu masłowego i kaprohowego. Wprowadzano te kwasy do fermentującej cieczy nadosadowej w ilości około 1,7 g/l. Konwencjonalne metody analizy okazały się nieprzydatne do charakterystyki takiego rozkładu wskutek małej czułości. Istotnym zmianom podlegało stężenie kwasów lotnych oraz wytwarzanie gazu.

Stwierdzone chromatograficznie zmiany składu i stężenia kwasów lotnych w czasie degradacji beztlenowej kwasu masłowego i kapronowego podaje rys.23 i 25. Zmiany składu kwasów lotnych w czasie periodycznej fermentacji cieczy nadosadowej przedstawia rys.27. Te badania chromatograficzne wykazały obecność kwasu octowego, propionowego i masłowego w świeżo pobranej, przefermentowanej cieczy nadosadowej (rys.27). W ciągu określonego czasu fermentacji stężenie kwasu masłowego i octowego było zbliżone, następnie stężenie kwasu masłowego malało; wzrastał natomiast udział procentowy kwasu octowego w składzie kwasów lotnych. Wskazuje to na przemiane kwasu masłowego w octowy przy równoczesnej metanogenezie, która była związana z wytwarzaniem gazu fermentacyjnego. Kwas propionowy znikał w ciągu pierwszych dni fermentacji. Opisany przebieg destrukcji naturalnych składników kwasów lotnych cieczy nadosadowej był zbliżony do stwierdzonych



Rys. 22. Przebieg fermentacji metanowej 1,76 g/l kwasu masłowego dodanego do przefermentowanej cieczy nadosadowej w Komorze J



Rys. 23. Zmiany składu kwasów lotnych w czasie fermentacji 1,76 g/l kwasu masłowego dodanego do przefermentowanej cieczy nadosadowej



Rys. 24. Przebieg fermentacji metanowej 1,74 g/l kwasu kapronowego dodanego do przefermentowanej cieczy nadosadowej w Komorze K



Rys. 25. Zmiany składu kwasów lotnych w czasie fermentacji 1,74 g/l kwasu kapronowego dodanego do przefermentowanej cieczy nadosadowej



Rys. 26. Przebieg periodycznej fermentacji metanowej cieczy nadosadowej w Komorze L



Rys. 27. Zmiany składu kwasów lotnych w czasie periodycznej fermentacji cieczy nadosadowej

zmian produktów pośrednich rozkładu beztlenowego osadów organicznych (rys.19).

Wyniki badań chromatograficznych wskazują, że kwas kapronowy rozkładał się z pośrednim tworzeniem kwasu masłowego i octowego (rys.25). Kwas masłowy dawał kwas octowy jako pośredni produkt rozkładu w metanogenezie (rys.23).

### Wytwarzanie gazu fermentacyjnego

Stwierdzony chromatograficznie skład gazu fermentacyjnego w końcowych stadiach fermentacji był zbliżony w przypadku obu badanych kwasów tłuszczowych. Gaz fermentacyjny zawierał około 65% metanu, 25% dwutlenku węgla oraz 10% azotu, który był składnikiem przypadkowym.

Codziemie pomiary manometryczne umożliwiły badanie kinetyki wytwarzania gazu fermentacyjnego. Komora J i Komora K zawierała po około 1.7 g/l kwasu masłowego i kapronowego. Ilość ta była kilkakrotnie większa od dawki, którą w doświadczeniach wstępnych udawało się rozłożyć w ciągu jednego dnia fermentacji. Należało wiec uważać obie te komory za przeciażone w początkowym okresie fermentacji. Dobowe porcje gazu wytwarzane w tym okresie można było uznać za praktycznie stałe w ciągu 4 do 5 dni fermentacji. W dalszym przebiegu procesu szybkość produkcji gazu widocznie malała (rys.22 i 24). Komora L wykazywała stały spadek szybkości wytwarzania gazu w całym okresie próby zbiornikowej z fermentującą cieczą nadosadową (rys.26). Wartości liczbowe charakteryzujące kinetyke fermentacji kwasu masłowego i kapronowego podaje tubela VI. Obliczona wielkość stałej szybkości reakcji pierwszego rzedu wytwarzania gazu fermentacyjnego wynosiła w tej serii doświadczeń około 0.1.

Rozkład kwasów tłuszczowych znajdujących się w fermentującej cieczy nadosadowej Komory L przebiega zgodnie z kinetyką reakcji pierwszego rzędu. Wytwarzanie gazu przez tę komorę określa równanie 15 (rys.28). Krzywa teoretyczna określająca produkcję gazu przez komory przeciążone dużym ładunkiem kwasu masłowego (Komora J) lub kapronowego (Komora K) - ma przebieg bardziej złożony. W początkowym okresie fermentacji (t\_) proces ma charakter reakcji zerowego rzędu, który określa równanie 44. Dalsza fermentacja podlega kinetyce procesu pierwszorzędowego zgodnie z tównaniem 53. Ogólną ilość gazu G w tym równaniu określa równanie 51 jako różnicę całkowitej ilości gazu i ilości wytworzonej w czasie (t\_) reakcji zerowego rzędu. Doświadczalnie wyznaczone zmiany szybkości wytwarzania gazu przez Komorę J, K i L porównano na rys.29 z przebiegiem krzywych teoretycznych. Szybkość wytwarzania gazu w kontrolnej Komorze L przebiegała zgodnie z równaniem krzywej wygaszania dla reakcji pierwszego rzędu (równanie 18) w ciągu całego okresu fermentacji. Szybkość wytwarzania gazu z rozkładu dużych ładunków kwasu masłowego lub kapronowego dawała się określić w początkowym czasie fermentacji przez poziomy odcinek prostej, równoległej do osi czasu. Odpowiadało to procesowi o kinetyce zerowego rzędu określonemu przez równanie 44. W dalszym przebiegu proces fermentacji metanowej badanych kwasów przebiega z szybkością podporządkowaną krzywej wygaszania zgodnie z równaniem 53.

> Kinetyka fermentacji metanowej sześciu niższych kwasów tłuszczowych

### Substraty i przebieg doświadczenia

Wytwarzanie gazu fermentacyjnego z rozkładu złożonych substancji osadów organicznych przebiegało zgodnie z równaniem 52 i 53 o stałej k szybkości reakcji równej około 0,1. Taką wartość obserwowano w warunkach fermentacji periodycznej w komorach nie przeciążonych. Interesujący był wpływ wytwarzania gazu z półproduktów rozkładu beztlenowego na ogólną szybkość fermentacji metanowej. W tym celu należało zbadać szybkość rozkładu poszczególnych niższych kwasów alifatycznych przez mieszane populacji drobnoustrojów fermentacji metanowej. Na uwagę zasługiwał również wpływ wyższych stężeń tych związków pośrednich na kinetykę fermentacji.

W doświadczeniach użyto trzynastu 3 l butli szklanych z tubusem dolnym. Zawór umieszczony w korku zanykającym butle, umożliwiał pomiary ciśnienia gazu fermentacyjnego. Drugi mięsisty zawór gumowy, znajdujący się w tubusie dolnym, pozwalał na pobór cieczy lub na wprowadzenie substratów strzykawką lekarską, bez konieczności otwierania komór fermentacyjnych. Komory te zawierały po 0,5 l cieczy nadosadowej, otrzymanej przez dekantację osadu technicznie przefermentowanego w warunkach mezofilnych. Zastosowanie cieczy nadosadowej umożliwiało łatwe zubożenie układu w naturalne, pośrednie produkty fermentacji. Zapewniało to obecność czynnego zespołu drobnoustrojów, zdolnego do fermentacji meta-



Rys. 28. Ogólne wytwarzanie gazu fermentacyjnego wyznaczone doświadczalnie i teoretycznie w czasie periodycznej fermentacji około 1,7 g/l kwasu masłowego i kapronowego w przefermentowanej cieczy nadosadowej



Rys. 29. Doświadczalne i teoretyczne szybkości wytwarzania gazu w czasie periodycznej fermentacji około 1,7 g/l kwasu masłowego i kapronowego w przefermentowanej cieczy nadosadowej

nowej wprowadzonych substratów. Powietrze zalegające komory doświadczalne wyparto gazowym dwutlenkiem węgla. Mieszanie tych komór następowało przez kilkakrotne wstrząsanie w ciągu doby. Fermentacja zachodziła w termostacie o temperaturze 32 - 1°C.

#### Tabela II

Chemiczna charakterystyka cieczy nadosadowej fermentującej z dodatkiem niższych kwasów tłuszczowych

		Oznaczenie					
Rodzaj substratu	Nr Komo- ry	Sucha pozo <u>-</u> stałość %	Sucha pozo- stałoś lotna	Kwasy lotne mg/l	Alka- licz- ność mg/l	рН	
			%				
Ciecz nadosadowa analiza wstępna	-	0,30	67	172	2870	7,6	
Ciecz z dodatkiem kwasu mrówkowego	1 2	0,29	56	312 330	7940 8130	7,8 7,6	
Ciecz z dodatkiem kwasu octowego	3 4	0,28	54 -	250	5540	7,7	
Ciecz z dodatkiem kwasu propionowego	56	0,28	57 -	257 302	5300 5300	7,4	
Ciecz z dodatkiem kwasu masłowego	7 8	0,29	- 48	335 425	5250 5110	7,3 7,4	
Ciecz z dodatkiem kwasu walerianowego	9 10	0,28	55 -	617 514	2980 2840	7,2	
Ciecz z dodatkiem kwasu kapronowego	11 12	0.28	<b>-</b> 53	400 421	3190 3280	7,2	
Ciecz nadosadowa w komorze kontrolnej	13	0,26	45	220	3300	7,6	

Beztlenowy rozkład niższych kwasów alifatycznych przebiegał szybko. Aby śledzić kinetykę tego zjawiska, pomiary ciśnienia gazu należało prowadzić w odstępach czterogodzinnych. W końcowej fazie obserwacji, gdy ilości wytwarzanego gazu były już niewielkie, czas pomiędzy pomiarami można było zwiększyć do 12 godzin. Zaniechano chromatograficzną analizę gazu fermentacyjnego, nie dającą istotnych informacji w tej serii badań. Przeprowadzono natomiast chemiczną charakterystykę zmian składu cieczy nadosadowej, które nastąpiły wskutek rozkładu dodawanych kwasów organicznych (tabela II).



Rys. 30. Kinetyka wytwarzania gazu fermentacyjnego podczas rozkładu kwasu mrówkowego







Rys. 32. Kinetyka wytwarzania gazu fermentacyjnego podczas rozkładu kwasu propionowego



Rys. 33. Kinetyka wytwarzania gazu fermentacyjnego podczas rozkładu kwasu masłowego

69



Rys. 34. Kinetyka wytwarzania gazu fermentacyjnego podczas rozkładu kwasu walerianowego



Rys. 35. Kinetyka wytwarzania gazu fermentacyjnego podczas rozkładu kwasu kapronowego

Rozkład poszczególnych kwasów tłuszczowych obserwowano w dwu równolegie prowadzonych komorach doświadczalnych. Wielkości stosowanych dawek kwasów wybrano na podstawie kilku obserwacji wstępnych stwierdzających możliwości ich biochemicznego rozkładu w czasie 1 do 2 dni. Kwas mrówkowy (Komora 1 i 2), kwas octowy (Komora 3 i 4) oraz kwas propionowy (Komora 5 i 6) wprowadzano w ilości 1,0 g/l. Komora 7 i 8 otrzymywała dawkę 1,2 g/l kwasu masłowego. Kwas walerianowy (Komora 9 i 10) i kwas kapronowy (Komora 11 i 12) dawkowano w ilości 0,8 g/l. Dodatkowa Komora 13 zawierała przefermentowaną ciecz nadosadową i służyła jako kontrola doświadczenia. Aby uniknąć zakwaszenia środowiska, stosowano kwasy w postaci soli amonowych, otrzymanych przez zobojętnienie amoniaku do pH około 6.

Przed zasadniczym doświadczeniem uaktywniono środowisko fermentacyjne przez kilkakrotne przefermentowanie podanych porcji kwasów. Obserwacje rozkładu podanych dawek kwasów tłuszczowych trwały około 70 godzin. Po zakończeniu tych doświadczeń, przeprowadzono drugą serię trzydniowych badań fermentacji metanowej dwukrotnie większej dozy niższych kwasów tłuszczowych. Doświadczenia wykazały, że ilości gazu, wytwarzane przez kontrolną komorę z przefermentowną cieczą nadosadową – są niewielkie i można je było zaniedbać w interpretacji wyników beztlenowego rozkładu kwasów organicznych.

### Wytwarzanie gazu fermentacyjnego

Pomiary manometryczne wytwarzania gazu w czasie rozkładu kwasów tłuszczowych wprowadzonych do cieczy nadosadowej umożliwiły śledzenie kinetyki fermentacji metanowej tych substratów. Interpretację wyników oparto na średnich arytmetycznych pomiarów zachowania się dwu równoległe prowadzonych komór doświadczalnych.

Kinetykę wytwarzania gazu w czasie trzydniowej fermentacji 1,0 g i 2,0 g porcji kwasu mrówkowego, octowego i propionowego podaje rys.30, 31 i 32. Rozkład 1,2 g i 2,4 g kwasu masłowego przedstawia rys.33. Przebieg wytwarzania gazu z rozkładu 0,8 g i 1,6 g kwasu walerianowego i kapronowego obrazuje rys.34 i 35. Liczby określające kinetykę rozkładu tych kwasów podaje tabela VI.

Stwierdzono, że w przypadku kwasu mrówkowego i octowego, układ był zdolny do przetworzenia substratów w gaz fermentacyjny bez objawów zaburzeń. Punkty doświadczalne przebiegały zgodnie z krzywą teoretyczną, wyznaczoną przez równanie kine-
tyczne pierwszego rzędu (równanie 15) ze stałą szybkością reakcji k równą około 0,1. W rozkładzie pozostałych niższych kwasów tłuszczowych zaobserwowano przeciążenie komór, które przejawiało się w stałej szybkości wytwarzania gazu, utrzymującej się przez określony czas fermentacji t . Przeciążenie to trwało przez 4 do 6 godzin dla pojedynczej i 16 do 20 godzin dla dwukrotnie większej dawki badanych kwasów (rys.32, 33, 34 i 35). Wytwarzanie gazu w tym okresie (t ) przebiegało zgodnie z równaniem 44 dla reakcji zerowego rzędu. Uzyskano dużą zgodność przebiegu eksponencjalnych krzywych równania pierwszego rzędu (równanie 52) z układem punktów doświadczalnych w końcowym okresie fermentacji kwasów tłuszczowych. Obliczona wartość współczynnika "k" szybkości reakcji rozkładu badanych kwasów tłuszczowych była rzędu 0,1 (tabela VI).

Tabela III

### Obliczone i doświadczalne stwierdzone ilości gazu fermentacyjnego z rozkładu niższych kwasów tłuszczowych

		Ilości gazu fermentacyjnego			
10 3 10	Daw-	Obliczone Doświad-		Doświad-	
Kwas	ka	z wzoru	czalne	czalne	
tłuszczowy	kwa-	BUSWELLa	wielkości	wielkości	
	su	ml/g	średnie	średnie	
and the second second	g/1		ml/g	% ilości	
				obliczonej	
Kwag mrówkowy	1,00	487	400	82	
IT OT LOWY	2,00	974	926	95	
Kwas octown	1,00	747	780	104	
itinas octony	2.10	1570	1836	117	
Kwas propionowa	1,00	908	680	75	
iter proprotony	2.00	1816	1000	55	
16	1.20	1220	880	72	
kwas masłowy	2.40	2440	1390	57	
7	0,80	880	. 740	84	
was waterianowy	1,60	1760	1000	57	
Kung konnongun	0,80	928	720	78	
was kapronowy	1.60	1856	1050	57	



Rys. 36. Doświadczalne i teoretyczne szybkości wytwarzania gazu fermentacyjnego w czasie rozkładu kwasu mrówkowego, octowego i propionowego



Rys. 37. Doświadczalne i teoretyczne szybkości wytwarzania gazu fermentacyjnego w czasie rozkładu kwasu masłowego, walerianowego i kapronowego

Przebieg szybkości wytwarzania gazu w czasie przeciążenia układu przez duże porcje kwasu propionowego, masłowego,. walerianowego i kapronowego - był złożony. Rys.36 i 37 wskazuje, że wskutek tego przeciążenia w początkowej fazie procesu występuje okres stałej szybkości gazowania, który można opisać przez odcinek prostej, równoległej od osi czasu (równanie 45). Dalszy przebieg procesu cechuje się zanikiem szybkości wytwarzania gazu, który przebiega zgodnie z krzywą wygaszania podporządkowaną równaniu 53. Rozkład zastosowanych dawek kwasu mrówkowego i octowego był bardziej prawidłowy. Fermentacja metanowa tych substratów podlegała kinetyce reakcji pierwszego rzędu w czasie całej obserwacji (równanie 18).

Wydawało się interesujące porównanie doświadczalnie stwierdzonych objętości gazu fermentacyjnego z rozkładu sześciu niższych kwasów tłuszczowych - z ilościami gazu, które dadzą się przewidzieć na podstawie stechiometrycznego wzoru BUSWELLA [6]. Porównanie tych wielkości dla pojedynczej i dwukrotnie większej dawki substratów podaje tabela III. W większości przypadków doświadczalnie stwierdzono, że wytwarzanie gazu było mniejsze od wartości obliczeniowych. Produkcja gazu pod wpływem wprowadzenia pojedynczych dawek substratu (0,8 i 1,2 g) osiągała wysoki procent wartości obliczeniowej (72 - 104%). Natomiast podwójne dawki kwasów (1,6 i 2,4 g) dawały w większości obserwacji około 60% przewidywanej objętości gazu. Przyczyną tych niezgodności mógł być hamujący wpływ na fermentację metanową większych stężeń jonu amonowego, wprowadzonego z substratem [58, 59].

> Biochemiczna redukcja dwutlenku węgla do metanu w obecności wodoru

### Substraty i przebieg doświadczenia

Niektóre bakterie metanowe mają zdolność redukcji dwutlenku węgla do metanu w obecności molekularnego wodoru [4, 85, 86]. Drobnoustroje te zwykle występują wśród mieszanych populacji bakteryjnych fermentacji metanowej [4]. Dla bardziej ogólnej charakterystyki kinetyki fermentacji metanowej należało również zbadać przebieg biochemicznej redukcji dwutlenku węgla gazowego substratu takiej metanogenezy. Biochemiczna redukcja dwutlenku węgla w obecności wodoru drobinowego przebiega zgodnie z ogólny. równaniem reakcji:

 $CO_2 + 4H_2 \longrightarrow CH_4 + 2H_2O - \Delta F$ 

Redukcji jednego mola dwutlenku odpowiada utworzenie jednego mola metanu. Towarzyszy temu zużycie czterech moli wodoru. Zmiany ciśnienia w układzie izolowanym w przemianie izochoryczno-izotermicznej są spowodowane przez utlenienie wodoru w podanej reakcji. Powstałe zmiany ciśnienia mogą służyć jako miernik przebiegającej redukcji biochemicznej. Nie można jednak przyjmować tych wielkości pomiarowych w sposób bezpośredni do opisu zjawiska. Wyniki pomiarów manometrycznych wynagają korekty, ponieważ CO<sub>2</sub> doprowadzony do przestrzeni gazowej reaktora ulega rozpuszczeniu w wodnym środowisku fermentacji metanowej. W tym celu należy obliczyć stosunek CO<sub>2</sub> znajdującego się w fazie gazowej [CO<sub>2</sub> (g)] do całkowitej ilości CO<sub>2</sub> [CO<sub>2</sub>(g) + CO<sub>2</sub>(c)] według wzoru [20]:

$$\frac{\text{co}_{2}(g)}{\text{co}_{2}(g) + \text{co}_{2}(c)} = \frac{v_{g} \frac{273}{T}}{v_{g} \frac{273}{T}} \frac{\binom{P_{CO_{2}} - P_{H_{2}O}}{(\frac{P_{CO_{2}} - P_{H_{2}O}}{760})} = A$$

$$v_{g} \frac{273}{T} \frac{\binom{P_{CO_{2}} - P_{H_{2}O}}{760} + v_{c} \alpha (\frac{P_{CO_{2}} - P_{H_{2}O}}{760})$$
(56)

w którym:

CO <sub>2</sub> (g)	-	zwartość CO <sub>2</sub> w gazie,
CO <sub>2</sub> (c)	-	zawartość CO <sub>2</sub> w cieczy,
A		stosunek CO <sub>2</sub> w gazie do całkowitej ilości CO <sub>2</sub> ,
Vg	-	objętość przestrzeni gazowej komory,
Ϋ́́c	-	objętość cieczy w komorze,
Pco2	-	ciśnienie cząstkowe CO <sub>2</sub> ,
PHO		ciśnienie cząstkowe nasyconej pary wodnej,
oc	-	współczynnik rozpuszczalności CO <sub>2</sub> w cieczy,
т	-	temperatura bezwzględna.

Redukcja dwutlenku węgla przebiega w roztworze wodnym, w którym CO jest znacznie lepiej rozpuszczalny od metanu. Wskutek tego powstały CH. dyfunduje do fazy gazowej. Spadkowi ciśnienia spowodowanego przez zużycie wodoru i dwutlenku węgla towarzyszy przyrost ciśnienia wskutek powstawania metanu [66]. Na każdą jednostkę przyrostu ciśnienia, wywołaną przez produkcję metanu przypada spadek ciśnienia spowodowany przez zużycie wodoru i dwutlenku węgla o (4 + A) jednostek. Powoduje to zmianę ciśnienia w reaktorze o (3 + A) jednostek. Dla utrzymania rzeczywistych wartości zużycia wodoru, wyniki otrzymane z pomiarów manometrycznych należało pomnożyć przez

współczynnik korekcji równy  $(\frac{4}{3+A})$ .

Doświadczenia wstępne wykazały dużą przydatność chromatografii gazowej do badania biochemicznej redukcji dwutlenku węgla do metanu [11, 14]. Przebieg tej przemiany można było obserwować przez zastosowanie aparatury chromatograficznej z radioaktywną komorą jonizacyjną. Rys.38 podaje przebieg serii analiz gazowo-chromatograficznych w czasie biochemicznej redukcji dwutlenku węgla do metanu w obecności doprowadzanego wodoru. Szczególnie dogodna do tych obserwacji okazała się jednak zmodyfikowana metoda JANAKa. Zastosowano więc tę metodę chromatograficzną do analizy gazów w czasie zasadniczych obserwacji przemiany dwutlenku węgla do metanu (rys.6).

Dwutlenek węgla, wodór i azot stosowany w tych doświadczeniach pobierano z butli stalowych. Były to gazy o czystości technicznej. Dwutlenek węgla zawierał około 2% azotu i nieznaczne ilości tlenu.

W badaniach zastosowano wzbogacone kultury bakterii metanowych, które znajdują się w osadzie przefermentowanym. Użycie osadu mogło nastąpić po praktycznym ustaniu fermentacji metanowej. Osad technicznie przefermentowany z wydzielonych komór mezofilnych podlegał fermentacji szczątkowej w termostacie o temperaturze 32 - 1 C przez okres dwu miesięcy. Po tym okresie metan powstający w fermentacji szczątkowej nie wpływał w sposób istotny na obserwacje biochemicznej przemiany CO<sub>2</sub> w metan. Dwutlenek węgla był w takich warunkach jedynym substratem węglowym fermentacji. Drobnoustroje redukujące dwutlenek węgla uaktywniano przez wielokrotne wprowadzanie gazowego wodoru do gazu fermentacyjnego zawierającego CO<sub>2</sub>, który zalegał komory doświadczalne. Uaktywnienie to przejawiało się w szybkim zużywaniu wodoru i dwutlenku węgla przez osad całkowicie przefermentowany.



Rys. 38. Przebieg serii analiz gazowo chromatograficznych w czasie biochemicznej redukcji dwullenku węgla do metanu w obecności wodoru







fermentowane osady w gazie zawierającym okolo 70% CO2 Rys. 41. Redukcja dwutlenku węgla do metanu przez przeDoświadczenia miały wykazać wpływ różnych wielkości ładunku dwutlenku węgla - gazowego substratu reakcji - na kinetykę wytwarzania metanu. Ważne było stwierdzenie wpływu różnych objętości uaktywnionych, przefermentowanych osadów na szybkość redukcji dwutlenku węgla, który w obecności wodoru kontaktował się z tymi osadami. Redukcji jednego mola dwutlenku węgla towarzyszy powstanie ekwimolarnej ilości metanu oraz zużycie czterech moli wodoru. Interesujące było ustalenie praktycznej wielkości stosunku zużycia dwutlenku węgla i wodoru w przeprowadzonych badaniach.

# Wpływ objętości fermentującej masy na przebieg przemiany dwutlenku wegla w metan

W celu ustalenia wpływu objętości uaktywnionego osadu przefermentowanego na szybkość redukcji CO<sub>2</sub> w obecności wodoru, przeprowadzono obserwacje w trzech 5 l komorach doświadczalnych. Komora I zawierała 1,0 l zaś Komorę wypełniono przez 0,3 l osadu o jednakowej aktywności. Obie komory przemyto strumieniem wodoru i doprowadzono przez zawór dwutlenek węgla do nadciśnienia 200 mm Hg. Odpowiadało to zawartości początkowej około 20% CO<sub>2</sub> w gazie. # odstępach sześciogodzinnych przeprowadzano manometryczny pomiar zużycia wodoru. Notowane spadki ciśnienia uzupełniano gazowym wodorem do ciśnienia 200 m Hg w komorach doświadczalnych. # odstępach 6 lub 12 godzin przeprowadzano analizę chromatograficzną z 2,0 ml próby reagujących gazów.

Kontrolę doświadczenia stanowiła Komora III, która zawierała 1,0 l fermentującej masy i była wypełniona azotem w miejsce wodoru z dodatkiem dwutlenku węgla do nadciśnienia 200 mm Hg. W czasie doświadczenia nie obserwowano istotnych zmian ciśnienia w tym reaktorze kontrolnym.

Czas trwania redukcji wprowadzonej porcji dwutlenku węgla w Komorze I, która zawierała 1,0 l osadu wynosił około 48 godz. W Komorze O, zawierającej O,3 l osadu czas ten trwał około 72 godz. Średnia wartość stosunku zużytego wodoru do zredukowanego dwutlenku węgla wynosiła około 4,2. Przebieg zużycia wodoru i przemiany dwutlenku węgla w metan w tych obserwacjach podaje rys.39. Doświadczenia potwierdziły przypuszczenie, że szybkość redukcji CO<sub>2</sub> zależy od objętości fermentującej masy, kontaktującej się z fazą gazową, a nie od powierzchni tego zetknięcia.

# Wpływ wielkości ładunku dwutlenku wegla na przebieg przemiany w metan

Przeprowadzono obserwacje kinetyki redukcji dwutlenku węgla i zużycia wodoru przez uaktywnione osady przefermentowane. Były one w kontakcie z mieszaninami gazowymi, które zawierały początkowe stężenie CO<sub>2</sub> rzędu 20, 40 i 70%.

Badania przebiegały w dwu równolegle użytych 5 l Komorach I i II, zawierających 1,0 l osadu. Komory te służyły kolejno do obserwacji trzech serii doświadczeń o różnych stężeniach początkowych dwutlenku węgla w mieszaninie z wodorem.

Kontrolę obserwacji stanowiła Komora III, zawierająca 1,0 l przefermentowanego osadu. Do komory tej w miejsce wodoru w mieszaninie z CO<sub>2</sub> wprowadzano azot jako gaz obojętny w reakcji. Obserwacje wykazały, że ilości metanu powstające wskutek fermentacji szczątkowej były znikome i można je było zaniedbać w opracowaniu wyników doświadczeń.

Tabela IV

	Osad całkowicie przefermentowany				
Oznaczenie	Analiza wstępna Komora I		Komora II	Komora III kontrolna	
Sucha pozostałoś <b>ć</b> (%)	3,96	3,96	3,65	3,20	
Sucha pozostałość lotna (%)	46,3	46,0	45,0	47,0	
Kwasy lotne (mg/l)	395	370	405	425	
Alkaliczność (mg/l)	2850	2450	2755	2525	
рН	8,3	8,8	8,9	8,0	

Chemiczna charakterystyka przefermentowanych osadów stosowanych w redukcji dwutlenku węgla do metanu w obecności wodoru

W pierwszej serii doświadczeń dwie komory doświadczalne napełniono wodorem przy ciśnieniu atmosferycznym. Komora I zawierała 4190 ml, zaś Komora II - 4195 ml wodoru. Do komór doprowadzono CO, przez zawór do nadciśnienia 200 mm Hg. Odpowiadało to porcji 832 ml i 842 ml CO, w komorach. Początkowy skład mieszaniny gazowej w obu reaktorach wynosił około 79% wodoru, 19% dwutlenku wegla i 2% azotu. W odstępach 6godzinnych przeprowadzono manometryczny pomiar zużycia wodoru. Obserwowane spadki ciśnienia uzupełniano wodorem do 200 mm Hg. W odstępach 12-godzinnych analizowano próby gazu pobrane z reaktorów. Sumaryczne zużycie wodoru wynosiło średnio 2940 ml. Sredni stosunek zużytego wodoru do zredukowanych 837 ml wynosił 3,65. Czas potrzebny na pełną przemianę CO<sub>2</sub> w CH. odpowiadał 48 godz. Typowy przebieg zużycia wodoru I przemiany dwutlenku węgla w metan demonstrują wyniki uzyskane dla Komory I, które podaje rys.39 i tabela V.

Następną serię obserwacji przeprowadzono dla zawartości początkowej CO<sub>2</sub> w mieszaninie gazowej rzędu 40%. Komory zawierały 4190 i 4195 ml wodoru oraz 1684 ml i 1665 ml dwutlenku węgla, który wprowadzono przez wywołanie nadciśnienia 400 mm Hg. Otrzymana w ten sposób mieszanina gazowa zawierała 64% wodoru, 33% CO<sub>2</sub> i 3% azotu. Zawartość CO<sub>2</sub> w gazie była mniejsza od przewidywanej wskutek rozpuszczalności tego składnika w cieczy pod zwiększonym ciśnieniem. Zużycie wodoru kontrolowano w odstępach 6-godzinnych. Zanotowane spadki ciśnienia uzupełniano wodorem do 400 mm Hg. nadciśnienia. Analizę chromatograficzną gazu przeprowadzano co 12 godzin. Całkowita redukcja wprowadzonych porcji CO<sub>2</sub>, zaszła w ciągu 48 godz. Sumaryczne zużycie wodoru na tę redukcję wynosiło 6175 ml. Stosunek obu reagujących gazów miał wartość 3,84. Przebieg zużycia wodoru i przemianę CO<sub>2</sub> - CH<sub>4</sub> w tej serii badań podaje rys.40 i Tabela V.

Trzecia serie doświadczeń przeprowadzono dla zawartości początkowej dwutlenku wegla w mieszaninie gazowej rzędu 70%. Komory doświadczalne wypełnione dwutlenkiem wegla przy ciśnieniu atmosferycznym. Komora I zawierała porcję 4190 ml. natomiast Komora II - 4195 ml CO. Do komór wprowadzono wodór do nadciśnienia 400 mm Hg, co odpowiadało 1760 i 1537 ml. Początkowy skład mieszaniny gazowej odpowiadał 33% wodoru, 65% dwutlenku wegla oraz 2% azotu. Ze względu na mniejszą szybkość reakcji, pomiary ciśnienia przeprowadzano w odstępach 12-godzinnych. W tym czasie również ciśnienie w komorach uzupełniano wodorem do 400 mm Hg. Chromatograficzną analize gazu dokonywano w odstępach 24-godzinnych. Czas potrzebny na całkowite zredukowanie porcji 4193 ml CO2 wynosił około 6 dni. Całkowite zużycie wodoru odpowiadało średnio 15003 ml. Stosunek objętości reagujących gazów był równy 5.06. Kinetykę zużycia wodoru w tej serii obserwacji podaje rys.41 i tabela V.

Tabela V

Stosunek zużytych objętości wodoru i dwutlenku węgla w czasie biochemicznej redukcji dwutlenku wegla do metanu

1

	Ś <b>redni</b> korygowa- ny sto- sunek	H2°CO2	3,65	3,84	5,06	
Korygowany	wany ek CO <sub>2</sub>	ora II	3,63	3,96	5,09	
	Korygo stosun H <sub>2</sub>	Kom I	3,68	3,72	5,04	
	czyn- orek- i	ora II	1 0 04	1,04	1 °04	
	Współ nik k cj	Кот Т	1 ,04	1 °04	1,04	
	ek CO <sub>2</sub>	ora II	3,49	3,81	4,88	
	S <b>tosur</b> H2	Kome I	3,54	3,57	4,85	
	e.	LI	842	1665	3069	
	Zużyc: dwutl węgla (ml)	Kome I	832	1684	3097	
-	tie Tu	II	2936	6334	14998	
7.11 % VIC	Zużyc wodor (ml)	Komore I	2944	6017	15008	
	Redukcja dwutlenku węgla w kon- takcie z osa-	dem przefer- mentowanym	Początkowe stężenie 20% CO2 w gazie	Początkowe stężenie 40% CO2 w gazie	Początkowe stężenie 70% CO2 w zazie	

82



Rys. 42. Kinetyka zużycia wodoru w biochemicznej redukcji dwutlenku węgla do metanu



Rys. 43. Doświadczalne i teoretyczne szybkości zużycia wodoru w biochemicznej redukcji dwutlenku węgla do metanu

Charakterystykę chemiczną zmian, jakim podlegały całkowicie przefermentowane osady w kontakcie z reagującymi gazami w czasie opisanych serii doświadczeń przedstawia tibela IV. Okazało się, że zmiany te są nieznaczne i prawdopodobnie nieistotne w ogólnym przebiegu procesu biochemicznej redukcji CO<sub>2</sub>.

Tabéla V podaje stwierdzone doświadczalnie wartości stosunku objętości zużytego wodoru i dwuilenku węgla. Średnia wartość tego stosunku była bliska stechiometrycznej wartości 4.

#### Kinetyka biochemicznej redukcji dwutlenku wegla do metanu

Obserwacja wpływu różnych stężeń dwutlenku węgla na kinetykę przemiany w metan umożliwiła próbę ogólnej charakterystyki tej metanogenezy. W przebiegu zjawiska, które zachodzi w obecności nadmiaru wodoru, można było wyróżnić dwa zasadnicze etapy. Pierwszy charakteryzował się znacznym zużyciem wodoru o praktycznie stałej szybkości. Zużycie wodoru i dwutlenku węgla oraz wytwarzanie metanu przebiegało w tym czasie liniowo. W końcowym momencie tego etapu stężenie CO<sub>2</sub> w gazie malało do wielkości szczątkowych. Drugi etap procesu jest związany z redukcją resztkowych ilości dwutlenku węgla. Obserwuje się wtedy stale malejącą szybkość zużycia wodoru przez masę fermentującą.

Opisane zachowanie się komór w czasie biochemicznej redukcji dwutlenku węgla było analogiczne z własnościami komór przeciążonych przez inne substraty fermentacji metanowej. We wszystkich trzech przypadkach różnych stężeń początkowych CO,, komory doświadczalne należało uważać za przeciążone w głównym etapie procesu. W tym czasie szybkość przemiany CO, w metan oraz szybkość zużycia wodoru była stała. Ten etap fermentacji można uważać za podporządkowujący się procesom i kinetyce zerowego rzędu. W dalszym przepiegu fermentacji szybkość zużycia wodoru stale maleje. Ten etap związany z redukcją resztkowych ilości dwutlenku węgla, przebiega zgodnie z kinetyką pierwszego rzędu. Liczbową charakterystykę kinetyki biochemicznej redukcji dwutlenku węgla do metanu podaje tabela VI.

Kinetykę zużycia wodoru w seriach doświadczeń z różnymi stężeniami początkowymi dwutlenku węgla w gazowej mieszaninie reagującej przedstawia rys.42.

# Tabela VI

# Wartości liczbowe charakteryzujące kinetykę fermentacji meta-nowej różnych substratów w próbie zbiornikowej

	Dawka doda- nego	<ul> <li>Nytworzona flość ga zu</li> <li>przez 1 l masy fermen- tującej</li> </ul>			lzas trwania reakcji	Stala szybkości reakcji zerowed nierw-	
Substrat	subs- tratu	ogólna Z.ml/l	w fazie reakcji	w fazie reakcji	zero- wego	go rzedu	szego rzedu
	5/1	-,,-	zerowego	pierw-	rzędu	k	X
			y <sub>o</sub> ,ml/l.	rzędu G.ml/1	to	U	
Osad przefermen- towany w obroto-	_	3496		3496		-	.30
wed Komorze A					1		
towany w obroto-	-	5352	-	5352	-	-	0,30
wej Komorze B Osad przefermen-					- 22		
towany w obroto-	-	11604	6634	4970	5 dni	1450	0,30
Osad zmieszany		06645	45020	40605	44 344	4450	0.42
fermentujący w Komorzę F i G	-	20017	15932	10685	11 ani	7450	0,13
(średnio) Osad technicznie							
przefermentowany w Komorze H	-	13735	-	13735	-	-	0,13
Kwas maslowy do-		0110		- 70.0	1 3.4		0.51
dany do cieczy nadosadowej	1,76	2449	1669	780	4 dn1	440	0,54
Kwas kapronowy dodany do cieczy	1.74	2840	2035	805	5 dni	425	0.50
nadosadowej							
nadosadowa	<u> </u>	971	-	971	-	-	0,45
Kwas mrówkowy do- dany do cieczy	1,0	510	-	510		-	0,16
nadosadowej	2,0	1072		1072	-	-	0,08
ny do cieczy	2.1	2090		2090	-		0.10
nadosadowej	1.0	74.4	4.20	50%	h roda		0.11
dodany do cieczy	2.0	1126	811	315	20 godz.	40	0.11
kwas masłowy	1 2	970	- 350	620	h godz.	86	0.14
dodany dc cieczy	2,4	1704	1174	530	20 godz.	55	0,10
Kwas walerianowy	0,8	674	228	446	4 godz.	62	0,14
dodany do cieozy nadosadowej	1,6	1256	948	308	24 godz.	38	0,15
Kwas kapronowy dodany do cieczy	0,8	830	398	432	6 godz.	65	0,13
nadosadowej	1,0	1552	000	472	17 80024	44	0,00
redukcję gazu o							
20% CO <sub>2</sub> w kontak- cie z osadem	-	3985	1485	2500	18 godz.	90	0,04
przefermentow.							
redukcję gazu o		7:150	4600	0750	and a	444	0.05
cie z osadem	-	/358	4000	2750	JO Bous	144	0,00
przefermentow.							
redukcję gazu o		16460	14700	14.60	102 and a	120	0.03
cie z osadem	- (	10109	11700	4469	JUZ goaz.	1.54	0,05
przefermentow.				L			2000

W głównym etapie reakcji zużycie wodoru przebiegało liniowo, zgodnie z równaniem 44. Okres ten trwał przez czas t\_, w którym stężenie dwutlenku wegla spadało do wielkości resztkowych. W drugim etapie przemiany układ punktów doświadczalnych dawał się opisać przez eksponencjalne równanie 52. W tym celu wartości G w tym równaniu należało określić z różnicy ogólnego zużycia wodoru zużytej w okresie liniowego przebiegu procesu (równanie 51 i tabela VI). Obliczona wielkość i: stałej szybkości reakcji była różna dla poszczególnych serii obserwacji. Zależała ona od warunków doświadczenia i przypadkowych zmian aktywności przefermentowanym osadów. Nie utrudnia to jednak ogólnej charakterystyki zjawiska biochemicznej redukcji dwutlenku wegla jako procesu złożonego z układu nastepujących po sobie reakcji zerowego i pierwszego rzędu. Złożony przebieg szybkości zużycia wodoru w przemianie dwutlenku wegla do metanu przedstawia rys.43, który podaje teoretyczne i doświadczalnie stwierdzone szybkości zużycia wodoru w tym procesie. Poczatkowa szybkość zużycia wodoru jest praktycznie stała i można ja opisać przez poziomy odcinek prostej, równoległej do osi czasu. Odpowiada to procesowi o kinetyce zerowego rzędu w okresie nadmiaru substratu (równanie 45). W dalszym przebiegu redukcji resztkowych ilości CO, proces przebiegą zgodnie z krzywą wygaszania, wyznaczoną przez równanie 53.

## OMÓWIENIE WYNIKÓW

## Reakcje kinetyczne pierwszego i zerowego rzędu w fermentacji metanowej

W technologii fermentacji metanowej dąży się do stosowania prostych i najbardziej ekonomicznych sposobów stabilizacji substancji organicznych. Niektóre zmiany w technice komór fermentacyjnych, wprowadzone w ciągu ostatnich kilku lat [50, 56, 74] wykazały, że przez utworzenie dogodnego środowiska reakcji można znacznie zredukować czas fermentacji. Taki postęp w kierunku fermentacji w komorach wysoko-obciążonych był możliwy w oparciu o matematyczny opis degradacji beztlenowej. Wyrażenia te mają postać ogólnych równań reakcji pierwszego rzędu [24]. Równania kinetyczne okazały się przydatne w projektowaniu i eksploatacji komór. Ulepszeniom sprzyjała również znajomość zasad mikrobiologicznych i biochemii fermentacji metanowej [4, 7, 35, 45, 77]. Wskutek intensyfikacji pracę komór fermentacyjnych prowadzi się w warunkach maksymalnej wydajności. Są to warunki bliskie stanom przeciążenia. Wydaje się więc przydatne dla dalszego rozwoju technologii fermentacji dokładniejsze zdefiniowanie stanu przeciążenia. Ułatwi to przewidywanie prawidłowości w zachowaniu się komór fermentacyjnych i należytą kontrolę procesu.

Głównym celem przeprowadzonych doświadczeń było udowodnienie tezy, że stan przeciążenia komory fermentacyjnej można podporządkować reakcji zerowego rzędu. Wniosek taki był oczywisty z punktu widzenia teorii reakcji enzymatycznych: fermentacja metanowa powinna podporządkować się tym prawidłom. Dotychczas jednak nie uwzględniono należycie zjawiska przeciążenia w opisie kinetyki fermentacji metanowej. Na możliwość występowania procesu uzależnionego od reakcji zerowego rzędu w pracy przeciążonych komór fermentacyjnych zwracał uwagę CHMIELOWSKI i współpracownicy [12]. Obserwowano, że masa fermentacyjna z komory wykazującej objawy przeciążenia w izolowanej próbie zbiornikowej cechuje się praktycznie stałym wytwarzaniem gazu w okresie poprzedzającym fazę gazowania, zgodną z reakcją pierwszego rzędu.

Z rozważań teoretycznych wynika, że wyraźne ujawnienie się opisanego zjawiska można by przypisać małej szybkości wzrostu bakteri metanowych [33, 34, 35]. Mała szybkość wzrostu populacji tych drobnoustrojów stwarza warunki, w których ilości enzymatycznie czynnej masy można praktycznie uznać za stałą w czasie nawet kilkudniowej obserwacji. Wtedy w nadmiarze metabolizowanych substancji szybkość reakcji biochemicznej jest stała i zależna tylko od enzymatycznie czynnej masy. Odpowiada to warunkom reakcji zerowego rzędu. Kinetyka procesu pierwszorzędowego ujawnia się dopiero od momentu przekroczenia jakiegoś granicznego stężenia substratu.

Wyniki przeprowadzonych doświadczeń prowadzą do ciekawego i ważnego wniosku. Niezależnie od rodzaju substratu przebieg fermentacji metanowej można ogólnie opisać przez dwa następujące po sobie równania kinetyczne: zerowego i pierwszego rzędu. Pomimo pewnego rozrzutu punktów doświadczalnych w stosunku do przebiegów wyznaczonych teoretycznie, wyniki badań pozwalają na takie uogólnienie poglądu na kinetykę fermentacji metanowej.

W warunkach nadmiaru substratu, którym charakteryzuje sie stan przeciążenia, szybkość reakcji jest maksymalna i niezależna od steżenia substratów. Całkowita ilość katalizatora enzymatycznego jest zaangażowana w reakcji. Fermentacja podlega reakcji zerowego rzedu, która określa równanie 44 i 45 opisujace wytwarzanie gazu:

$$y = k_0 t$$
 (44)

$$r = k_0$$
 gdy  $t < t_0$  (45)

W czasie t stężenie substratu opada do ilości granicznej. Jest to punkt zetkniecia sie dwu funkcji kinetycznych. Od tego momentu szybkość reakcji uzależnia się od stężenia substratów. Przebieg fermentacji jest podporządkowany równaniu 52 i 53 dla reakcji pierwszego rzedu:

$$y = G (1 - e^{-k(t - t_0)})$$
(52)  
$$-k(t - t_0)$$
  
$$r = k G e^{-k(t - t_0)}$$
(53)  
$$gdy t \ge t_0$$

Nie ma podstaw do przypuszczeń, że proponowany matematyczny opis kinetyki fermentacji metanowej jest jedynym możliwym sposobem definicji tego zjawiska. Duża jednak zgodność danych doświadczalnych z wyznaczonymi teoretycznie pozwala uważać taka generalizację za dogodne przybliżenie inżynierskie.

gdy

Podanym prawidłowościom podporządkowały się próby zbiornikowe osadów pobranych z komór fermentacji ciągłej o różnym obciażeniu. Komora A o 20-dniowym czasie fermentacji (rys.7) oraz Komora B z 10-dniowym czasem przepływu (rys.8) cechowała się prawidłowym przebiegiem beztlenowej degradacji substancji organicznych fermentowanych osadów (tabela I). Komora C o 6.7 dniach fermentacji (rys.9) wykazała oznaki przeciążenia w czasie ruchu ciągłego. Przejawiały się one w zahamowaniu ilości wytwarzanego gazu w porównaniu z komorami pracującymi prawidłowo (rys.10). Towarzyszyły temu złe własności dehydratacyjne osadu przefermentowanego (rys.14) i wzrost

zawartości kwasów lotnych (tabela I, rys,9). Porównanie kinetyki wytwarzania gazu w próbie zbiornikowej z krzywymi teoretycznymi pozwala stwierdzić, że fermentacja osadów, które pochodziły z komór zachowujących się prawidłowo, przebiegała zgodnie z równaniem reakcji pierwszego rzędu (rys.11 i 12). Osad uzyskany z komory przeciążonej wytwarzał gaz fermentacyjny ze stałą szybkością w okresie poprzedzającym fazę zależności pierwszorzędowej.

Zupełnie analogicznie zachowywały sie komory fermentacyjne, w których stan przeciążenia wywołano bezpośrednio przez jednokrotne wyprowadzenie dużej masy substratu. Uzyskano to przez zmieszanie równych objętości aktywnie fermentujacego osadu z surowym osadem organicznym. Obserwowano równolegle pracujaca Komore F (rys. 15) i Komore G (rys. 16). Obie te komory wykazywały cechy przeciążenia w początkowej fazie fermentacji. Objawiało się to również przez w przybliżeniu stała szybkość wytwarzania gazu w tym okresie. który można opisać przez równanie zerowego rzędu (rys.20 i 21). Następnie pojawiała się faza o przebiegu reakcji monomolekularnej. Kontrolę tego doświadczenia stanowiła obserwacja zachowania się Komory H (rys.17), w której podlegał dalszemu rozkładowi osad technicznie przefermentowany. Osad taki służył do zaszczepienia serii doświadczeń. Kinetyka wytwarzania gazu przez ten osad podporządkowała się równaniu reakcji pierwszego rzędu w ciągu całej obserwacji.

Jest godne uwagi, że zupełnie podobnie przedstawiała się kinetyka wytwarzania gazu, gdy zastosowano różne kwasy alifatyczne jako substraty fermentacji.

Jednokrotne wprowadzenie do fermentującej cieczy nadosadowej dużego ładunku kwasu masłowego (rys.22) lub kwasu kapronowego (rys.24) wywoływało objawy przeciążenia. Wytwarzanie gazu (rys.28) miało przebieg złożony. Szybkość tej fermentacji (rys.29) była stała w początkowym przebiegu procesu i dała prostą równoległą do osi czasu. Dalsza fermentacja miała charakter reakcji pierwszego rzędu i była zgodna z krzywą wygaszania. Kinetykę reakcji pierwszorzędowej wykazywał również rozkład beztlenowy w komorze kontrolnej. Komora ta zawierała fermentującą tiecz nadosadową, która stwarzała środowisko fermentacyjne w tych próbach (rys.26).

Bardziej szczegółowym badaniom poddano kinetykę wytwarzania gazu w czasie fermentacji pierwszych sześciu normalnych kwasów tłuszczowych. Obserwacje potwierdziły słuszność oczywistego przypuszczenia, że przemiana kwasów w gaz fermentacyjny również podlega omawianym prawidłowościom. Dawki tych substratów wybrano przewidując możliwość ich biochemicznego rozkładu w okresie 1 do 2 dni. W przypadku kwasu mrówkowego i octowego ilości wprowadzonych substratów nie wywołały efektu przeciążenia i rozkład tych kwasów podporządkował się równaniom pierwszego rzędu (rys.30, 31 i 36). W pozostałych przypadkach kwas propionowy (rys.32 i 36), masłowy, walerianowy i kapronowy (rys.33, 34, 35 i 37) podlegał fermentacji z ujawnieniem okresu stałej szybkości gazowania. Okres ten utrzymywał się 4 do 6 godzin w przypadku należycie dobranej dawki pojedynczej i 16 do 20 godzin po wprowadzeniu dawki dwukrotnie większej (rys.36 i 37). Po tej fazie reakcji zerowego rzędu następował spadek szybkości gazowania zgodny z zależnościa pierwszorzędowa.

Obserwacje rozkładu niższych kwasów tłuszczowych przeprowadzono w środowisku przefermentowanej cieczy nadosadowej. Wyniki obserwacji wykazały, że zmiany chemiczne, które zachodziły w tym środowisku w czasie fermentacji dodanych substratów (tabela II) nie wpływały w sposób istotny na opis przebiegu procesu.

Na szczególną uwagę zasługują wyniki doświadczeń biochemicznej przemiany dwutlenku węgla do metanu w obecności doprowadzonego wodoru. Charakter tej reakcji wydaje się różny od innych procesów fermentacyjnych. Można spodziewać się, że czynne w tym procesie będą tylko niektóre, szczególnie wyspecjalizowane bakterie metanowe [4]. Jednak z punktu widzenia ogólnej kinetyki fermentacji metanowej należało również uwzględnić takie zjawisko, w którym substrat jest substancją gazową. Wolny dwutlenek węgla jest jedynym substratem węglowym tej metanogenezy.

Na ciekawy przebieg biochemicznej redukcji CO<sub>2</sub> zwracał uwagę CHMIELOWSKI i ISAAC [14]. Szybkość tej reakcji w istotny sposób była zależna od masy katalitycznie działających drobnoustrojów. Wskazują na to wyniki doświadczenia, w którym trzykrotnie większa objętość masy fermentującej osadu spowodowała zredukowanie porcji CO<sub>2</sub> w czasie dwukrotnie krótszym (rys.39). Przeprowadzona obserwacja potwierdziła przypuszczenie, że szybkość redukcji dwutlenku węgla zależy od objętości przefermentowanego osadu, kontaktującego się z fazą mieszaniny gazowej, a nie od powierzchni tego zetknięcia.

W przeprowadzonych doświadczeniach można było stwierdzić prostoliniowy przebieg zużycia dwutlenku węgla i wodoru oraz prostoliniowy przebieg metanogenezy w głównym okresie procesu. W tym czasie dwutlenek węgla był w dużym nadmiarze obok znacznej, ciągle uzupełnianej ilości wodoru (rys.39, 40 i 41). Główną fazę biochemicznej redukcji GO<sub>2</sub> można podporządkować reakcji zerowego rzędu. Redukcja resztkowych stężeń dwutlenku węgla podlegała natomiast kinetyce pierwszego rzędu. Obserwacje wykazaky, że i w tym szczególnym przypadku fermentacji metanowej proces ma przebieg złożony (rys.42 i 43) i zgodny z ogólnym schematem. Analiza chemiczna przefermentowanych osadów nie stwierdziła istotnych różnic w składzie tego środowiska wskutek długotrwałego kontaktu z fazą reagujących gazów (tabela IV).

Szybkość fermentacji metanowej jest funkcją stężenia substratów, temperatury oraz biochemicznych i fizycznych warunków procesu. Sa one niekiedy trudne do dokładniejszego określenia. W interpretacji kinetyki procesu często rozpatruje sie wartość współczynnika szybkości reakcji k [71]. Wartość stałej szybkości reakcji pierwszego rzedu zależy od wyboru jednostki czasu i ma wymiar odwrotności tej jednostki. W przeprowadzonych badaniach uzyskano dość zróżnicowane wartości stałej k w seriach doświadczeń z różnymi substratami (tabela VI). Wyznaczono je w różnorodnych warunkach utrudniajacych bezpośrednie porównanie stałych. Wyznaczenie ścisłych wartości liczbowych stałych szybkości reakcji zerowego i pierwszego rzedu nie było celem niniejszych badań. Ważne było natomiast stwierdzenie ogólnych prawidłowości w kinetyce procesu fermentacji metanowej. Jest jednak znamienne, że wyższą wartość stałej k równą 0,3 otrzymano dla prób zbiornikowych fermentacji osadów w czasie intensywnego mieszania. W warunkach statycznych wartość ta była oczywiście mniejsza i wynosiła około 0,1. Obie te wielkości są zbliżone do podawanych w literaturze [23, 30, 31, 75]. Interesujące jest, że rozkład sześciu niższych kwasów tłuszczowych następował w reakcji jednocząsteczkowej o stałej szybkości reakcji k równej około 0.1. Zbyt szczupły materiał doświadczalny nie pozwala na interpretację tego ciekawego, jak się wydaje, spostrzeżenia (tabela VI).

W przeprowadzanych rozważaniach istotne jest skonfrontowanie stałych w równaniach funkcji kinetycznych zerowego i pierwszego rzędu z ich znaczeniem fizykochemicznym. W fazie reakcji enzymatycznej zerowego rzędu, to znaczy w okresie przeciążenia spowodowanego przez nadmiar substratu, proces fermentacji jest podporządkowany równaniu 44 i 45:

$$y = k_0 t \tag{44}$$

 $r = k_0 gdy t \leq t_0$  (45)

91

$$\mathbf{V} = \mathbf{k}_{+2} \mathbf{e} = \mathbf{k}_{\mathbf{0}} \tag{35}$$

Wartość współczynnika k można uważać za wielkość ściśle zależną od stężenia enzymu, czyli od ilości czynnych bakterii w jednostce objętości fermentującej masy. Pełnemu związaniu enzymu przez substrat towarzyszy maksymalna szybkość reakcji. Dla nadmiaru substratu wykresem stałej szybkości reakcji jest odcinek prostej równoległej od osi czasu, ponieważ w rozważaniach teoretycznych zakłada się stałą ilość enzymu w czasie reakcji. W ten sposób idealizowano kinetykę fermentacji metanowej w niniejszej pracy. Rozmyślnie pomijano oczywisty fakt, że ilość enzymatycznie czynnej masy wzrasta w czasie doświadczenia wskutek wzrostu populacji bakterii metanowych. Wzrost tych bakterii jest bardzo powolny 33. 341 i można było pominać to zjawisko w interpretacji procesu. Rzeczywiste przebiegi wytwarzania gazu w okresie przeciążenia wykazują jednak pewną tendencję wzrostu szybkości fermentacji (rys.12, 21 i 43). W ten pośredni sposób można uzyskać potwierdzenie słuszności przekonania o podporzadkowaniu przeciążonych komór fermentacyjnych procesem o kinetyce zerowego rzedu.

Zgodnie z pracami FAIRa i MOOREa [24] oraz wynikami prac późniejszych [12, 30, 75] fermentacja metanowa w prawidłowej nieprzeciążonej fazie procesu przebiega zgodnie z kinetyką reakcji pierwszego rzędu. Założenie to miało charakter empiryczny. Można było jednak podać niektóre teoretyczne przesłanki, które mogłyby tłumaczyć monomolekularny charakter rozkładu złożonych substratów fermentacji. Jeżeli założy się, że wszystkie z reagujących substancji występują w nadmiarze z wyjątkiem jednego reagentu, stężenie tego związku będzie kontrolowało przebieg procesu i nada mu charakter jednocząsteczkowy.

Można również przyjąć inne założenie. W mechanizmie procesu składającego się z serii następujących po sobie reakcji, jedna wykazuje kinetykę pierwszego rzędu. Jeżeli jest to reakcja powolniejsza, kontroluje ona układ i nadaje mu charakter reakcji monomolekularnej. Założenia te mają charakter spekulatywny, są jednak przydatne.

Wyniki przeprowadzonych doświadczeń pozwalają przypuszczać, że zgodność kinetyki fermentacji metanowej z przebiegiem reakcji zerowego i pierwszego rzędu nie jest przypadkowa. Wiąże się z wielostopniowym, łańcuchowym przebiegiem reakcji rozkładu beztlenowego. Mechanizm tych procesów enzymatycznych nie jest dostatecznie poznany. Dlatego proponowany matematyczny opis kinetyki fermentacji traktuje się jako dogodny sposób idealizowania wyników doświadczalnych. Jest to poręczna metoda statycznej generalizacji obserwowanych wielkości wytwarzania gazu, pozwala bowiem na określenie pewnych prawidłowości i przewidywanie przebiegu procesu.

Należy jednak rozpatrzyć zastrzeżenia jakie stawia sie założonej przez FAIRa i MOOREa [24] kinetyce monomolekularnego przebiegu fermentacji. Krytykę stosowania reakcji pierwszego rzędu w opisie procesów biologicznego utlenienia podaje ORFORD i INGRAM [68]. Według tych autorów teoretyczna podstawa zastosowań kinetyki reakcji pierwszego rzedu do procesów biochemicznego utleniania wywodzi się z faktu. że wiele prostych dyfuzji i zjawisk chemicznych można wyrazić przez r nie monomolekularne. Jednakże utlenianie biologiczne wywołuje zespół drobnoustrojów, które utleniaja heterogenne i złożone substraty. Nie można więc spodziewać się. aby równanie monomolekularne, stosowane do cpisu prostych zjawisk chemicznych mogło również teoretycznie formułować tak bardzo złożony proces. Z tego wynika, że równania opracowane przez FAIRa i MOOREa mają podstawy raczej empiryczne i z teoretycznego punktu widzenia mogą budzić pewne watpliwości. Jednak, jak stwierdza ORFORD i INGRAM, nie jest to zarzut zasadniczy, jeżeli rzeczywista kinetyka procesów zbliża się do zależności monomolekularnej, jak na to wskazuja wyniki wielu badań.

Jest jednak drugie źródło nieścisłości. Parametry k oraz G maja teoretyczne znaczenie fizykochemiczne w równaniu pierwszego rzedu (równanie 5). Jednak żadnej z tych dwu stałych nie można oznaczyć wprost przez obserwację doświadczalną. Wielkości te powinno się określać przez analize statystyczną. Wartości G nie można wyznaczyć doświadczalnie, ponieważ teoretycznie jest to graniczna ilość gazu wytworzona w nieskończenie długim czasie fermentacji. Trudno nawet oznaczyć przybliżoną wartość G i zwykle przyjmuje sie za te wielkość ilość gazu wytworzona w czasie doświadczenia. Powodem nieścisłości w przeprowadzanym rozumowaniu może stać się również fakt, że wartość "stałej" kinetycznej k przyjmuje się jako rzeczywistą stałą, podczas gdy z doświadczeń ostatnich lat wynika, że ulega ona zmianom w toku procesu. Dlatego znalezioną wartość stałej k należałoby traktować jako wartość wypadkowa.

Z tego wynika, że wielkości k oraz G obliczone w zwykły sposób są wielkościami statystycznymi równania. Nie są to jednak parametry o rzeczywistym znaczeniu fizykochemicznym i biologicznym. O tym zastrzeżeniu wspomina również MOORE [64] stwierdzając, że wielkość k w równaniu monomolekularnym należałoby uważać za średnią wielkość statystyczną raczej niż za rzeczywistą stałą.

Równanie pierwszego rzędu jest poza tym bardzo elastyczne. Dobór wielkości k oraz G umożliwia utworzenie prawie każdej wyobrażalnej krzywej typu parabolicznego. Jest to duża dogodność, ale również stwarza pewne ograniczenia w stosowaniu tego równania. Można tolerować nawet dość znaczne odchylenia w uyznaczeniu wartości k i krzywa będzie wystarczająco dobrze odpowiadała przebiegowi doświadczalnemu. Z drugiej jednak strony nawet małe różnice w kształcie rozpatrywanej krzywej doświadczalnej mogą powodować potrzebę poważniejszych odstępstw od doświadczalnie wyznaczonych wielkości k oraz G.

Jednym z głównych problemów w stosowaniu równania monomolekularnego jest fakt, że wielkości k oraz G nie mają wartości stałej w czasie całego procesu [68]. Aby je dokładnie oznaczyć czas obserwacji musi być dostatecznie długi. Ze wzrostem czasu obserwacji gazowania w próbie zbiornikowej uzyskuje się rosnące wielkości G wskutek dokładniejszego zebrania gazu z fermentacji szczątkowej. Towarzyszy temu zmniejszenie się wielkości k w opisie krzywej doświadczalnej. Podkreśla to trudność w nadawaniu obu wielkościom znaczenia rzeczywistych fizycznych i biologicznych parametrów.

Wydaje się jednak, że pomimo tych zastrzeżeń przyjęcie proponowanego układu funkcji kinetycznych pozwala na ujednolicenie poglądu na przebieg fermentacji metanowej. Prawdopodobnie będzie to użyteczna informacja dla praktyki technologicznej i projektowej.

### Mechanizm i produkty fermentacji metanowej

Fermentację metanową należy uważać za szczególny przypadek biochemicznego utlenienia, w którym ostatecznym akceptorem wodoru w reakcjach dehydrogenacji jest tlen chemicznie związany [61]. Jako akceptory wodoru mogą służyć substancje organiczne, dwutlenek węgla lub jony niektórych nieorganicznych kwasów tlenowych. W środowisku beztlenowym mieszane populacje bakteryjne degradują część substancji organicznych i zużywają je jako akceptory wodoru. Powoduje to wytwarzanie równoważnej ilości substancji utlenionych i zredukowanych w tym systemie oksydoredukcyjnym.

Bakterie saprofityczne kwasowej fazy procesu beztlenowego rozkładają złożone substancje organiczne głównie do niższych normalnych kwasów tłuszczowych. Nie potrafią przeprowadzić dalszej degradacji tych produktów wskutek braku zdolności wykorzystania dogodnych akceptorów wodoru dla tego procesu. Bakterie metanowe rozkładają te kwasy tłuszczowe przez beta - oksydację do prostszych kwasów z równoczesnym wytworzeniem metanu. W tym procesie zużywają dwutlenek węgla jako akceptor wodoru. W większości przypadków, z wyjątkiem rozkładu kwasu octowego, woda odgrywa rolę donatora tlenu w tych reakcjach [62].

Jest oczywiste, że przy opisanym mechanizmie procesu i charakterze końcowych produktów reakcji, wydajność energetyczna procesu beztlenowego jest wielokrotnie mniejsza od procesów tlenowego rozkładu tych samych substratów. Wskutek tego rozkład beztlenowy jest mało wydajny w wytwarzaniu masy komórkowej. Masa czynna bakterii beztlenowych jest niewielka i wynosi około 1-3% substratów ulegających metabolizmowi [6, 71].

W poszczególnych stadiach beta - oksydacji wytwarza się kwas octowy i jakiś kwas w łańcuchu krótszym o dwa atomy węgla. Kwasy o nieparzystej ilości atomów węgla muszą wskutek tego pochodzić z innych źródeł, a nie z beta - oksydacji. Kwas octowy jest końcowym produktem, który powstaje w czasie beztlenowego rozkładu wyższych kwasów i alkoholi. W czasie aktywnej fermentacji metanowej osadów organicznych zwykle stwierdza się obecność kwasu octowego, propionowego i masłowego [8, 9, 44, 76]. Oprócz tych kwasów niekiedy obecny jest kwas mrówkowy, izowalerianowy i kapronowy [49].

W przeprowadzonych badaniach zastosowanie metody chromatografii bibułowej umożliwiło dalsze rozwinięcie obserwacji dynamiki przemian kwasów tłuszczowych w czasie fermentacji metanowej. Obserwacje te dowiodły obecności kwasu octowego, propionowego i masłowego w surowym i przefermentowanym osadzie organicznym. Ze stwierdzonej dynamiki przemian kwasów zawartych w naturalnym środowisku fermentacyjnym (rys.18, 19 i 27) wynika, że ilość kwasu masłowego nieznacznie rośnie w początkowym stadium fermentacji dobrze zaszczepionego osadu. Kwas masłowy tworzy się z beztlenowej degradacji złożonych substancji organicznych osadu (rys,18 i 19). W dalszym przebiegu fermentacji zawartość kwasu masłowego maleje w mieszaninie kwasów lotnych. Wzrasta natomiast udział procentowy kwasu octowego, który w początkowym stadium fermentacji był równy stężeniu kwasu masłowego. Kwas octowy występował nawet w końcowej fazie fermentacji, natomiast udział kwasu propionowego zanikał już po kilkunastu dniach fermentacji. Opisanemu przebiegowi towarzyszyło wytwarzanie się gazu i stały, proporcjonalny spadek ogólnej zawartości kwasów lotnych (rys.15, 16 i 17).

Interesujace wyniki dało badanie mechanizmu biochemicznego rozkładu kwasów tłuszczowych sztucznie wprowadzonych do środowiska fermentacyjnego. Badania takie przeprowadzono dla kwasu masłowego (rys.22) i kapronowego (rys.24) dodanego do fermentującej cieczy nadosadowej (rys.26). Dynamika. rozkładu naturalnych składników cieczy nadosadowej (rys.27) była zbliżona do opisanych zmian zachodzacych w czasie fermentacji osadów. od których te ciecz oddzielono (rys.18). Wskazuje to na przemiane kwasu masłowego w octowy przy równoczesnej metanogenezie. Dynamika rozkładu kwasu masłowego (rys.23) i kapronowego (rys.25) potwierdza słuszność dotychczasowych przypuszczeń o mechanizmie biochemicznych przemian, którym ulegają w czasie fermentacji niższe kwasy tłuszczowe o parzystej ilości atomów wegla [35, 36, 62]. Obserwacje te dają bezpośredni dowód występowania mechanizmu beta-oksydacyjnego w metanogenezie. Kwas kapronowy w czasie metanogenezy rozkładał się z pośrednim tworzeniem kwasu masłowego. Kwas masłowy zaś dawał metan i kwas octowy jako pośredni produkt metabolizmu.

Tabela III podaje doświadczalnie stwierdzone ilości gazu w czasie periodycznej fermentacji sześciu normalnych niższych kwasów alifatycznych wprowadzonych do przefermentowanej cieczy nadosadowej. Ilości te odnoszą się do masy 1 g tych substratów. Poróvmano te doświadczalne ilości gazu z obliczonymi z wzoru wprowadzonego przez BUSWELLa [6] dla ilościowego określenia metanogenezy. W większości przypadków z wyjątkiem kwasu octowego, doświadczalne wytwarzanie gazu było mniejsze od przewidzianych teoretycznie. Najwieksze odstepstwa stwierdzono dla kwasu propionowego. Wytwarzanie gazu z rozkładu tego kwasu wynosiło 55% ilości obliczonej. Wydaje się, że główna przyczyna tych niezgodności były zbyt duże dawki substratów, które wprowadzono w celu wywołania przeciążeń. Produkcja gazu pod wpływem niższych dawek była rzędu 72 - 84% wielkości teoretycznej i malała do około 60% przy podwojeniu dawki wprowadzonych kwasów. Można to przypisać hamującemu wpływowi nadmiaru soli kwasów tłuszczowych na aktywność bakterii metanowych [58. 59]

Wyniki kontrolnych analiz chemicznych środowiska fermentacyjnego wskazują (tabela II) na pewne zmiany wynikże wskutek przefermentowania badanych substratów. Zmiany te jednak nie wydają się istotne dla charakterystyki opisanego procesu beztlenowego rozkładu kwasów tłuszczowych.

Obserwowane procesy fermentacyjne przebiegały pod wpływem mieszanych populacji bakteryjnych. Wskutek wybiórczego działania substratów niekiedy były to kultury wzbogacone. Nie zajmowano się dokładniejszą charakterystyką mikrobiologiczna tych zespołów. Były one złożone z wielu gatunków. Warto przypomnieć, że według BARKERa [4] bakterie metanowe wykazuja ścisła specyficzność w stosunku do substratów. Dla całkowitej fermentacji metanowej różnych substratów obecnych w osadach organicznych i w upłynnionym materiale biologicznym. potrzeba współdziałania kilku gatunków bakterii metanowych. Całkowita mineralizacja nawet tak prostego związku jak kwas walerianowy prawdopodobnie przebiega przy współudziale trzech gatunków bakterii metanowych [4]. Kwas walerianowy ulega utlenieniu przez Methanobacterium suboxydans do octanu i propionianu. Drugi gatunek, Methanobacterium propionicum przemienia propionian w octan, metan i dwutlenek węgla. Dopiero Methanobacillus mazei bezpośrednio metabolizuje octan do metanu i dwutlenek wegla.

Wskutek tego dużego zróżnicowania gatunkowego nie było celowe prowadzenie obserwacji mikrobiologicznych, zmierzających do izolacji czynnych zespołów drobnoustrojów. Jest to zadanie trudne i w zasadzie możliwe tylko w bardzo wyspecjalizowanych pracowniach [4]. Praca ta byłaby również niecelowa, ponieważ próby izolacji naruszyłyby.zasadę populacji mieszanych. Biochemiczna działalność właśnie mieszanych populacji bakterii beztlenowych była przedmłotem niniejszych obserwacji. W celu stworzenia warunków porównywalnych w poszczególnych seriach doświadczeń starano się utrzymywać w miarę możności stałość biochemicznych i fizycznych warunków badania.

Za szczególne zjawisko należy uważać powstawanie metanu jako głównego produktu węglowodorowego w rozkładzie beztlenowych bardzo zróżnicowanych substratów organicznych [4, 7]. Są tylko nieliczne obserwacje powstawania innych węglowodorów na tej drodze [19]. Jest więc ciekawe, że charakter produktu nie zależy od rodzaju i struktury substratu. Dwutlenek węgla w gazie fermentacyjnym może pochodzić z procesów dekarboksylacji lub z całkowitego utlenienia jakiejś części substratu. Trudno natomiast wytłumaczyć dlaczego właśnie metan zawsze występuje jako drugi produkt rozkładu. Obecnie przyjęte zasady biochemicznego powstawania metanu opierają się głównie na pracach BERKERa [4]. Zgodnie z tymi wyobrażeniami metan może powstawać w sposób dwojaki.

Jeden z tych mechanizmów odnosi się do rozkładu kwasu octowego i metanolu. Drugi natomiast dotyczy innych kwasów i alkoholi ulegających rozkładowi. Stwierdzono, że kwas octowy ulega bezpośredniemu rozkładowi na metan i dwutlenek węgla. Metan powstaje z grupy metylowej, natomiast dwutlenek węgla pochodzi z dekarboksylacji tego kwasu. Na taki rozkład wskazują badania metanogenezy przeprowadzone z użyciem związków z atomami znaczonymi [2, 81, 82, 83]. Nie obserwuje się zużycia CO<sub>2</sub> w tym procesie i metan tworzy się równocześnie z tym związkiem. Podobny mechanizm odnosi się również do fermentacji kwasu mrówkowego i metanolu [4, 85].

Zgodnie z teorią Van NIELa [4] fermentacja metanowa kwasów i alkoholi o 4-6 atomach węgla przebiega przez oksydoredukcję. Związek ulega utlenieniu do CO<sub>2</sub>. Wodór zgromadzony w procesie tej dehydrogenacji powoduje redukcję części powstałego dwutlenku węgla do metanu [4], zgodnie z ogólnym równaniem:

 $CO_2 + 4 XH_2 \longrightarrow CH_4 + H_2O + 4 X$ 

W równaniu XH<sub>2</sub> oznacza jakiś hipotetyczny zwiążek, który wskutek aktywacji przez bakterie metanowe służy jako donator wodoru w redukcji dwutlenku węgla. Mógłby to być DPN nukleotyd dwufosfopirydynowy [62].

Wczesne obserwacje SONGENa [80] nad fermentacją mieszaniny dwutlenku węgla i wodoru wykazały, że wzbogacone kultury bakterii metanowych mogą sprzęgać utlenienie molekularnego wodoru z redukcją dwutlenku węgla zgodnie z reakcją:

 $CO_2 + 4 H_2 \longrightarrow CH_4 + 2H_2O$ 

Późniejsze prace umożliwiły wyodrębnienie czystych kultur bakterii zdolnych do takiej przemiany wolnego rozpuszczonego dwutlenku węgla [2] lub tlenku węgla [46] w metan. Zastosowanie chromatografii gazowej przez CHMIELOWSKIego i ISAACa do badania przebiegu fermentacji metanowej dostarczyło bezpośrednich dowodów dynamiki tej reakcji [11, 14]. Taki wykazany chromatograficznie przebieg redukcji dwutlenku węgla do metanu podaje rys.38. Wydawało się interesujące przeprowadzenie obserwacji nad redukcją CO, w gazach zawierających różne stężenia początkowe dwutlenku węgla w obecności doprowadzonego wodoru (rys.39, 40 i 41). W tych doświadczeniach użycie całkowicie przefermentowanego osadu stworzyzo warunki, w których dwutlenek węgla tył jedynym źródłem węgla dostępnym dla bakterii. Analiza chericzna nie stwierdziła istotnych różnic w składzie tych przefermentowanych osadów w czasie doświadczeń nad biochemiczną redukcją CO<sub>2</sub> (tabela IV). <sup>2</sup>Teoretycznie redukcji jednego mola dwutlenku węgla powo-

Teoretycznie redukcji jednego mola dwutlenku węgla powoduje powstanie jednego mola metanu i zużycie czterech moli gazowego wodoru. Dla potwierdzenia prawdopodobieństwa takiego uproszczonego przebiegu procesu było interesujące stwierdzenie.praktycznych wielkości tego stosunku. W przeprowadzonych doświadczeniach stosunek ten wahał się w granicach 3,6 do 5,0. Średnia wartość obserwacji wynosiła około 4,3 (tabela V) i była bliska wielkościom teoretycznym. Wartość ta wyznaczona przez BARKERa [3] wynosiła 3,53, natomiast MYLROIE i HUNGATE [66] znaleźli wielkość stosunku 3,8.

Oczywiście nie można spodziewać się, że redukcja dwutlenku węgla przebiega zgodnie z trywialnie uproszczonym równaniem bezpośredniej redukcji. Rozpuszczony dwutlenek węgla ulega biochemicznym przemianom w kilku stadiach pośrednich. Wydaje się, że w obecnym stanie wiadomości o biochemii fermentacji metanowej można przyjąć jako hipotezę roboczą schemat metanogenezy opracowany przez BARKERa [4]. Schemat ten uwzględnia możliwe drogi przemian związków węglowych w powstawaniu metanu. Zawiera próbę pogodzenia wiadomości o fermentacji octanu i metanolu z teorią redukcji dwutlenku węgla Van NIELa.

Zgodnie z tym schematem przypuszcza się, że CO<sub>2</sub> wraz z niezidentyfikowanym związkiem organicznym XH daje karboksylową pochodną XCOOH. Związek ten ulega redukcji w trzech kolejnych stadiach do pochodnej metylowej XCH., która w dalszej redukcji daje metan i odtwarza związek XH jako akceptor QO<sub>2</sub>. Przypuszczalnie metanol i octan reagują również ze związkiem XH dając produkt pośredni XCH<sub>3</sub>, który występuje w schemacie redukcji CO<sub>2</sub>. Bezpośrednie powstawanie związku pośredniego XCH<sub>3</sub> z organicznych donatorów metylu może hamować zużycie CO<sub>2</sub> przez obniżenie stężenia związków XH i w ten sposób utrudnić redukcję CO<sub>2</sub>.



Niewątpliwie rzeczywisty mechanizm powstawania metanu i redukcji dwutlenku węgla jest bardziej złożony. Jednak ten dość prymitywny schemat BARKERa stanowi użyteczne uogólnienie metanogenezy.

Można było przewidywać, że podobne populacje drobnoustrojowe w różnych komorach fermentacyjnych mogą w podobnych warunkach doświadczenia wytwarzać gaz fermentacyjny o podobnym składzie. Jednakże w przypadku kultur mieszanych, jakie uczestniczą w beztlenowej fermentacji metanowej, nie można było przewidzieć wpływu przeciążenia organicznego na skład gazu. Okazało się, że nie było istotnych różnic w składzie gazu pochodzącego z komór fermentacyjnych o różnym obciążeniu (rys.13). Zawartość metanu oznaczona chromatograficznie w gazie fermentacyjnym komór pracujących metodą ciągłą była w granicach zwykle obserwowanych. Nieco niższe stężenia CO, stwierdzone w przeprowadzonych badaniach (rys.13) można przypisać doskonałemu mieszaniu i utrzymywaniu homogennego środowiska reagujących materiałów. Małe stężenie azotu w gazie fermentacyjnym obecne w chwili uruchomienia komory wskutek niecałkowitej ewakuacji powietrza, zanika w czasie dalszego przebiegu fermentacji (rys.4).

Z obserwacji wynika, że nie można osiągnąć wzrostu zawartości metanu powyżej zwykle osiąganych granic tylko przez stosowanie urządzeń zapewniających ścisły kontakt fermentującej masy z fazą gazową. Takiej wzmożonej metanogenezy spodziewano się w niektórych pracach [47]. Stoi to jednak w sprzeczności z biochemią fermentacji metanowej. W celu uzyskania bardziej ekonomicznego stosunku metanu do dwutlenku węgla należałoby wprowadzić bardziej drastyczne zmiany warunków fermentacji [14].

Wyniki badań nad fermentacją metanową różnych substancji potwierdzają pogląd, że wahania w składzie substratów wpływają na ilość i skład gazu. Nie mają jednak widocznego wpływu na biochemię rozkładu beztlenowego [35]. Wskutek tego badanie ilości i składu gazu nie daje wglądu w mechanizm fermentacji metanowej.

W fermentacji osadów organicznych drugim ważnym produktem obok gazu fermentacyjnego jest osad przefermentowany. Jest to produkt częściowej lub całkowitej humifikacji niektórych związków organicznych. Humifikacja oznacza przemianę tych substancji w ciemną, stabilną masę niepodatną na dalsze działanie bakterii.

Ogólnie wiadomo, że stabilizacji osadów organicznych towarzyszy niszczenie struktury koloidalnej i wzrost hydrofobności osadu przefermentowanego. Przeprowadzone doświadczenia had ciągłą fermentacją osadów organicznych nie wykazały istotnej różnicy w stopniu rozkładu substancji osadów przefermentowanych w komorach o 20 i 10 dniach zatrzymania. Osad pochodzący z komory o 6,7 dniach fermentacji wykazywał gorsze własności (tabela I). Podobnie filtracyjność osadu przefermentowanego z tej komory była znacznie gorsza od filtracyjności osadów przefermentowanych w komorach o dłuższym czasie zatrzymania (rys.14). Wskazuje to, że zbyt krótki czas fermentacji obniża zdolności odwadniania się przefermentowanych osadów.

### Fermentacja metanowa metodą ciągłą z wysokim obciążeniem

Beztlenowy rozkład substancji organicznych przebiega w serii procesów biochemicznych, powodowanych przez drobnoustroje. Biorąc pod uwagę ten szczególny charakter procesu można postulować założenia projektowe i technologiczne komór fermentacyjnych. Zmierzają one do przejścia z konwencjonalnych metod technologicznych na metody wysokiego obciażenia [73. 74]. Jest to możliwe wskutek stworzenia w komorach fermentacyjnych optymalnych warunków rozwoju bakterii fermentacji metanowej. Można spodziewać się, że najważniejszy z tych czynników dla mezofilnej fermentacji metanowej to stała temperatura procesu w pobliżu 32°C, bliska optimum rozwoju bakterii metanowych, oraz intensywne mieszanie zawartości komory. Ważne jest utrzymywanie stałego środowiska w granicach pH 6.8 do 7.5 oraz równomierne zasilenie komory przez substrat wstepnie podgrzany do temperatury fermentacji, Zagadnieniem czasu fermentacji wysoko-obciażonych komór interesowano się od dawna. Obserwacje RANKINa [70] wskazują, że czas fermentacji jest najwłaściwszym parametrem charakteryzującym ten proces.

Według SAWYERa [74] zachowanie się komory i charakter produktów końcowych fermentacji bardziej zależy od czasu fermentacji niż od ładunku organicznego. MORGAN [65] stosował w laboratoryjnych i półtechnicznych badaniach czas fermentacji 7 do 12 dni. TORPEY [88] podaje informacje z obserwacji półtechnicznych, które wskazują, że można uzyskać zadowalający rozkład anaerobowy w czasie fermentacji rzędu 11 do 15 dni. SAWYER i ROY [72] w warunkach laboratoryjnych uzyskali zadowalające wyniki fermentacji przy zastosowaniu czasu fermentacji 6 do 20 dni. Niedawno SAWYER [73] przeprowadził dyskusję czynników wpływających na fermentację metanową komór wysoko beiążonych.

Wyniki przytoczonych prac wskazują, że fermentacja ciągła w komorach wysoko obciążonych przebiega należycie przy czasie fermentacji 10 do 14 dni. Odpowiada temu obciążenie 3-4 kg/m<sup>-</sup>/24 h suchej substancji związków organicznych doprowadzanych w osadzie surowym do komory [55]. Wydajność gazu w 1 m objętości czynnej tak obciążonej komory wynosi około 1,0 do 1,5 m<sup>3</sup>/24 h. Wyniki tych prac [53, 55] pozwalają przypuszczać, że będzie można skrócić czas fermentacji do 5 dni i zwiększyć obciążenie komór nawet do 8 kg/m<sup>3</sup>/24 h. Są jednak głosy krytyczne przeciwko tak daleko posuniętemu skracaniu czasu przebywania w komorze [37]. Zbyt krótki czas fermentacji obniża zdolność do odwadniania się osadu przefermentowanego, co stwarza trudności w dalszej przeróbce tego materiału.

W oparciu o te zasadnicze wiadomości wydawało się interesujące przeprowadzenie szczegółowych obserwacji wpływu czasu fermentacji na końcowe produkty komory fermentacji metanowej. W kontrolowanych warunkach przeprowadzono badania nad wpływem czasu fermentacji w granicach od 6,7 do 20 dni na zachowanie się komór fermentacyjnych (rys.7, 8 i 9). W przeprowadzonych badaniach laboratoryjnych 10-dniowy czas fermentacji okazał się optymalny dla pracy komory fermentacyjnej. Odpowiada to 10% dobowej wymianie osadu. Obserwacje te potwierdzały analizy rozkładu substancji organicznych osadu (tabela I).

Badania nie wykazały istotnej różnicy stopnia rozkładu substancji organicznych osadów wytwarzanych przez Komory A i B o 20 i 10-dniowym czasie fermentacji, Osad przefermentowany pochodzący z Komory C o 6,7 dniach zatrzymania wykazywał gorsze własności (tabela I). Podobne własności filtracji osadów pochodzących z komór o 20 i 10 dniach fermentacji wskazują, że degradacja związków organicznych, stabilizacja i rozkład substancji koloidalnych był podobny w obu tych komorach, Filtracyjność osadu z komory o 6,7 dniach fermentacji była znacznie niższa od poprzednich wielkości i zbliżała sie do filtracviności osadu surowego (rys.14). Pomiary filtracyjności wydają się potwierdzać wniosek, że 10-dniowy. czas fermentacji osadu był optymalny w warunkach przeprowadzonych doświadczeń. Natomiast 6.7-dniowy czas fermentacji powodował przeciążenie komory fermentacyjnej. Obciążenie Komory B substancjami organicznymi było dwukrotnie wyższe od Komory A. Komora C była obciążona trzykrotnie większym ładunkiem substancji gnilnych. Wywołało to około dwukrotnie większe wytwarzanie gazu przez Komorę B w porównaniu z Komorą A. Natomiast produkcja gazu w Komorze C była zahamowana (rys.10). Stwierdzono dobową szybkość wytwarzania gazu wynoszącą 900, 1600 i 1300 ml na litr obję-tości czynnej komór o 20, 10 i 6,7 dniach fermentacji. Szybkość wytwarzania gazu przez przeciążoną Komorę C była w przybliżeniu o połowę mniejsza od przewidywanej na podstawie żachowania się Komory A. Potwierdza to pogląd, że zgazowanie osadu podlega ograniczeniu przez obciążenie substancjami organicznymi wieksze od wielkości krytycznych. Słuszny wydaje się wniosek, że przeciążenie to spowodowało niestabilność

Komory C (rys.9), podczas gdy dwie pozostałe komory zachowywały się prawidłowo (rys.7 i 8).

Na przeciążenie Komory C substancjami organicznymi wskazują również obserwacje fermentacji periodycznej, przeprowadzonej po przerwaniu codziennego zasilania (rys.11 i 12). Wskazują one, że proces fermentacyjny w Komorze C o 6,7 dniach fermentacji był podporządkowany kinetyce zerowego rzędu. W takich warunkach przepływowa komora o pełnym zmieszaniu nie może dać stabilnego produktu.

Nie stwierdzono natomiast istotnych różnic w składzie gazu, wytwarzanego przez komory o różnym czasie fermentacji. Przy pomocy analiz chromatograficznych stwierdzono zawartość metanu w granicach 70 do 79% (obj.) dwutlenku węgla 21 do 30% i niewielkie ilości azotu.

Wydaje się więc, zgodnie z informacjami literatury [74], że wysoko obciążona komora fermentacyjna może pracować w warunkach 10-dniowego czasu fermentacji bez zakłóceń, strat wytwarzania gazu i obniżenia jakości osadu. Natomiast stosowanie krótszego czasu fermentacji byłoby utrudnione w praktyce. Wyniki uzyskane w przeprowadzonych badaniach laboratoryjnych nie można uważać za reprezentatywne dla skali technicznej. Nie można spodziewać się, aby w praktyce dało się utrzymać taką stałość parametrów ruchu komór. Zasilanie, mieszanie i temperatura nie dadzą się kontrolować w zakresie możliwym w laboratorium. Niektóre jednakże informacje otrzymane w tych badaniach laboratoryjnych mogą być użyteczne w praktyce technologicznej.

Najbardziej efektywny rozkład biochemiczny w komorach przepływowych następuje, gdy szybkość wymiany masy reagującej jest równa szybkości wzrostu mikroflory. Z tego wynika, że maksymalne obciążenie komory, wyrażone w % czynnej objętości na jednostkę czasu, nie może przewyższać procentowego wzrostu populacji bakterii metanowych w tym okresie. MALINSOWA [53] w ciekawej pracy wykazała, że obecne normy maksymalnego dopuszczalnego obciążenia w fermentacji mezofilnej można znacznie zwiększyć, jeżeli weźmie się pod uwagę szybkość wzrostu tych bakterii. Stwierdza, że maksymalne obciążenie w przypadku fermentacji osadów organicznych wynosi 17% dziennej wymiany. Odpowiada temu czas fermentacji 5,9 dnia. Wyniki niniejszej pracy wskazują jednak, że już 15% (Komora C) zasilania powodowało wyraźne przeciążanie fermentacji (rys.9 i 12).

Dopóki można utrzymać w komorze fermentacyjnej równowagę mikroflory wytwarzającej kwasy i produkującej metan, niewiele jest problemów eksploatacyjnych w ustalonym ruchu komór. Substancję organiczne wprowadzone do komory ulegają przemianie w gaz fermentacyjny i osad przefermentowany. Nagłe jednak, uderzeniowe zwiększenie ładunku substancji gnilnych powoduje tworzenie się nadmiaru lotnych kwasów organicznych i stopniowe zakwaszanie środowiska. Nawet nieznaczne obniżenie pH wpływa na obniżenie aktywności bakterii metanowych, co w rezultacje może prowadzić do dalszych trudności ruchowych. Zastanawiająca jest ta duża czułość procesu fermentacji metanowej na uderzeniowe przeciążenia.

W projektowaniu wydzielonych komór fermentacyjnych często przyjmuje się obciążenie 1,33 kg/m<sup>-</sup>/24 h związków organicznych [25, 40]. Jeżeli założy się, że 40 - 50% substancji lotnych osadów organicznych nie ulega rozkładowi wskutek odporności na biologiczne utlenienie [62], rzeczywisty ładunek substancji gnilnych wynosi około 0.6 kg/m-/24 h. Komory fermentacyjne pracują z dość długim czasem przepływu przy wysokim poziomie ogólnej suchej pozostałości. Nie jest wiec niespodzianką, że masa aktywnych drobnoustrojów jest bardzo mała w porównaniu z ogólną ilością suchej substancji organicznej. Ilość substratu przetworzona w syntezie nowych komórek bakterii beztlenowych nie przekracza 1-3% [6.71]. Ta niska populacja drobnoustrojów powoduje skłonność komór fermentacyjnych do zaburzeń ruchowych wskutek nawet niewielkich uderzeniowych przeciażeń. Zaburzenia te objawiają się zakwaszeniem, spadkiem produkcji gazu i pogorszeniem własności dehydratacyjnych osadu przefermentowanego.

Wysoko obciążona komora fermentacyjna powinna pracować w warunkach, które zapewniają maksymalny rozwój flory bakteryjnej, maksymalną wydajność rozkładu substancji organicznych oraz pewną zdolność przyjmowania uderzeniowych dawek substratów.

Dlatego komora taka powinna reprezentować reaktor quasi ciągły typu cysternowego z całkowitym zmieszaniem zawartości komory z masą zasilającą. Ważne jest, aby stosunek obciążenia organicznego do aktywnej masy drobnoustrojów nie przekroczył określonego stosunku krytycznego. Wprawdzie w warunkach nadmiaru substratu drobnoustroje będą w fazie logarytmicznego wzrostu. Szybkość tego wzrostu będzie limitowana tylko przez czas generacji i osiągnie stałą maksymalną wartość. Jednak w warunkach pełnego zmieszania substratów z masą fermentującą wystąpi tylko ograniczona stabilizacja odpływu komory. Stężenie substancji organicznych w masie reakcyjnej musi być przecież wysokie, aby zapewnić logarytmiczny, nieograniczony wzrost drobnoustrojów. Oznacza to, że nie można wytworzyć stabilnego odpływu z komory, w której fermentacja przebiega w warunkach kinetyki zerowego rzędu. Odpowiada to stanom przeciążenia komór fermentacyjnych.

Z podanych przyczyn wynika, że komorę fermentacji metanowej należy uważać za reaktor quasi - ciągły o całkowitym zmieszaniu. Komora winna pracować w warunkach kinetyki pierwszego rzędu. Wtedy szybkość rozkładu będzie funkcją stężenia substratu w dowolnym czasie. Wpływ z takiej komory odpowiadający składowi masy reakcyjnej zmieszanej z substratem będzie wykazywał dostateczną stabilizację.

### Test na przeciążenie komory fermentacyjnej

W praktyce ruchowej odczuwa się brak prostego sposobu oceny warunków pracy komór fermentacyjnych. Jest to szczególnie ważne dla komór wysoko-obciążonych, które eksploatuje się w warunkach bliskich maksymalnej wydajności, gdy łatwo może nastąpić przeciążenie tych urządzeń. Kontrola analityczna stężenia kwasów lotnych lub pH ujawnia poważniejsze zaburzenia wywołane przez zakwaszenie komory. Pomiar filtracyjności lub zawartości substancji lotnych w osadzie przefermentowanym często daje wyniki niejednoznaczne. Nielma więc bezpośredniego sposobu określenia przeciążeń komory fermentacyjnej.

Na podstawie matematycznej analizy kinetyki wytwarzania gazu można zaproponować test na przeciążenie komory fermentacyjnej. W przeprowadzonych badaniach można było śledzić przebieg szybkości wytwarzania gazu w laboratoryjnych komorach fermentacyjnych po zaprzestaniu zasilania (rys.12). W czasie takiej próby zbiornikowej kinetyka wydzielania gazu ujawniła warunki pracy komory w momencie przerwania fermentacji ciągłej.

W analogiczny sposób można traktować próbę masy fermentującej, pobranej z wypływu komory badanej w skali przemysłowej. Ponieważ komora taka pracuje w warunkach całkowitego zmieszania, skład mieszaniny reagującej jest identyczny ze składem masy usuwanej z reaktora. Pobraną próbę należy umieścić w laboratoryjnej komorze fermentacyjnej i przemyć gazem fermentacyjnym lub innym gazem obojętnym w celu stworzenia warunków beztlenowych. Kilkudniowy pomiar dobowej szybkości wytwarzania gazu przez izolowaną próbę w temperaturze fermentacji komory ruchowej umożliwi charakterystykę tej komory. Z przeprowadzonych doświadczeń (rys.7, 8, 9, 10, 11, 12 i 14) oraz z poprzednich prac CHMIELOWSKIego i współpracowników [14] wynika, że stabilny produkt fermentacji osadów można uzyskać tylko z komór, które pracują w warunkach umożliwiających rozkład substancji organicznych zgodny z kinetyką reakcji pierwszego rzędu. Są to komory nieprzeciążone. Osad pobrany z komory o dostatecznym czasie fermentacji wykazuje wytwarzanie gazu zgodne z tą kinetyką (rys.11 i 12). Dobowa szybkość fermentacji w kontrolowanej komorze jest podporządkowana stężeniu substratów. Komora taka spełnia warunki stawiane dla eksploatacji reaktorów o całkowitym zmieszaniu substratów z masą reagującą.

Izolowana próba pobrana z komory przeciążonej wykazuje stałą szybkość wytwarzania gazu przez określony czas obserwacji (rys.12 i 21). Fermentacja przebiega w warunkach nadmiaru substratu spowodowanego przez przeciążenie. Okres ten można podporządkować kinetyce reakcji zerowego rzędu. Po upływie określonego czasu nastąpi spadek szybkości wytwarzania gazu zgodny z równaniem pierwszego rzędu. Czas, w którym utrzymuje się stała szybkość wytwarzania gazu przez izolowaną próbę może służyć jako umowny miernik przeciążenia komory fermentacyjnej.
## STRESZCZENIE

Fermentacja metanowa jest złożonym procesem biochemicznym, który zwykle przebiega pod wpływem mieszanych populacji bakteryjnych. W warunkach należytego zaszczepienia i zmieszania faza fermentacji kwasowej i metanowej przebiega w równowadze. Badania wykazały, że pomimo tej szczególnej złożoności proces podporządkowuje się ogólnym prawidłowościom kinetyki procesów enzymatycznych. Naża szybkość wzrostu bakterii metanowych stwarza warunki, w których ilość enzymatycznie czynnej masy można praktycznie uznać za stałą w czasie krótkotrwałej obserwacji. Wtedy w nadmiarze metabolizowanych substratów szybkość fermentacji jest stała i zależna tylko od ilości enzymatycznie czynnej masy komórek bakteryjnych. Taki stan przeciążenia substratami odpowiada warunkom kinetycznej reakcji zerowego rzędu. Kinetyka procesu pierwszorzędowego ujawnia sie dopiero od chwili przekroczenia określonego granicznego steżenia substratu.

Wyniki przeprowadzonych doświadczeń prowadzą do wniosku, że niezależnie od rodzaju substratu, ogólny przebieg fermentacji metanowej można opisać przez dwa następujące po sobie równania kinetyczne: zerowego i pierwszego rzędu. W warunkach metody zbiornikowej taką regularność wykazuje fermentacja metanowa różnych substratów: złożonych osadów organicznych, niższych kwasów alifatycznych lub dwutlenku węgla w obecności wodoru.

Badania wykazały, że zgodność kinetyki fermentacji metanowej z przebiegiem reakcji zerowego i pierwszego rzędu nie jest przypadkowa. Proponowany matematyczny opis tej kinetyki traktuje się jednak jako dogodny sposób idealizowania wyników doświadczalnych. Pozwala on na ujednolicenie poglądu na przebieg fermentacji metanowej i przewidywanie kinetyki tego procesu, przydatne w projektowaniu i eksploatacji komór fermentacyjnych o wysokim obciążeniu.

Na tej podstawie można również oprzeć doświadczalny test na przeciążenie komory.

Przebieg fermentacji metanowej w warunkach procesu ciągłego można uważać za sumę procesów o kinetyce periodycznej, wielokrotnie powtarzających się z częstotliwością zasilania. Skrócenie czasu przebywania w reaktorze przepływowym poniżej wartości krytycznej wywołuje przeciążenie, które powoduje podporządkowanie się procesu kinetyce zerowego rzędu. W komorze fermentacyjnej o całkowitym zmieszaniu masy reagującej z zasilającym substratem uniemożliwia to uzyskanie stabilnego produktu. Taki stabilny produkt fermentacji w procesie ciągłym można otrzymać, jeżeli komora fermentacyjna jest obciążona w granicach umożliwiających przebieg degradacji związków organicznych zgodny z kinetyką reakcji pierwszego rzędu.

Przeprowadzenie szczegółowych badań kinetyki fermentacji metanowej było możliwe w oparciu o opracowaną manometryczną metodę pomiaru wytwarzania gazu fermentacyjnego i przemian gazowych w warunkach izotermiczno-izochorycznych. Opracowano również chromatograficzne metody analizy gazu fermentacyjnego i gazów reagujących w czasie biochemicznej redukcji dwutlenku wegla do metanu w obecności wodoru.

Badanie mechanizmu fermentacji metanowej oparto na chromatografii bibułowej. Stwierdzona dynamika degradacji niższych kwasów alifatycznych potwierdza słuszność dotychczasowych przypuszczeń o mechaniźnie biochemicznych przemian, którym ulegają te pośrednie produkty fermentacji. Obserwacje te dają bezpośredni dowód występowania mechanizmu beta oksydacyjnego w metanogenezie. Kwas kapronowy w czasie tej metanogenezy rozkładał się z pośrednim tworzeniem kwasu masłowego. Kwas masłowy zaś dawał metan i kwas octowy jako pośredni produkt metabolizmu. Kwas octowy podlegał rozkładowi do metanu i dwutlenku węgla.

# KINETICS AND MECHANISM OF METHANE FERMENTATION Jerzy Chmielowski

#### Summary

The methane fermentation is a complex biochemical process, which is usually brought about by the mixed bacterial populations. Under the conditions of adequate seeding and mixing, the acid fermentation stage and methane formation stage of anaerobic digestion are in equilibrium. The investigations have shown, that in spite of this particular complexity, the process is in agreement with the general laws govering kinetics of the enzymatic reactions. The small growth rate of methane bacteria causes conditions, under which the amount of enzymatically active mass may be practically considered as being constant during the short time of observations. Then, at the abundance of metabolized substrates. the fermentation rate is constant and depends only on the amount of enzymatically active mass of bacterial cells. Such a condition of overloading with substrates can be approximated by a zero-order kinetic reaction. The kinetics of first-order reaction appears only below a critical concentration of a substrate.

The results obtained from these studies lead to the conclusion, that with no regard to the kind of the reacting substrate, the general course of the methane fermentation may be formulated by two consecutive kinetic equations of zero- and first-order reaction. Under the conditions of the batch process such a regularity is displayed by the methane fermentation of various substrates: complex organic sludges, lower aliphatic acids or carbon dioxide in presence of molecular hydrogen.

The investigations have shown, that the conformity of kinetics of methane fermentation with the course of zeroand first-order reactions is not casual. The suggested mathematical formulations of this kinetics should be understood, however, as a convenient method of representing the experimental results. It allows to get a uniform view upon the course of methane fermentation and to predict kinetics of the anaerobic digestion. This may be useful in the design and operation of high-rate digestion tanks. The experimental test for overloading may be also based on these mathematical formulations.

The course of methane fermentation under the conditions of continuous process may be explained as a sum of processes with batch kinetics, repeating themselves many times according to the frequancy of feading. The shortening of the detention time in the such reactor below the critical value causes an overloading, which results in conformity to the kinetics of zero-order reaction. This makes impossible to obtain a stable product from the digestion tank with a complete mixing of the reacting mass with the fed substrate. Such a product may be obtained in a continuous process if the fermentation tank is loaded in the limits enabling the course of degradation of metabolized compounds conformable to the first-order kinetics.

The deteiled investigations of the methane fermentations kinetics were possible owing to the method of manometric measurements of the gas production and the course of gaseous reactions under the isothermic-isochoric conditions. The gaschromatografic methods were employed for analysis of fermentation gas and reacting gases during the biochemical reduction of carbon dioxide to methane in presence of molecular hydrogen.

The investigation of the mechanism of methane fermentation has been based on the paper chromatography. The degradation dynamics of lower aliphatic acids found, confirms the validity of existing opinion refering to the mechanism of biochemical reactions of the intermediate fermentation products. These observations give a direct proof of occurence of the beta-oxidation mechanism in the methanogenesis. During the latter process the capronic acis was decomposed with intermediate formation of butyric acid, which gave methane and acetic acid as the intermediate product of metabolism. The acetic acid was decomposed to methane and carbon dioxide.

## LITERATURA

- [1] BACKMEYER D.P.: "How to Avoid Sour Digesters" Water and Sewage Works <u>102</u>, 369 (1955).
- [2] BARKER H.A., RUBEN S. i KAMEN M.D.: "The Reduction of Radioactive Carbon Dioxide by Methane - Producing Bacteria" - Proc.Nat.Acad.Sci <u>26</u>, 426 (1940).
- [3] BARKER H.A.: "Studies on the Methane Fermentation. VI. The Influence of Carbon Dioxide Concentration on the Rate of Carbon Dioxide Reduction by Molecular Hydrogen"
  Proc.Nat.Acad.Sci 29, 185 (1943).
- [4] BARKER H.A.: "Biological Formation of Methane" Ind.Eng. Chem. 48, 1438 (1956).
- [5] BRAY H.G. i WHITE K.: "Kinetics and Thermodynamics in Biochemistry" - Churchill Ltd, London (1957).
- [6] BUSWELL A.M. i HATFIELD ".D. "Anaerobic Fermentations" - Illinois State Water Survey, Bull. No 32 (1939).
- [7] BUSWELL A.M.: "Fermentations in Waste Treatments" w "Industrial Fermentations", t.II Chemical Pub., New York (1954).
- [8] BUSWELL A.M., BORING III, J.R. i MILAM J.R.: "A Paper Chromatographic Method for Volatile Acids" - J.Water Pollut.Contr.Federat. <u>32</u>, 721 (1960).
- [9] BUSWELL A.M., GILCREAS F.W. i MORGAN G.B.: "Experience with Paper Chromatography for Volatile Acids Determinations" - J.Water Pollut.Contr. Federat. <u>34</u>, 307 (1962).
- [10] CHMIELOWSKI J.: "Production of Hydrocarbons from Sewage Sludge. Preliminary Trials on the Analysis of Fermentation Gas by Gas Chromatography" - Report on Research Carried out by the Public Health Engineering Section, Department of Civil Engineering, King's College, University of Durham (1958).

- [11] CHMIELOWSKI J. i ISAAC P.C.G.: "An Investigation of the Bacterial Production of Methane by Gas Chromatography" - Fourth International Congress of Biochemistry, Vienna (1958); International Abstracts of Biological Science, str.200, Pergamon Press, London (1958).
- [12] CHMIELOWSKI J., SIMPSON J.R. i ISAAC P.C.G.: "Use of Gas Chromatography in Sludge Digestion" - Sew.Ind. Wastes <u>31</u>, 1237 (1959).
- [13] CHMIELOWSKI J., SIMPSON J.R. i ISAAC P.C.G.: "The Gas Chromatographic Investigation of Methane Production by High-Rate Anaerobic Digestion on the Laboratory Scale". XVII. Internationaler Kongress für Reine und Angewante Chemie, München, (1959). Abstracts of Papers, (C-210) str:90.
- [14] CHMIELOWSKI J. i ISAAC P.C.G.: "Gas-Chromatographic Observation of the Reduction of Carbon Dioxide to Methane during Anaerobic Digestion" - Nature <u>183</u>, 1120 (1959).
- [15] CHMIELOWSKI J.: "Badania gazowo-chromatograficzne nad fermentacją metanową" - w druku.
- [16] COACLEY P.: "Laboratory Scale Filtration Experiments and their Applications to Sewage Sludge Dewatering" w "Biological Treatment of Sewage and Industrial Waste. II. Anaerobic Digestion and Solid-Liquid Separation" -Reinhold Pub.Co., New York (1958).
- [17] COPELAND W.R.: "Basic Elements of Digester Operation" -Sew.Ind.Wastes 27, 224 (1955).
- [18] DAWES E.A.: "Quantitative Problems in Biochemistry" -Livingstone Ltd, Edinburgh (1956).
- [19] DAVIS J.B. i SQUIRES R.M.: "Detection of Microrially Produced Gaseous Hydrocarbons Other than Methane" -Science <u>119</u>, 381 (1954).
- [20] DIXON M.: "Manometric Methods", University Press, Cambridge (1951).
- [21] ECKENFEIDER W.W. i WESTON R.F.: "Kinetics of Biological Oxidation" w "Biologial Treatment of Sewage and Industrial Wastes. I. Aerobic Oxidation" Reinhold Pub. Co., New York (1956).

- [22] ECKENFELDER W.W. i McCABE B.J.: "Process Design of Biological Oxidation Systems for Industrial Waste Treatment" w "Waste Treatment" Pergamon Press, Oxford (1960).
- [23] ECKENFELDER W.W. i O'CONNOR D.J.: "Biological Waste Treatment" - Pergamon Press, Oxford (1961).
- [24] FAIR G.M. i MOORE E.W.: "Heat and Energy Relations in the Digestion of Sewage Solids. II. Mathematical Formulation of the Course of Digestion" - Sewage Works J. 4. 428 (1932).
- [25] FSIWA Manual of Practice No 8 "Sewage Treatment Plant Design" - FSIWA, Washington, (1956).
- [26] GOLUEKE C.G.: "Temperature Effects on Anaerobic Digestion of Raw Sewage Sludge" - Sew.Ind.Wastes <u>30</u>, 1225 (1958).
- [27] GRABOWSKI Z.R.: "O niektórych metodach badania kinetyki procesów enzymatycznych" - Postępy Biochemii 8, 3 (1962).
- [28] GRIFFITHS J.: "The Practice of Sludge Digestion" w "Waste Treatment" - Pergamon Press, Oxford (1960).
- [29] GRUNE W.N., CARTER J.V., Jr i KEENAN J.P.: "Development of Continuous Gas Chromatographie Analyzer for Sludge Digestion Studies" - Sew.Ind.Wastes 28, 1433 (1956).
- [30] GRUNE W.N., BARTHOLOMEW D.D. i HUDSON G.I., Jr.: "Effects on Radioactive Materials on Anaerobic Digestion. I. Radiophosphorus" - Sew. Ind.Wastes <u>30</u>, 1123 (1958).
- [31] GRUNE W.N., BARTHOLOMEW D.D. i HUDSON G.I., Jr.: "Effects on Radioactive Materials on Anaerobic Digestion.II. Radioiodine". - Sew.Ind.Wastes 30, 1399 (1958).
- [32] GRUNE W.N., CHUN-FEI CHUEN, HAWKINS J.M.: "Gas Chromatography for Waste Treatment Control" - J.Water Pollut. Contr.Federat. 32, 942 (1960).
- [33] HEUKELEKIAN H. i HEINEMANN B.: "Studies on the Methane - Producing Bacteria I. Development of a Method for Enumeration" - Sewage Works J. <u>11</u>, 426 (1939).
- [34] HEUKELEKIAN H. i HEINEMANN B.: "Studies on the Methane--Producing Bacteria. II. Enumeration in Digesting Sewage Solids" - Sewage Works J. <u>11</u>, 436 (1939).

- [35] HEUKELEKIAN H.: "Basic Principles of Sludge Digestion" - w "Biological Treatment of Sewage and Industrial Wastes. II. Anaerobic Digestion and Solid-Liquid Seperation" Reinhold Pub.Co., New York (1958).
- [36] HEUKELEKIAN H. i MUELLER P.: "Transformation of some Lipids in Anaerobic Sludge Digestion" - Sew.Ind. Wastes 30, 1108 (1958).
- [37] HINDIN E. i DUNSTAN G.H.: "Effect of Dotention Time on Anaerobic Digestion" - J.Water Pollut.Contr.Federat. 32, 930 (1960).
- [38] HISCOX E.R. i BERRIDGE N.J.: "Use of Paper Partition Chromatography in Identification of Volatile Fatty Acids" - Nature <u>166</u>, 522 (1950).
- [39] HUNGATE R.E.: "The Anearobic Mesophilic Cellulolytic Bacteria" - Bacteriological Reviews 14, 1 (1950).
- [40] IMHOFF K., FAIR G.M.: "Sewage Treatment" J.Wiley, New York (1956).
- [41] JANAK J.: "Chromatograficka semimikroanalysa plynu, II. Analysa zemnich plynu a stanoveni methanu v dulnich vetrech" - Chem. listy 47, 828 (1953).
- [42] JANAK J.: "Chromatograficka semimikroanalysa plynu IV. Analysa plynnych parafinu". Chem.listy <u>47</u>, 1184 (1953).
- [43] JANAK J.: "Chromatograficke semimikroanalysa plynu. VI. Analysa vzaenych plynu". Chem.listy 47, 1348 (1953).
- [44] KAPLOVSKY A.J.: "Volatile Acid Production during Digestion of Seeded, Unseeded, and Limed Fresh Solids" -Sew.Ind.Wastes 23, 713 (1951).
- [45] KAPLOVSKY A.J.: "Activity of Microorganisms in Organic Waste Disposal. III. Anaerobic Decomposition of Waste Solids". J.Applied Microbiol. 5, 175 (1957).
- [46] KLUYVER A.J. i SCHNEILEN CH.G.T.P.: "On the Fermentation of Carbon Monoxide by Pure Cultures of Methane Bacteria" - Arch.Biochem. 14, 57 (1947).
- [47] KOUNTZ R.R. i NESBITT J.B.: "A Bacterium Looks at Anaerobic Digestion" - w "Bilogical Treatment of Sewage and Industrial Wastes. II. Anaerobic Digestion and Solid Liquid Separation" Reinhold Pub.Co., New York (1958).

- [48] LIEBMANN H.: "Der neunste Stand der Kenntnisse über die Biologie der Methanbacterien" - w "Gewinnung und Verwertung von Methan aus Klärschlamm und Mist" - R.Oldenbourg Verlag, München (1956).
- [49] LIUBIMOW W.I. i KAGAN Z.S.: "Dinamika lietuczich organiczeskich kisłot, obrazujuszczichsja pri anaerobnom razłożenii organiczeskich wieszczestw mikroorganizmami w mietantienkach" - Mikrobiołogija 27, 484 (1958).
- [50] LOHMEYER G.: "A Review od Sludge Digestion" Sew.Ind. Wastes 31, 221 (1959).
- [51] LOVELOCK J.E.: "A Sensitive Detector for Gas Chromatography" Jour.Chromatogr., 1, 35 (1958).
- [52] LOVELOCK J.E., JAMES A.T. i PIPER E.A.: "A New Type of Jonization Detector for Gas Chromatography" - Annals of the New York Academy of Science <u>72</u>, 720 (1959).
- [53] MALINSOWA M., MASLENNIKOW H.A. i CHOWANSKIJ G.S. -"Skorost prirosta bakterij mietanowego brożenija" -Wodosnabżenije i Sanitarnaja Tiechnika Nr 4, 36 (1959).
- [54] MANGANELLI R.M. i BROFAZI Z.R.: "Quantitative Determination of Volatile Acids by Paper Chromatography for Application to Sewage Sludge Digestion" - Anal. Chem. 29, 1441 (1957).
- [55] MANDES Z.: "Fermentacja metanowa osadów ze ścieków miejskich w komorach wysokoobciążonych" - Gaz, Woda, Technika Sanitarna 35, 55 (1961).
- [56] MAU G.E.: "Applying Recent Research to Design of Separate Sludge Digesters" - Sew.Ind. Wastes 28, 1199 (1956).
- [57] McCABE B.J. i ECKENFEIDER W.W.: "BOD Removal and Sludge Growth in the Activated Sludge Process" - J.Water Pollut.Contr.Federat. 33, 258 (1961).
- [58] McCARTY P.L. i McKINNEY R.E.: "Volatile Acid Toxicity in Anaerobic Digestion" - J.Water Pollut Contr.Federat. 33, 223 (1961).
- [59] McCARTY P.L. i McKINNEY R.E.: "Salt Toxicity in Anaerobic Digestion" - J.Water Pollut.Contr.Federat. 33, 399 (1961).

- [60] MCKINNEY R.E.: "Biocatalysts and Waste Disposal. I.Fundamental Biochemistry of Waste Disposal" - Sew.Ind.Wastes 25, 1129 (1953).
- [61] MCKINNEY R.E. i CONWAY R.A.: "Chemical Oxygen in Biological Waste Treatment" - Sew.Ind.Wastes 29. 1097 (1957).
- [62] McKINNEY R.E.: "Microbiology for Sanitary Engineers" -McGraw-Hill Co., New York (1962).
- [63] MONOD J.: "Recherches sur la croissance des cultures bacteriennes" - Hermann, Paris (1958).
- [64] MOORE E.W.: "Long Time Biochemical Oxygen Demands at Low Temperatures" - Sewage Works J. 13, 561 (1941).
- [65] MORGAN P.F.: "Studies of Accelerated Digestion of Sewage Sludge" - Sew.Ind.Wastes <u>26</u>, 462 (1954).
- [66] MYLROIE R.L. i HUNGATE R.E.: "Experiments on the Methane Bacteria in Sludge" - Canad.J.Microbiol. 1, 55 (1954).
- [67] NEILANDS J.B. i STUMP P.K.: "Outlines of Enzyme Chemistry" - J.Wiley, New York (1955).
- [68] ORFORD H.E. i INGRAM W.T.: "Deoxygeneration of Sewage. I.Critical Review of the Monomolecular Formula" - Sew. Ind. Wastes 25, 419 (1953).
- [69] PÖPEL F.: "Die Aufgaben des Arbeitskreises für biologische Methan und Humusgewinnung" - Referat 30.5.1947 w Ludwigsburg.
- [70] RANKIN R.S.: "Digester Capacity Requirements" Sewage Works J., 20 478 (1948).
- [71] ROEDIGER H.: "Die anaerobe alkalische Schlammfaulung" -R.Oldenbourg Verlag, München (1956).
- [72] SAWYER C.N. i ROY H.K.: "A Laboratory Evaluation of High - Rate Sludge Digestion" - Sew.Ind.Wastes 27, 1356 (1955).
- [73] SAWYER C.N. i SCHMIDT H.E.: "High Rate Sludge Digestion" J.Boston Soc.Civil.Engres., <u>42</u>, 1 (1955).
- [74] SAWYER C.N.: "An Evaluation of High Rate Digestion" w "Biological Treatment of Sewage and Industrial Wastes, II. Anaerobic Digestion and Solid Liquid Separation". Reinhold Pub.Co., New York (1958).

- [75] SCHULZE K.L.: "Studies on Sludge Digestion and Methane Fermentation. I. Sludge Digestion at Increased Solids Concentrations" - Sew.Ind.Wastes 30, 28 (1958).
- [76] SCHULZE K.L. i NAGA RAJU B.: "Studies on Sludge Digestion and Methane Fermentations. II. Methane Fermentations of Organic Acids" - Sew.Ind.Wastes 30, 164 (1958).
- [77] SIMPSON R.J.: "Some Aspects of the Biochemistry of Anaerobic Digestion" - w "Waste Treatment", Pergamon Press, Oxford (1960).
- [78] SMITH J.M.: "Kinetyka Procesów Chemii Stosowanej" -PWT, Warszawa (1960).
- [79] SNELL J.R.: "Anaerobic Digestion. I. Correction of Errors during the Measurement and Analysis of the Gas" -Sewage Works J. <u>14</u>, 1304 (1942).
- [80] SONGEN N.L.: "Sur le role du Methane dans la vie organique" - Rec.Trav.Chim. 29, 238 (1910).
- [81] STADIMAN T.C. i BARKER H.A.: "Studies on the Methane Formation. VII. Tracer Experiments on the Mechanism of Methane Formation" - Arch.Biochem. 21, 256 (1949).
- [82] STADIMAN T.C. i BARKER H.A.: "Studies on the Methane Formation. VIII. Tracer Experiments on Fatty Acid Oxidation by Methane Bacteria" - J.Bact. <u>61</u>, 67 (1951).
- [83] STADTMAN T.C. i BARKER H.A.: "Studies on the Methane Formation. IX. The Origin of Methane in the Acetate and Methanol Fermentations by Methanosarcina" -J.Bact. <u>61</u>, 81 (1951).
- [84] STANDARD METHODS for the Examination of Water, Sewage, and Industrial Wastes" - wyd.10, Amer.Pub.Health Assn., New York (1955).
- [85] STEPHENSON M. i STICKLAND J.H.: The Bacterial Formation of Methane by the Reduction of One-Carbon Compounds by Molecular Hydrogen" - Biochem. J. 27, 1517 (1933).
- [86] STEPHENSON M.: "Bacterial Metabolism" Longmans, Green, London (1949).
- [87] THOMAS H.A.Jr.: "Analysis of the Biochemical Oxygen Demand Curve" - Sewage Work J. 12, 504 (1940).
- [88] TORPEY W.N.: "High Rate Digestion of Concentrated Primary and Activated Sludge" - Sew.Ind.Wastes 26 479 (1954).

[89] WITEKOWA S .: "Kinetyka Chemiczna" - PWN, Warszawa (1962).

- [90] WUHRMANN K., v.BEUST F. i GHOESE T.K.: "Zur Theorie des Belehstschlammverfahrens. I. Beobachtungen über die Kinetik der Elimination organischer Verbindungen aus Abwasser mittels Belebtschlamn" - Schweizerische Zeitschrift für Hydrologie 20, 284 (1958).
- [91] WUHRMANN K. i v.BEUST F.: "Zur Theorie des Belebstschlammverfahrens. II. Über den Mechanismus der Elimination gelöster, organischer Stoffe aus Abwasser bei der biologischen Reinigung" - Schweizerische Zeitschrift für Hydrologie <u>20</u>, 311 (1958).

# ZESZYTY NAUKOWE POLITECHNIKI ŚLĄSKIEJ ukazują się w następujących seriach:

- Α. Αυτοματγκα
- B. BUDOWNICTWO
- Ch. CHEMIA
- E. ELEKTRYKA
- En. ENERGETYKA
- G. GÓRNICTWO
- IS. INŻYNIERIA SANITARNA
- MF. MATEMATYKA-FIZYKA
- M. MECHANIKA
- NS. NAUKI SPOŁECZNE

Dotychczas ukazały się następujące zeszyty serii Ch:

Chemia	z.	1,	1954	r.,	s.	87,	zł	13,—
Chemia	z.	2,	1957	r.,	s.	140,	zł	29,25
Chemia	z.	3,	1959	r.,	s.	110,	zł	24,20
Chemia	z.	4,	1961	r.,	s.	30,	zł	2,80
Chemia	z.	5,	1961	r.,	s.	165,	zł	34,—
Chemia	z.	6,	1961	r.,	s.	33,	zł	3,15
Chemia	z.	7,	1961	r.,	s.	62,	zł	10,—
Chemia	z.	8,	1961	r.,	s.	58,	zł	6,30
Chemia	z.	9,	$\boldsymbol{1962}$	r.,	s.	119,	zł	9,—
Chemia	z.	10,	${\bf 1962}$	r.,	s.	58,	<b>z</b> }	5,80
Chemia	z.	11,	$\boldsymbol{1962}$	r.,	s.	110,	zł	8,40
Chemia	z.	12,	1962	r.,	s.	148,	zł	11,50
Chemia	z.	13,	1963	r.,	s.	82,	zł	4,70
Chemia	z.	14,	1963	r.,	s.	73,	zł	5,—
Chemia	z.	15,	1963	r.,	s.	81,	zł	4,40

BIBLIOTEKA GLOWN Politechniki Sląskiej 3345 63 CCH8 24 1,00