

JERZY CHMIELEWSKI, JANINA KONOPACKA

ROZKŁAD NIŻSZYCH KWASÓW TŁUSZCZOWYCH
W FERMENTACJI METANOWEJ

Niższe kwasy alifatyczne występują jako produkty mikrobiologicznej degradacji złożonych substancji organicznych w warunkach beztlenowych. Kwasy te, szczególnie kwas octowy, masłowy i propionowy, przeważają wśród produktów pośrednich fermentacji metanowej osadów organicznych [1, 2, 3, 4, 5]. Fermentacja metanowa jest procesem powodowanym przez mieszane populacje bakterii kwasotwórczych i wytwarzających metan. Jeżeli proces fermentacyjny przebiega w ustalonej równowadze, wytwarzane kwasy lotne służą jako substraty dla bakterii metanowych. Niekiedy jednak obserwuje się zjawisko zakwaszania komór fermentacyjnych. Staje się to przyczyną zakłóceń procesu technologicznego, które przejawiają się obniżeniem pH środowiska, szybkości wytwarzania gazu i zmniejszeniem się zawartości metanu w gazie fermentacyjnym. Rozkład pierwotnych substratów fermentacji ulega upośledzeniu.

Zjawisko zakwaszania komór można wyjaśnić jako zaburzenie równowagi pomiędzy fazą kwasotwórczą i fazą wytwarzania metanu w procesie fermentacyjnym. Nagromadzenie się kwasów w środowisku następuje, gdy szybkość metanogenezy staje się mniejsza od szybkości wytwarzania kwasów. Zakłócenia w wytwarzaniu metanu są związane ze szczególną wrażliwością bakterii metanowych na działanie środowiska. Te bezwzględnie beztlenowce cechują się wysoką wybiórczością substratową i małą odpornością na zmiany temperatury i odczynu [6].

Wiele uwagi poświęcono fermentacji metanowej niższych kwasów tłuszczowych. Jeżeli kwasy te wprowadzone do środowiska stają się substratem fermentacji metanowej, stwarza się warunki jak gdyby izolowanej fazy zgazowania związków, które zwykle występują jako produkty pośrednie w procesie bardziej złożonym. Obserwacje takiej fermentacji mogą dostarczyć istotnych wskazówek dotyczących metanogenezy i zjawiska zakwaszania komór fermentacyjnych. Badania te zapoczątkował BU SWELL [1]. Rozkładem kwasu octowego, propionowego i masłowego

wego zajmował się SCHULZE [7]. Ostatnio KEEFER [8] obserwował fermentację metanową kwasu octowego i propionowego. Wpływ wysokich stężeń kwasu octowego na przebieg fermentacji metanowej badał McCARTY i McKINNEY [9, 10].

Obserwacje te wydają się jednak niepełne. Interesujące było szczegółowe zbadanie fermentacji metanowej sześciu pierwszych homologów kwasów alifatycznych. Występowanie tych kwasów lotnych jako produktów pośrednich fermentacji metanowej złożonych związków organicznych jest teoretycznie prawdopodobne i doświadczalnie udowodnione dla większości tych związków [1-5]. Doświadczenia zmuszały również do przybliżonego określenia maksymalnych stężeń lotnych kwasów tłuszczowych, które mogą ulegać fermentacji bez zakłócenia metanogenezy.

C z ę ś ć d o ś w i a d c z a l n a

Substraty i metodyka badań

Wytwarzanie metanu z niższych kwasów tłuszczowych prowadzono w środowisku fermentacyjnym cieczy nadosadowej. Ciecze te uzyskiwano przez dekantację osadów biogennych, technicznie przefermentowanych w wydzielonych komorach mezofilnej fermentacji metanowej. Do badań użyto cieczy nadosadowych, w których przez kilkudniową fermentację doprowadzono do zubożenia zawartości pierwotnych substratów metanogenezy. Tak przefermentowane ciecze wykazywały szczątkowe wytwarzanie metanu. Fermentację prowadzono w termostacie o temperaturze $32^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}$, która odpowiadała optimum mezofilnej fermentacji metanowej.

Jako substrat metanogenezy zastosowano sześć pierwszych kwasów szeregu alifatycznego. Był to kwas mrówkowy, octowy, propionowy, masłowy, walerianowy i kapronowy, które użyto w postaci preparatów chemicznie czystych lub ich wodnych rozтворów.

Chemiczną charakterystykę fermentujących cieczy stanowiły oznaczenia kwasów lotnych, alkaliczności, suchej pozostałości ogólnej i straty przy prażeniu oraz pH. Analizy te przeprowadzano zgodnie z zaleceniami STANDARD METHODS [11]; pH oznaczano potencjometrycznie przy pomocy elektrody szklanej.

Obserwacje nad fermentacją prowadzono w szczelnie zamkniętych komorach laboratoryjnych. Były to butle szklane o dokładnie wyznaczonej pojemności. Komory te zaopatrzone w zawory z gumy mięsistej zastosowane przez jednego z autorów w pracach wcześniejszych [5, 12]. Zawory były umieszczone w korkach zamykających komory i umożliwiły pomiary ciśnienia wytwarzającego się gazu fermentacyjnego przy użyciu zwykłego manometru rtęciowego z przewodem uzbrojonym igłą iniekcyjną. Wprowadzanie substratów, pobór prób cieczy lub gazu fermentacyjnego następował przy pomocy strzykawek iniekcyjnych.

Ilości wytwarzanego gazu fermentacyjnego mierzono raz dziennie metodą manometryczną opracowaną w poprzednich badaniach [5, 12]. Analizę tego gazu oparto na chromatografii gazowej metodą JANAKA, którą przystosowano do badań metanogenezy [5].

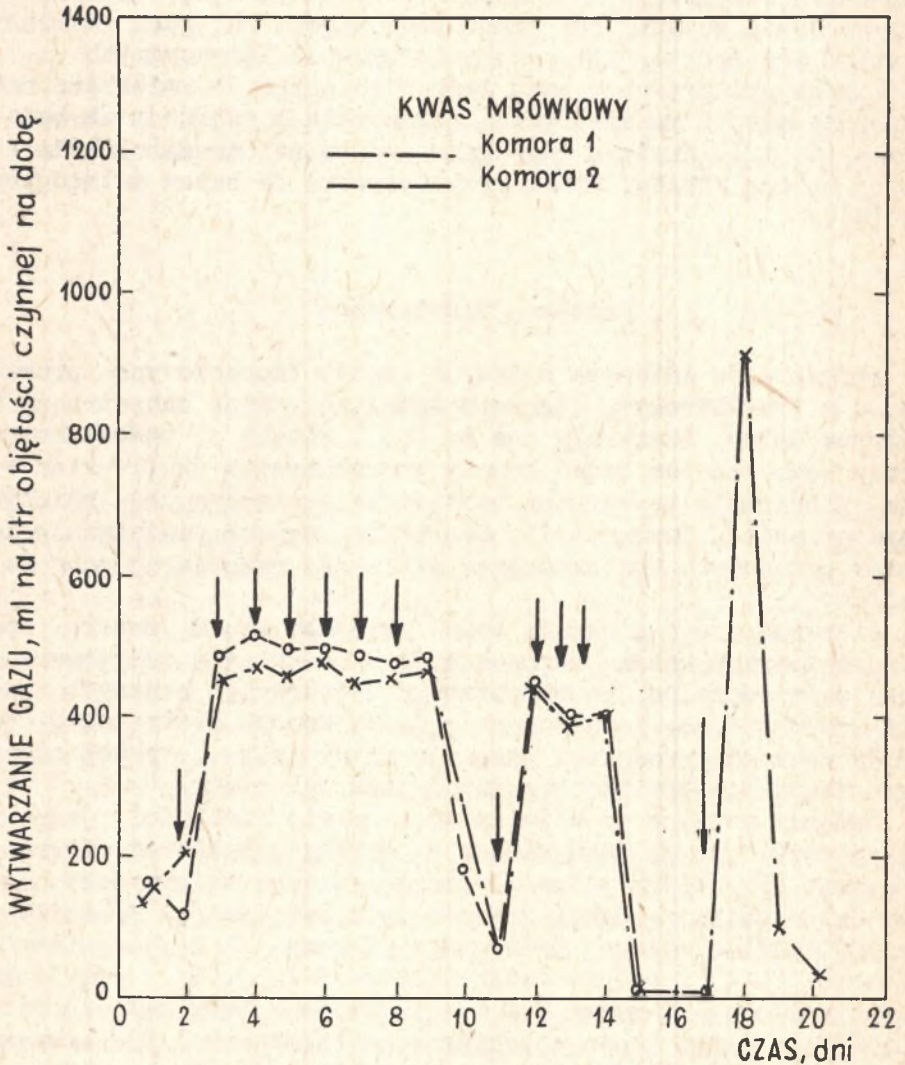
Przebieg doświadczeń

Fermentację metanową niższych kwasów tłuszczowych prowadzono w trzylitrowych komorach laboratoryjnych zaopatrzonych w tubus dolny. Zawierały one po 0,5 l cieczy nadosadowej. Przed rozpoczęciem badań komory przepłukiwano dwutlenkiem węgla. Zapewniało to warunki beztlenowe konieczne dla należytego przebiegu fermentacji. Codzienne, ręczne wstrząśnięcie komór powodowało wystarczające mieszanie reagującej masy fermentacyjnej.

Pierwsza część programu badań składała się z sześciu serii, z których każda obejmowała dwie równoległe traktowane komory doświadczalne, przeznaczone dla jednego z badanych kwasów tłuszczowych. Posłużono się jedną komorą kontrolną w celu wyznaczenia produkcji gazu fermentacyjnego przez ciecz nadosadową nie obciążoną przez badane substraty.

Badania wstępne umożliwiły wyznaczenie wielkości jednorazowej dawki kwasu, jaką mieszane populacje bakterii fermentującego środowiska potrafiły rozłożyć w przeciągu doby. Zastosowano zbliżone dawki gramowe tych substratów. Wynosiły one 1000 mg/l dla kwasu mrówkowego (Komora 1 i 2), octowego (Komora 3 i 4) i propionowego (Komora 5 i 6). W przypadku kwasu masłowego (Komora 7 i 8) wprowadzono 1200 mg/l substratu. Dobowe dawki kwasu walerianowego (Komora 9 i 10) oraz kapronowego (Komora 11 i 12) wynosiły 800 mg/l. Komora 13 zawierała ciecz nadosadową i umożliwiała kontrolę doświadczenia przez obserwację fermentacji szczałkowej tego środowiska

Wytwarzanie gazu w tej komorze było rzędu 100 ml/l na dobę. W obawie przed zakwaszeniem środowiska przez doprowadzone kwasy, stosowano wodne roztwory kwasów zalkalizowane amoniakiem do pH 7,2 do 7,8. Niewielkie przekroczenie pH 7,2 odpowiadającego optimum fermentacji wydawało się nieszkodliwe w tych obserwacjach.

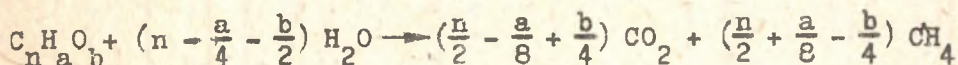


Rys. 1. Wytwarzanie gazu w czasie fermentacji metanowej

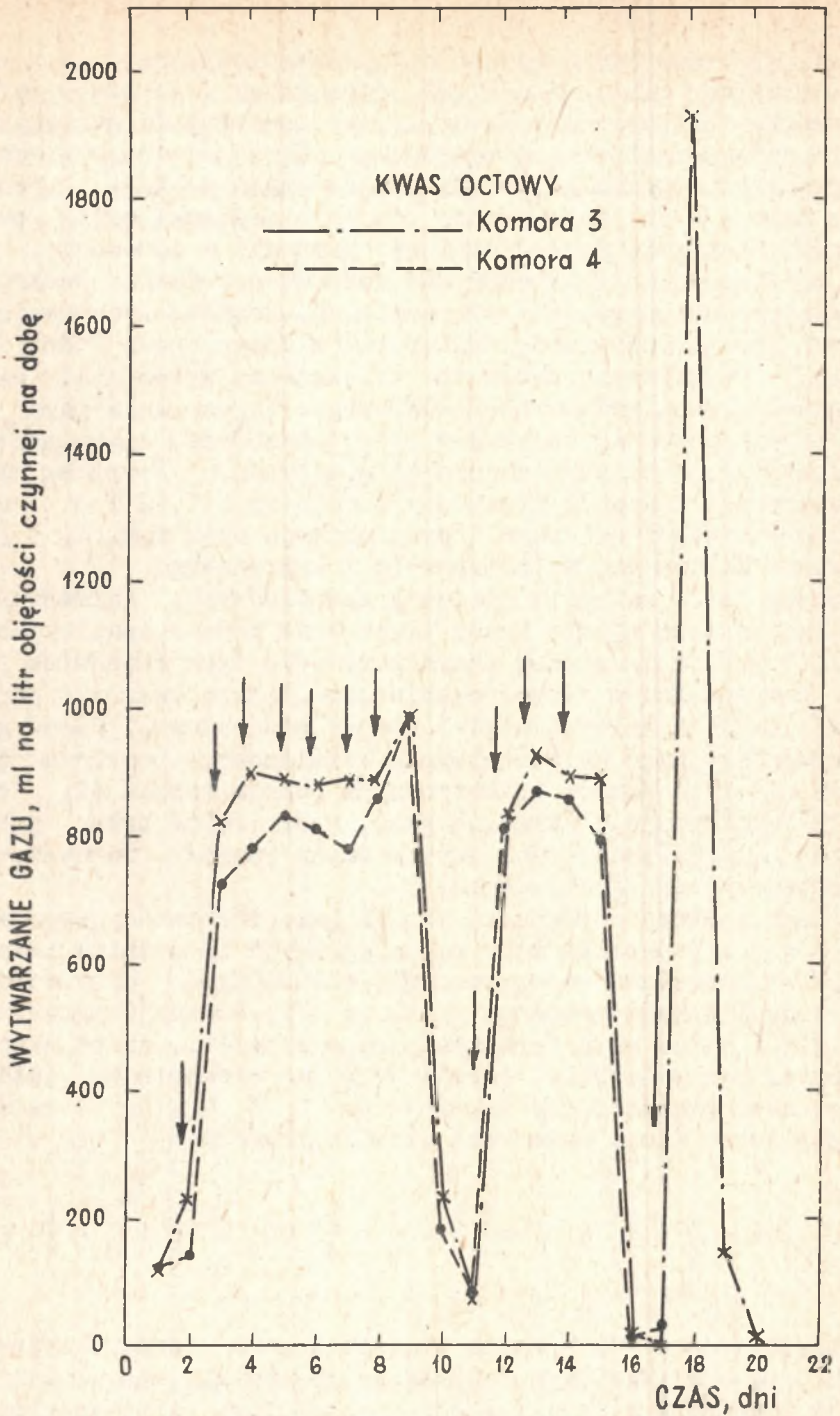
Codziennie dozowanie wyznaczonych dawek substratu we wszystkich seriach trwało 7 dni, po czym następowało 3-dniowa przerwa dla zubożenia środowiska w substrat fermentacyjny. W celu doświadczalnego potwierdzenia prawidłowości wyznaczenia dawki substratów kwasowych rozkładanych w ciągu doby, przez dalsze 4 dni wprowadzano ponownie podane ilości substratów. Następnie po jednodniowej przerwie w dozowaniu, 17 dnia doświadczenia do środowiska wprowadzono dawki dwukrotnie większe od poprzednio wyznaczonych. Rozkład tych zwiększonych porcji substratów następował w ciągu około 2 dni fermentacji. Obserwowano dwukrotne zwiększenie wytwarzania gazu z rozkładu kwasu mrówkowego i octowego. Wytwarzanie gazu w fermentacji pozostałych kwasów było zahamowane i nie wzrastało proporcjonalnie ze wzrostem dawki substratu. Przebieg tych eksperymentów w sposób graficzny podaje rys. 1, 2 i 3 dla kwasu mrówkowego, octowego i propionowego oraz rys. 4, 5 i 6 dla kwasu masłowego, walerianowego i kapronowego.

Zmiany jakie zaszły w cieczach nadosadowych, fermentujących wprowadzone niższe kwasy tłuszczowe badano analitycznie. Tabela I podaje chemiczną charakterystykę tych środowisk po około 3-tygodniowym fermentowaniu określonych kwasów w porównaniu z analizą wstępną użytej cieczy nadosadowej. Skład gazu fermentacyjnego wytworzonego z beztlenowego rozkładu badanych niższych kwasów alifatycznych podaje tabela II; zaś tabela V informuje o składzie gazu, który można było przewidzieć na podstawie stechiometrycznych równań fermentacji metanowej kwasów tłuszczowych.

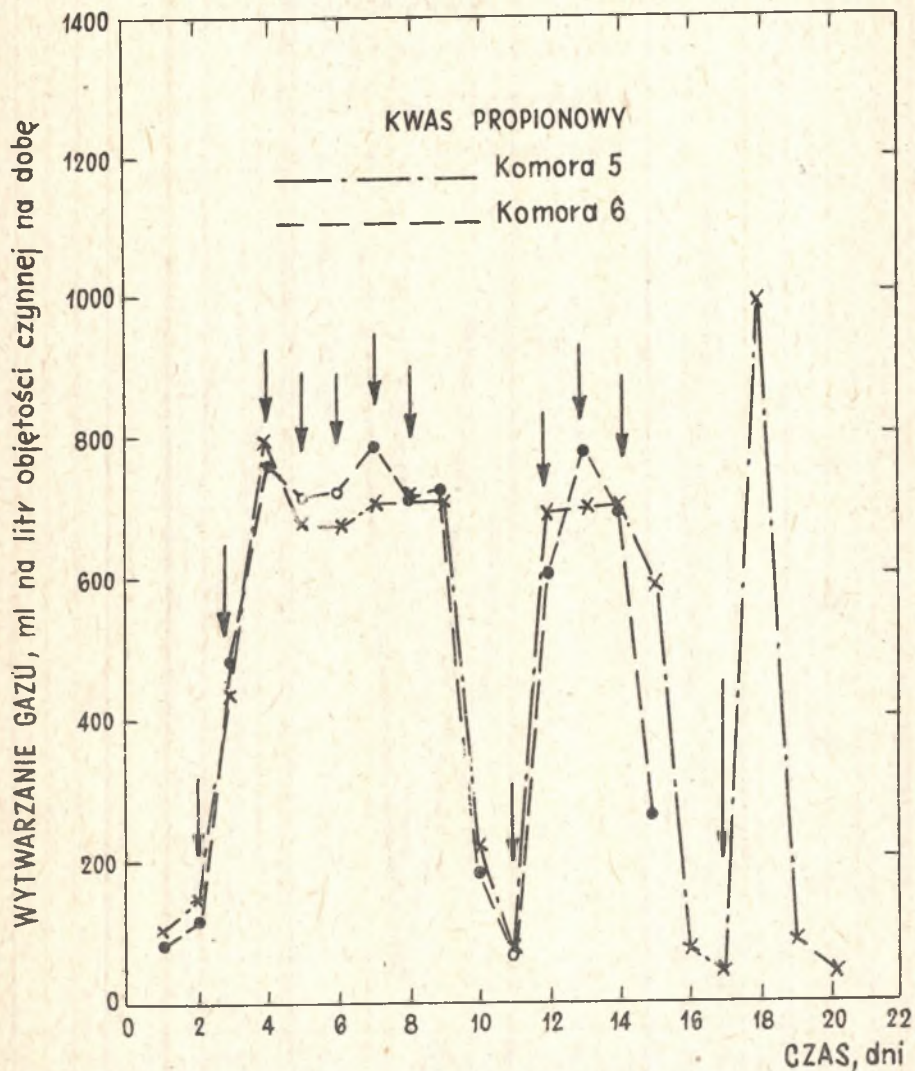
Przeprowadzono porównanie ilości gazu fermentacyjnego wytworzonego z jednostki masy poszczególnych substratów kwasowych z wielkościami teoretycznymi, obliczonymi przy pomocy stechiometrycznego równania BUSWELLA [1]. Równanie to określa ilość i skład gazu fermentacyjnego w zależności od składu elementarnego substratu. Jeżeli ów skład elementarny jakiegos związku organicznego wyraża wzór $C_n H_a O_b$, to ogólną reakcję fermentacji metanowej określa równanie:



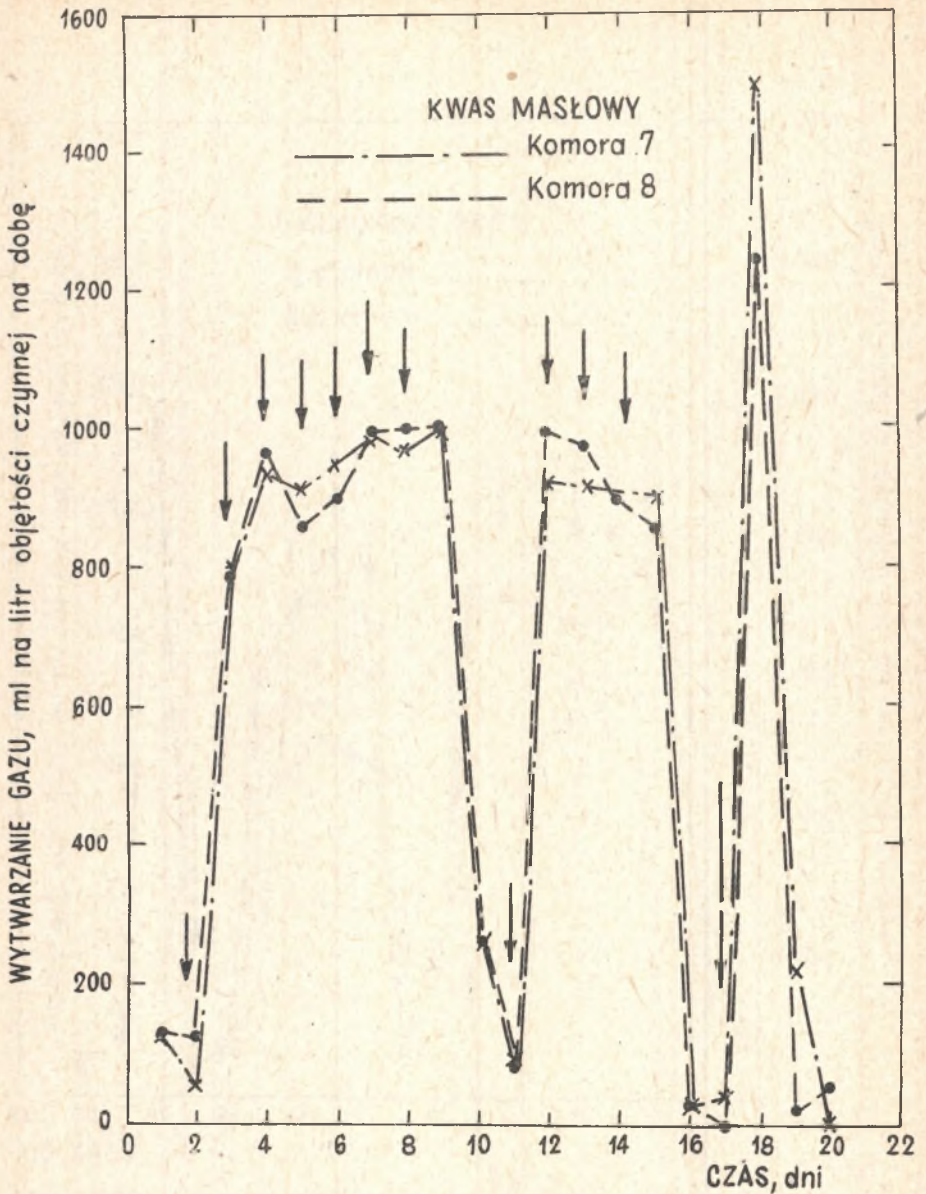
Doświadczalnie wyznaczone objętości gazu fermentacyjnego wytworzone w beztlenowym rozkładzie jednostki masy badanych kwasów porównano w tabeli III z wielkościami teoretycznymi z równania BUSWELLA.



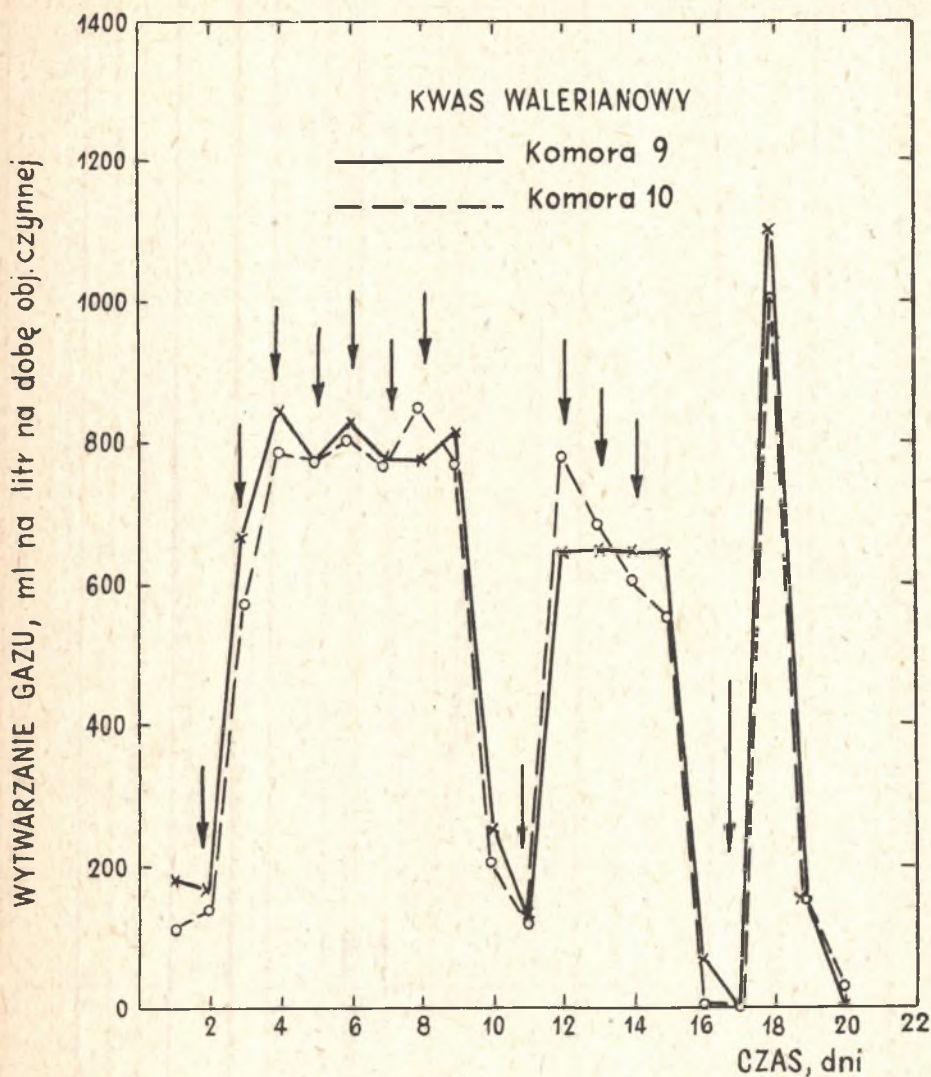
Rys. 2. Wytwarzanie gazu w czasie fermentacji metanowej kwasu octowego



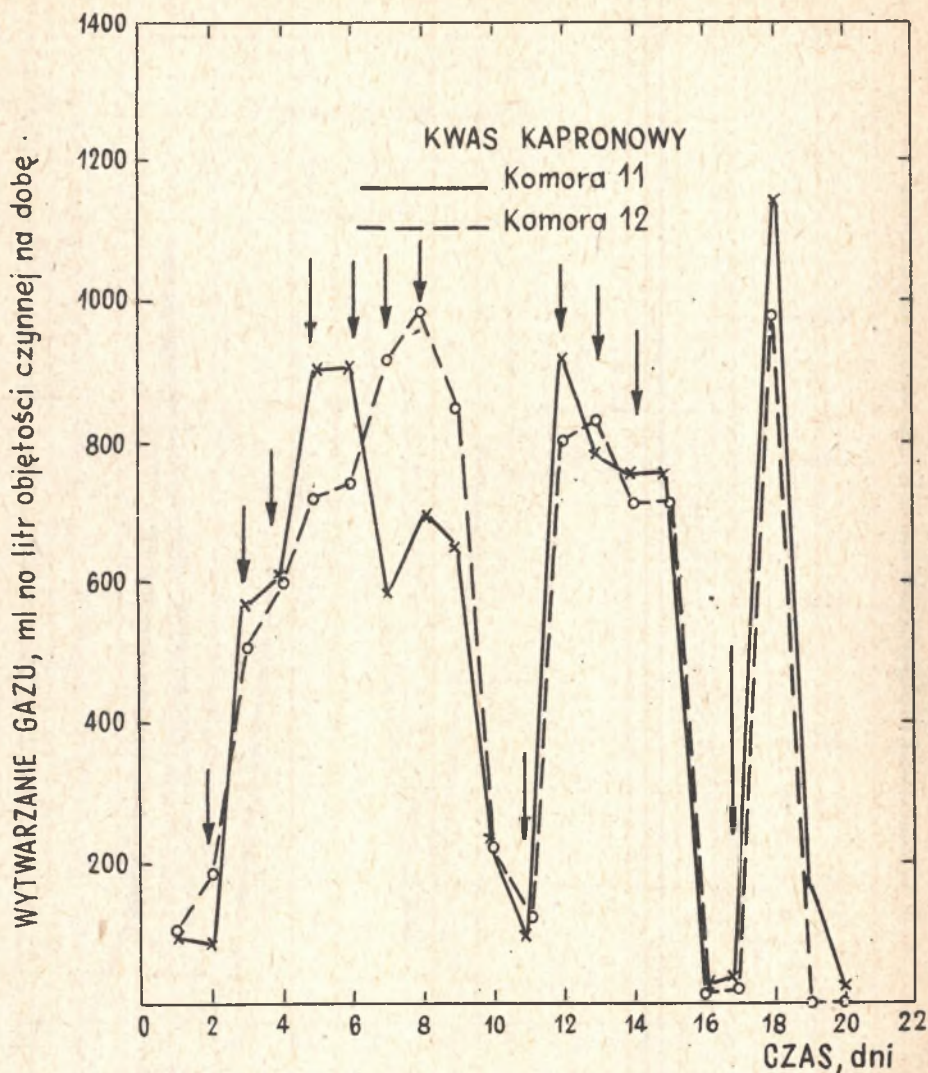
Rys. 3. Wytwarzanie gazu w czasie fermentacji metanowej kwasu propionowego



Rys. 4. Wytwarzanie gazu w czasie fermentacji metanowej kwasu masłowego



Rys. 5. Wytwarzanie gazu w czasie fermentacji metanowej kwasu walerianowego



Rys. 6. Wytwarzanie gazu w czasie fermentacji metanowej kwasu kapronowego

Tabela I

Charakterystyka oleosy nadosadowej fermentującej
z dodatkami niższych kwasów tłuszczowych

Substrat fermentują- cy w oleosy nadosadowej	Symbol komory	O z n a c z e n i a				
		Sucha pozostalość %	Strata przy pra- żeniu su- choj pozostalości %	Kwasy lotne mg/l CH_3COOH	Alka- liz- ność mg/l CaCO_3	pH
Ciecz nadosadowa analiza początk.	-	0,30	67	172	2870	7,6
Kwas mrówkowy	1	-	-	312	7940	7,8
	2	0,29	56	330	8130	7,6
Kwas octowy	3	0,28	54	250	5540	7,7
	4	-	-	-	-	-
Kwas propionowy	5	0,28	57	257	5300	7,4
	6	-	-	402	5300	7,4
Kwas masłowy	7	-	-	335	5250	7,3
	8	0,29	48	425	5110	7,4
Kwas walerianowy	9	0,28	55	617	2980	7,2
	10	-	-	514	2840	7,2
Kwas kapronowy	11	-	-	400	3190	7,2
	12	0,28	53	421	3280	7,2
Ciecz nadosadowa w komorze kontrol- nej	13	0,26	45	220	3300	7,6

Skład gazu fermentacyjnego
stwierdzony metodą chromatografii gazowej
w rozkładzie beztlenowym niższych kwasów tłuszczowych

Substrat fermentujący w cieczy nadosadowej	Symbol komory	Skład gazu fermentującego, %		
		CH ₄	CO ₂	N ₂
Kwas mrówkowy	1	60,5	34,5	5,0
	2	60,5	34,5	5,0
Kwas octowy	3	65,0	29,5	5,5
	4	-	-	-
Kwas propionowy	5	69,0	25,0	6,0
	6	69,5	25,5	5,0
Kwas masłowy	7	70,5	26,5	3,0
	8	70,5	26,0	3,5
Kwas walerianowy	9	68,0	26,0	6,0
	10	64,0	30,0	6,0
Kwas kapronowy	11	66,5	29,0	4,5
	12	65,5	30,0	4,5

Tabela III

Obliczone i doświadczalnie stwierdzone ilości gazu fermentacyjnego
z rozkładu niższych kwasów tłuszczowych

Kwas tłuszczowy	Sym- bol ko- mory	Dzienna dawka kwasu g/l	Ilości gazu fermentacyjnego				Całko- wita dawka kwasu g/l	Ilości gazu fermentacyjnego		
			obliczone ze wzoru BUSWELLA		doświadczalne wielkości średnie			obliczone ze wzoru BUSWELLA ml/l	doświadczalne wielkości średnie	
			ml/g	ml/l	ml/l	% ilości obliczonej			ml/l	% ilości obliczonej
Kwas mrówko- wy	1	1,00	487	487	400	82,0	10,00	4870	4148	85,0
	2	2,00		974	926	95,0	12,00	5850	4791	82,0
	A	0,92 ^{x)}		447	430	96,0	11,96 ^{x)}	5820	5379	92,5
	B	2,76 ^{x)}		1340	1160	86,5	11,96 ^{x)}	5820	5688	97,5
Kwas octowy	3	1,00	747	747	780	104,5	15,60	11620	11208	97,0
	4	2,10		1570	1836	117,0	11,00	8200	8485	103,5
	C	1,20 ^{x)}		895	850	95,0	15,60 ^{x)}	11620	11832	102,0
	D	3,60 ^{x)}		2690	2160	80,5	12,00 ^{x)}	8950	8768	98,0
Kwas propio- nowy	5	1,00	908	908	680	75,0	13,00	11800	8829	75,0
	6	2,00		1816	1000	55,0	11,00	9980	6511	65,0
Kwas masłowy	7	1,20	1018	1220	880	72,0	15,60	15900	10909	68,5
	8	2,40		2440	1390	57,0	15,60	15900	11168	73,5
Kwas waleria- nowy	9	0,80	1100	880	740	84,0	10,40	11450	8758	76,5
	10	1,60		1760	1000	57,0	10,40	11450	8354	73,0
Kwas kapro- nowy	11	0,80	1160	928	720	77,5	10,40	12080	8719	72,0
	12	1,60		1856	1050	56,5	8,80	10200	8857	87,0

x) dozowanie w postaci wolnych kwasów.

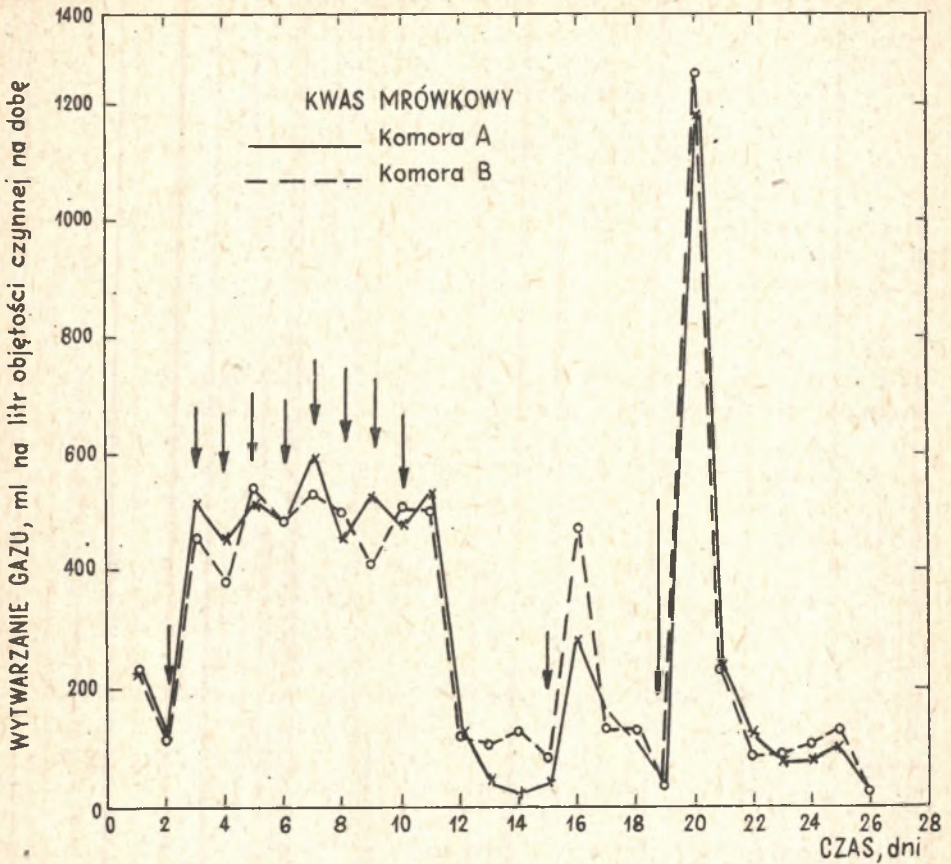
Druga część programu badań objęła fermentację metanową kwasu mrówkowego (Komora A i B) oraz kwasu octowego (Komora C i D). Komora E umożliwiała kontrolę tej fermentacji. Do doświadczeń wybrano tylko te dwa kwasy, ponieważ ich fermentacja przebiegała szczególnie poprawnie w poprzednio opisywanych obserwacjach. W odróżnieniu od poprzednich eksperymentów w drugiej części badań do przefermentowanych cieczy nad osadowych wprowadzano wolne kwasy. Było to możliwe wskutek wysokiej wartości pH 8,2 użytej przefermentowanej cieczy nadosadowej oraz dużej zdolności buforowej tego środowiska.

Doświadczenie miało przebieg zbliżony do poprzednio opisywanych obserwacji. Przez okres 10 dni stosowano dawki 0,92 g/l kwasu mrówkowego i 1,20 g/l kwasu octowego, po czym wprowadzono 4-dniową przerwę w zasilaniu w celu zubożenia środowiska w fermentacji szczątkowej. W 15 dniu doświadczenia wprowadzono ponownie tę dobową dawkę kwasu, zaś w 19 dniu obserwacji komory obciążono dawką trzykrotnie większą i wynoszącą 2,76 g/l kwasu mrówkowego oraz 3,60 g/l kwasu octowego. Po 24 godzinach fermentacji wytwarzanie gazu osiągało maksimum, po czym zanikało do wartości szczątkowych w ciągu 3 do 4 dni. Przebieg fermentacji metanowej kwasu mrówkowego i octowego w drugiej części doświadczeń ilustruje rys. 7 i 8. Zmiany składu cieczy nadosadowych fermentujących te kwasy podaje tabela IV, zaś tabela III zawiera doświadczalnie stwierdzone i teoretyczne ilości gazu fermentacyjnego wytworzone w beztlenowym rozkładzie badanych substratów.

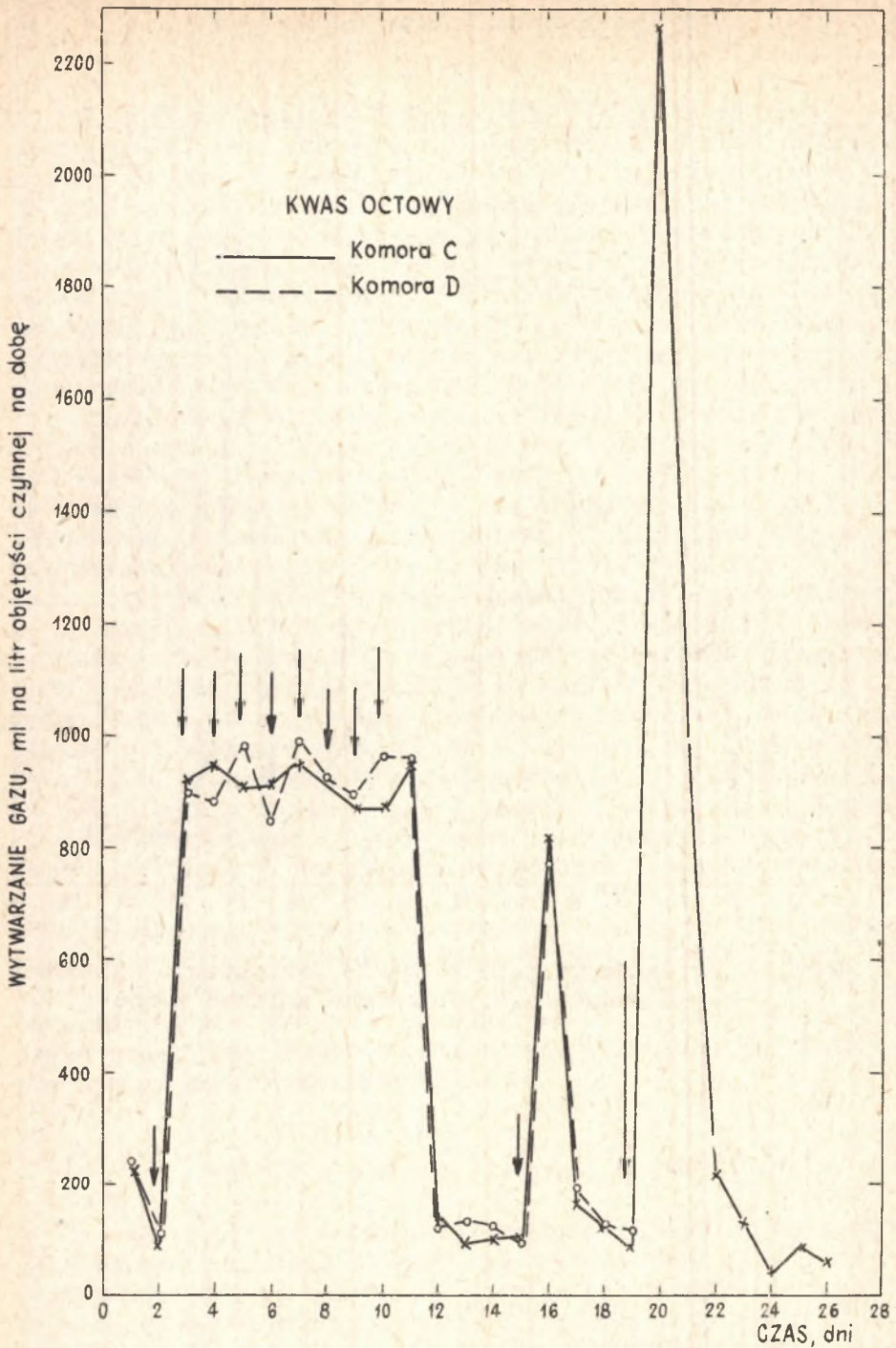
Wydawało się przydatne zebranie w tabeli V równań fermentacji metanowej badanych lotnych kwasów tłuszczowych. W sposób uproszczony podają one prawdopodobny, stechiometryczny przebieg procesu metanogenezy. Tabela ta zawiera również skład procentowy gazu fermentacyjnego obliczony na podstawie równań stechiometrycznych.

O m ó w i e n i e w y n i k ó w

Szczególną cechą fermentacji metanowej jest wytworzenie gazu fermentacyjnego, którego skład jakościowy jest w zasadzie niezależny od charakteru i struktury substratu: beztlenowy rozkład różnych substancji organicznych prowadzi zawsze do wytworzenia mieszaniny metanu i dwutlenku węgla jako głównych składników gazu. W zależności od rodzaju fermentowanego związku zmienia się tylko stosunek metanu i dwutlenku węgla w wytworzonym gazie fermentacyjnym.



Rys. 7. Wytwarzanie gazu w czasie fermentacji metanowej kwasu mrówkowego. Dozowanie wolnego kwasu



Rys. 8. Wytwarzanie gazu w czasie fermentacji metanowej kwasu octowego. Dozowanie wolnego kwasu

Tabela IV

Charakterystyka cieczy nadosadowej fermentującej
z dodatkiem kwasu mrówkowego i octowego.

Substrat fermentujący w cieczy nadosadowej	Symbol komory	O z n a c z e n i e				
		Sucha pozostłość %	Strata przy prażeniu suchej pozostłości %	Kwasy lotne mg/l CH_3COOH	Alka- licz- ność mg/l CaCO_3	pH
Ciecz nadosadowa, ana- liza początkowa	-	0,51	68	340	2780	8,2
Kwas mrówkowy	A	0,47	59	430	3600	6,9
	B	0,48	52	250	3575	7,2
Kwas octowy	C	0,49	57	410	3256	5,8
	D	-	-	-	-	-
Ciecz nadosadowa w komorze kontrolnej	E	0,46	53	112	4010	7,8

Tabela V

Przegląd prawdopodobnych reakcji rozkładu niższych kwasów tłuszczowych w fermentacji metanowej

Reakcja fermentacji metanowej		teoretyczny skład gazu	
		%CH ₄	%CO ₂
KWAS MROWKOWY $4\text{HCOOH} \rightarrow \text{CH}_4 + 3\text{CO}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$ stwierdza się małe ilości wodoru w gazie fermentacyjnym; możliwa reakcja dwustopniowa: $\text{HCOOH} \rightarrow \text{CO}_2 + \text{H}_2$ $\text{CO}_2 + 4\text{H}_2 \rightarrow \text{CH}_4 + 2\text{H}_2\text{O}$		25,0	75,0
KWAS OCTOWY bezpośredni rozkład: $\text{CH}_3\text{COOH} \rightarrow \text{CH}_4 + \text{CO}_2$ alternatywna reakcja oksydoredukcyjna: utlenienie: $\text{CH}_3\text{COOH} + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow 2\text{CO}_2 + 8\text{H}$ redukcja: $\text{CO}_2 + 8\text{H} \rightarrow \text{CH}_4 + 2\text{H}_2\text{O}$ ogólnie: $\text{CH}_3\text{COOH} \rightarrow \text{CH}_4 + \text{CO}_2$		50,0	50,0
KWAS PROPIONOWY $4\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COOH} + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow 7\text{CH}_4 + 5\text{CO}_2$ utlenienie: $4\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COOH} + 8\text{H}_2\text{O} \rightarrow 4\text{CH}_3\text{COOH} + 4\text{CO}_2 + 24\text{H}$ redukcja: $3\text{CO}_2 + 24\text{H} \rightarrow 3\text{CH}_4 + 6\text{H}_2\text{O}$ sumarycznie: $4\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COOH} + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow 4\text{CH}_3\text{COOH} + 3\text{CH}_4 + \text{CO}_2$ fermentacja octanu: $4\text{CH}_3\text{COOH} \rightarrow 4\text{CH}_4 + 4\text{CO}_2$ ogólnie: $4\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COOH} + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow 7\text{CH}_4 + 5\text{CO}_2$		58,3	41,7
KWAS MASŁOWY $2\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH} + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow 5\text{CH}_4 + 3\text{CO}_2$ oksydoredukcyjna: $2\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH} + 2\text{H}_2\text{O} + \text{CO}_2 \rightarrow 4\text{CH}_3\text{COOH} + \text{CH}_4$ fermentacja octanu: $4\text{CH}_3\text{COOH} \rightarrow 4\text{CH}_4 + 4\text{CO}_2$ ogólnie: $2\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH} + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow 5\text{CH}_4 + 3\text{CO}_2$		62,5	37,5
KWAS WALERIANOWY $4\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH} + 6\text{H}_2\text{O} \rightarrow 13\text{CH}_4 + 7\text{CO}_2$ oksydo- redukcja: $4\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH} + 4\text{H}_2\text{O} + 2\text{CO}_2 \rightarrow 4\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COOH} + 4\text{CH}_3\text{COOH} + 2\text{CH}_4$ fermentacja propionianu: $4\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COOH} + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow 4\text{CH}_3\text{COOH} + 3\text{CH}_4 + \text{CO}_2$ fermentacja octanu: $8\text{CH}_3\text{COOH} \rightarrow 8\text{CH}_4 + 8\text{CO}_2$ ogólnie: $4\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH} + 6\text{H}_2\text{O} \rightarrow 13\text{CH}_4 + 7\text{CO}_2$		65,0	35,0
KWAS KAPROMOWY $2\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH} + 4\text{H}_2\text{O} \rightarrow 8\text{CH}_4 + 4\text{CO}_2$ oksyde- dukcyjna: $2\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH} + 2\text{H}_2\text{O} + \text{CO}_2 \rightarrow 2\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH} + 2\text{CH}_3\text{COOH} + \text{CH}_4$ fermentacja masłanu: $2\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH} + 2\text{H}_2\text{O} + \text{CO}_2 \rightarrow 4\text{CH}_3\text{COOH} + \text{CH}_4$ fermentacja octanu: $6\text{CH}_3\text{COOH} \rightarrow 6\text{CH}_4 + 6\text{CO}_2$ ogólnie: $2\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH} + 4\text{H}_2\text{O} \rightarrow 8\text{CH}_4 + 4\text{CO}_2$		66,7	33,3

Wytwarzanie dwutlenku węgla, produktu całkowitego utlenienia substratów organicznych jest uzasadnione. Trudniej natomiast wytłumaczyć występowanie metanu, jako drugiego głównego składnika gazu fermentacyjnego. To ciekawe zjawisko próbował tłumaczyć BUSWELL [13] stwierdzając, że powstawaniu mieszaniny CO_2 i CH_4 jako produktu fermentacji towarzyszy maksymalny spadek energii swobodnej układu. Van NIEL [6] podał teorię która przewidywała całkowite utlenienie substratu węglowego do dwutlenku węgla. Część tego dwutlenku ulegała redukcji do metanu pod wpływem wodoru nagromadzonego w procesie dehydrogenacji substratu. Okazało się jednak, że niektóre związki - kwas octowy [14, 15, 16] lub metanol [16] tworzą metan przez bezpośredni rozkład drobin. Udaną próbę pogodzenia tych pozornie sprzecznych spostrzeżeń przeprowadził BARKER [6] w ogólnym schemacie mechanizmu biochemicznego wytwarzania metanu.

Szczególnie jednak przydatne uogólnienie metanogenezy podał BUSWELL [1] w postaci prostego stechiometrycznego równania. Równanie to oczywiście nie uwzględnia mechanizmu rozkładu, stanowi jednak niewątpliwie dogodny i praktyczny uogólnienie zjawiska metanogenezy. Podaje zależność pomiędzy składem elementarnym substratu, a ilością i składem gazu fermentacyjnego. Określa również ilość wody, która bierze udział w tym procesie oksydoredukcyjnym. Doświadczalnie wyznaczona objętość gazu fermentacyjnego wytworzona z określonej ilości związku organicznego jest zwykle mniejsza od wielkości stechiometrycznej. W warunkach beztlenowej fermentacji metanowej 95 do 99% substratu ulega procesom katabolicznym, które dostarczają energii układowi biochemicznemu. Gaz fermentacyjny jest produktem tych procesów. Pozostała zaś część metabolizowanego substratu służy do budowy biomasy komórek drobnoustrojowych.

Wyniki przeprowadzonych doświadczeń stwierdzają, że zespół bakterii metanowych zawarty w cieczy nadosadowej z mezofilnej komory fermentacyjnej łatwo przystosowywał się do zużywania poszczególnych kwasów tłuszczowych jako jedynego substratu metanogenezy (rys. 1-8). Nie przeprowadzono wprawdzie badań mikrobiologicznych: izolacja i identyfikacja bakterii metanowych jest zadaniem szczególnie trudnym [6] i mało przydatnym w badaniach biochemicznych funkcji mieszanych populacji drobnoustrojowych. Można jednak spodziewać się, że wskutek wysokiej specyficzności substratowej w wyniku długotrwałej fermentacji kwasu mrówkowego mogła wytworzyć się kultura wzbogacona *Methanobacterium formicicum* lub *Methanococcus* van-

nie l i i [17]. Drobnoustroje te są zdolne do wykorzystywania związków jednowęglowych w procesach metabolicznych.

Rozkład wyżej drobinowych kwasów tłuszczowych mógł powodować utworzenie się bardziej złożonych populacji mieszanym. Z prac BARKERA [6] wiadomo, że rozłożenie tak proste go związku jak kwas kapronowy lub walerianowy wymaga współudziału i synergicznego działania co najmniej trzech gatunków bakterii metanowych. *Methanobacterium suboxydans* utlenia kwas walerianowy do octanu i propionianu, których dalej ten organizm nie wykorzystuje. Do piero drugi gatunek *Methanobacterium propionicum* przemienia kwas propionowy do octanu, dwutlenku węgla i metanu. Ponieważ drobnoustrój ten nie atakuje octanu, musi pojawić się trzeci gatunek *Methanococcus mazei* lub *Methanosarcina barkeri*, który fermentuje octan [6].

Jako teoretyczną podstawę interpretacji uzyskanych wyników doświadczalnych zastosowano równanie stechiometryczne BUSWELLA [1]. Analiza chromatograficzna gazu fermentacyjnego wykazała wzrost zawartości metanu od około 60% dla kwasu mrówkowego do około 70% dla masłowego i kwasów wyższych (tabela II). Stosunek metanu do bezwodnika węglowego był więc bliski 2. Podobnym składem cechuje się gaz fermentacyjny wytwarzający się w technicznym procesie fermentacji osadów biogenych. Natomiast z równania BUSWELLA wynika, że udział metanu w gazie z fermentacyjnego rozkładu kwasu mrówkowego powinien wynosić 25%; zawartość metanu w gazie powinna sukcesywnie wzrastać wraz z zawartością węgla w drobinie substratu i osiągnąć 67% dla kwasu kapronowego (tabela V). Należy więc stwierdzić, że wyniki doświadczalne uzyskane w rozkładzie wyżej drobinowych kwasów lotnych są bliskie wartościom teoretycznym. W miarę zmniejszania się ilości atomów węgla w drobinie kwasu następują coraz większe rozbieżności. Obserwacja ta nakazuje uważać stechiometryczne równanie BUSWELLA tylko za bardzo przybliżony sposób przewidywania składu gazu fermentacyjnego z badanego substratu.

W tabeli V zebrano niektóre dyskutowane w literaturze równania fermentacji metanowej lotnych kwasów tłuszczowych. Ckazuje się, że przyjęcie innych schematów degradacji kwasu mrówkowego lub octowego nie wyjaśnia opisanej rozbieżności, która polega na wyższej zawartości metanu w gazie fermentacyjnym od wyznaczonej teoretycznie. Rozkład octanu został potwierdzony badaniami izotopowymi i musi prowadzić do wy-

tworzenia gazu fermentacyjnego, który zawiera równe ilości dwutlenku węgla i metanu [14, 15, 16].

Niezgodność pomiędzy wynikami doświadczalnymi i obliczonymi z równania BUSWELLA tłumaczy w pewnym stopniu rozpuszczalność dwutlenku węgla w wodzie, która jest 30-krotnie wyższa od rozpuszczalności metanu. Rozpuszczanie się CO_2 w cieczy fermentacyjnej zwiększa zawartość metanu w fazie gazowej. Oprócz tych błędów metodycznych prawdopodobny jest również inny powód omawianej niezgodności. Badany kwas może być pierwotnym substratem metanogenezy i powodować wzrost określonej kultury bakterii metanowych. W warunkach populacji mieszanych obumierająca biomasa tych bakterii może stanowić wtórny substrat metanogenezy. Fermentacja metanowa obumarłej biomasy białkowej może dać gaz fermentacyjny o składzie innym od otrzymanego z rozkładu substratu pierwotnego. Zwykle jednak ilość tworzącej się masy komórek bakterii metanowych jest niewielka, zaś omawiany wpływ dość ograniczony.

Szczególnie ważne zastosowanie stechiometrycznego równania BUSWELLA dotyczy wyznaczenia teoretycznej ilości gazu fermentacyjnego, którą można uzyskać z rozkładu określonej masy substratu. Doświadczalnie stwierdzone ilości gazu były bliskie wartościom teoretycznym dla kwasu mrówkowego i octowego (82 do 103%). W odniesieniu do wyższych kwasów zgodność ta malała do około 70% (tabela III).

Kwas mrówkowy nie jest typowym produktem pośrednim pojawiającym się w fermentacji metanowej osadów biogennych. Niewielkie ilości tego kwasu wykrywał KAPLOVSKY [3] w przypadku nieprawidłowej pracy komór fermentacyjnych. Poprawną fermentację metanową kwasu mrówkowego przez mieszane populacje bakterijne stwierdzał NELSON [17]. Z przeprowadzonych doświadczeń wynika, że mrówczan ulega szybkiej fermentacji metanowej. Obciążenie komory fermentacyjnej dawką 1,0 g/l i 2,0 g/l na dobę mrówczanu (w postaci soli amonowej, rys.1) lub porcją 2,76 g/l na dobę kwasu mrówkowego (rys.7) powodowało szybki przebieg fermentacji. Gaz fermentacyjny wytwarzał się w ilościach bliskich danym teoretycznym (tabela III).

W przeciwieństwie do mrówczanu, kwas octowy jest powszechnie występującym produktem pośrednim w beztlenowym rozkładzie złożonych związków organicznych [1, 2, 3, 4, 5]. Tworzy się jako produkt beta - oksydacji wyższych kwasów o parzystej ilości atomów węgla w drobinie [5, 6]. Wcześniejsze badania fermentacji metanowej kwasu octowego przeprowadził BUSWELL [1]. SCHULZE [7] podał, że maksymalne zasilanie komory fermentacyjnej kwasem octowym może wynosić 0,98 g/l na dobę. Ostatnio KEEFER [8] stwierdził, że rozkład kwasu octowe-

daje około 563 ml/g gazu fermentacyjnego, który zawierał 50 do 65% metanu.

Wyniki przeprowadzonych doświadczeń nie są zgodne z obserwacjami SCHULZEA [7], który otrzymał gazowanie bliskie wartościom teoretycznym tylko dla dawki 0,98 g/l na dobę kwasu octowego. Przy wzroście stężenia kwasu do 1,6 g/l dziennie wytwarzanie gazu ulegało zahamowaniu do 41% wielkości teoretycznej. W przeprowadzonych badaniach zarówno porcje 1,0 g/l i 2,1 g/l na dobę octanu w postaci soli amonowej (rys. 2) i dawka równa 3,6 g/l kwasu octowego (rys. 8) ulegały przemianie w gaz fermentacyjny w sposób zgodny z danymi teoretycznymi (tabela III). W badaniach fermentacji metanowej kwasu propionowego stosowano dzienną dawkę 1,0 g/l i 2,0 g/l (rys. 3). Przewyższyły one znacznie dawki wyznaczone przez SCHULZEA [7]. Jednak w przypadku tego kwasu dwukrotne zwiększenie porcji substratu zmniejszyło wyraźnie metanogenezę z 75% do 55% wielkości teoretycznej (tabela III)

Kwas masłowy (rys. 4) w stężeniu 1,2 g/l na dobę wytwarzał gaz fermentacyjny w ilości odpowiadającej około 70% danym teoretycznym. Zwiększenie porcji kwasu do 2,4 g/l na dobę obniżało metanogenezę do 57% (tabela III). Nieco lepszą zgodność z danymi teoretycznymi otrzymał SCHULZE [7]. W tej pracy fermentacja 1,6 g/l kwasu masłowego dawała około 90% teoretycznej ilości gazu.

Wyniki badań otrzymane dla kwasu walerianowego (rys. 5) i kwasu kapronowego (rys. 6) były zbliżone. Przefermentowanie dziennej dawki 0,8 g/l dawało około 80% teoretycznej ilości gazu. Dwukrotne zwiększenie tej dawki do 1,6 g/l na dobę powodowało zahamowanie gazowania do 57% (tabela III).

Przeprowadzone badania dostarczyły dowodów, które stwierdzają, że fermentacja metanowa kwasu octowego i mrówkowego przebiegała znacznie łatwiej od rozkładu beztlenowego kwasu propionowego, masłowego, walerianowego i kapronowego.

Obserwacje fermentacji metanowej niższych kwasów tłuszczowych w przefermentowanych cieczach nadosadowych wykonano dwukrotnie. W pierwszej części doświadczeń stosowano substraty w postaci soli amonowych, uzyskanych przez słabe zakalizowanie roztworów kwasów amoniakiem do pH 7,2 do 7,8 (tabela I). McCARTY i McKINNEY [9, 10] przestrzegają przed toksycznością jonu amonowego, dotyczy to jednak wyższych stężeń NH_4^+ . Drugą część obserwacji przeznaczono na badanie fermentacji łatwo rozkładającego się kwasu octowego i mrówkowego. W tych doświadczeniach użyto wolnych kwasów, spodziewając się, że wysoka zdolność buforowa cieczy nadosadowych zapobiegnie zbytniemu zakwaszeniu środowiska. Dozowanie

wolnych kwasów spowodowało obniżenie pH do 5,8 (tabela IV). W obu jednak wypadkach uzyskano zbliżone wyniki metanogenezy. Były one zadowalająco zgodne z teoretycznymi wielkościami obliczonymi ze stechiometrycznego równania BUSWELLA (tabela III).

S t r e s z c z e n i e

Niższe kwasy alifatyczne są produktami pośrednimi beztlenowej degradacji złożonych substancji organicznych w fermentacji metanowej. Obserwowano rozkład kwasu mrówkowego, octowego, propionowego, masłowego, walerianowego i kapronowego. Stosowano te substraty w postaci wolnych kwasów lub soli amonowych. Stwierdzono, że poszczególne kwasy tłuszczowe wprowadzone do środowiska przefermentowanej cieczy nadosadowej ulegają przemianom w gaz fermentacyjny w określonym przedziale stężeń w sposób na ogół zgodny ze stechiometrycznym równaniem BUSWELLA.

Maksymalne dawki poszczególnych kwasów, które mogły ulec rozkładowi w ciągu doby wynosiły około 2500 mg/l dla kwasu mrówkowego i octowego oraz 800-1200 mg/l dla pozostałych kwasów. Stwierdzono, że wzrost kwasów powyżej tych stężeń powodował zahamowanie fermentacji, które przejawiało się wytworzeniem gazu rzędu 60% ilości stechiometrycznej. Tylko kwas mrówkowy i octowy ulegały zgazowaniu w wyższych stężeniach zgodnie z przewidywaniami teoretycznymi. Oba te związki łatwiej od pozostałych kwasów fermentowały pod wpływem mieszanek kultur bakterii metanowych.

W odróżnieniu od ogólnej ilości wytwarzanego gazu skład gazu z fermentacji kwasu mrówkowego i octowego różnił się znacznie od wielkości wynikających z równania BUSWELLA. W przypadku pozostałych czterech kwasów uzyskano większą zgodność składu stwierdzonego eksperymentalnie z obliczonym teoretycznie.

Wyniki doświadczeń mogą być przydatne w interpretacji zjawiska zakwaszenia komór fermentacyjnych.

LITERATURA

- [1] BUSWELL A.M., HATFIELD W.D.: "Anaerobic Fermentations" Ill. State Water Survey Bull. 32 (1939).
- [2] RAWN A.M., BANTA A.P., POMEROY R.: "Multiple - Stage Sewage Sludge Digestion" - Proc. Amer. Soc. Civil. Eng. 63, 1673 (1937).
- [3] KAPLOVSKY J.: "Volatile Acid Production during the Digestion of Seeded, Unseeded, and Limed Fresh Solids" - Sew. Ind. Wastes 23, 713 (1951).
- [4] LIUBIMOW W.T., KAGAN Z.S.: "Dinamika lietuczich organiczeskich kislot, obrazujuszczichsja pri anaerobnom razkożenii organiczeskich wieszczestw mikroorganizmami w mietantienkach" - Mikrobiologija 27, 484 (1958).
- [5] CHMIELOWSKI J.: "Kinytyka i mechanizm fermentacji meta nowej". Zeszyty Naukowe Politechniki Ślaskiej - Chemia Nr 17, Gliwice, 1963.
- [6] BARKER H.A.: "Biological Formation of Methane" - Ind. Eng. Chem. 48, 1438 (1956).
- [7] SCHULZE K.L., NAGA RAJU B.: "Studies on Sludge Digestion and Methane Fermentation. II. Methane Fermentation of Organic Acids" - Sew. Ind. Wastes 30, 164 (1958).
- [8] KEEFER C.E., URTES H.C.: "Digestion of Volatile Acids" - J. Water Pollut. Contr. Federat. 34, 592 (1962).
- [9] McCARTY P.L., McKINNEY R.E.: "Volatile Acid Toxicity in Anaerobic Digestion" - J. Water Pollut. Contr. Federat. 33, 223 (1961).
- [10] McCARTY P.L., McKINNEY R.E.: "Salt Toxicity in Anaerobic Digestion" - J. Water Pollut. Contr. Federat. 33, 399 (1961).
- [11] STANDARD METHODS for the Examination of Water, Sewage, and Industrial Wastes" - wyd. 10, Amer. Pub. Health Assn New York, 1955.
- [12] CHMIELOWSKI J., SIMPSON J.R., ISAAC P.C.G.: "Use of Gas Chromatography in Sludge Digestion" - Sew. Ind. Wastes 31, 1237 (1959).

- [13] BUSWELL A.M., MUELLER H.F.: "Mechanism of Methane Fermentation" - Ind. Eng. Chem. 44, 550 (1952).
- [14] STADTMAN T.C., BARKER H.A.: "Studies on the Methane Fermentation. VII. Tracer Experiments on the Mechanism of Methane Formation" - Arch. Biochem. 21, 256 (1949).
- [15] STADTMAN T.C., BARKER H.A.: "Studies on the Methane Fermentation. VIII. Tracer Experiments on Fatty Acids Oxidation by Methane Bacteria" - J. Bact. 61, 67 (1951).
- [16] STADTMAN T.C., BARKER H.A.: "Studies on the Methane Fermentation. IX. The Origin of Methane in the Acetate and Methanol Fermentation by *Metanosarcina*" - J. Bact. 61, 81 (1951).
- [17] STADTMAN T.C., BARKER H.A.: "Studies on the Methane Fermentation. X. New Formate - Decomposing Bacterium, *Methanococcus vannielii*" - J. Bact. 62, 269 (1951).
- [18] NELSON W.O., OPPERMANN R.A., BROWN R.E.: "In Vitro Studies on Methanogenic Rumen Bacteria. II. Fermentation of Butyric and Valeric Acid" - J. Dairy Sci. 41, 545 (1958).

РАСПАД НИЗШИХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ В МЕТАНОВОМ БРОЖЕНИИ

Резюме

Низшие жирные кислоты являются промежуточными продуктами анаэробной деградации составных органических субстанций в метановом брожении. Наблюдался распад муравьиной, уксусной, пропионовой, масляной, валерьяновой и капроновой кислот. Здесь применялись субстраты в виде свободных кислот или аммониевых солей. Обнаружено, что отдельные жирные кислоты, введенные в проферментированную надосадочную жидкость, подвергаются превращению в ферментационный газ в определенном интервале концентрации путем, в общем, согласно стехиометрическому уравнению Бюзуела.

Максимальные дозы отдельных кислот, которые могли подвергаться распаду на протяжении одних суток, были ряда около 2500 мг/л для муравьиной и уксусной кислот, а также 800 - 1200 мг/л для остальных кислот.

Констатируется, что величина содержания свыше этих концентрации вызывало прекращение брожения, которое проявлялось образованием газа ряда 60% стехиометрического количества. Только муравьиная и уксусная кислоты подвергались газификации в высших концентрациях согласно теоретическим предположкам. Оба эти соединения ферментировали легче, чем остальные кислоты под влиянием смешанных культур метановых бактерий.

В расхождении от общего количества образуемого газа состав газа из брожения муравьиной и уксусной кислот очень отличался от числа, следующего из уравнения Бюзуела. В случае остальных четырех кислот получено большое согласие между составом полученным экспериментально а рассчитанным теоретически.

Результаты исследований могут быть пригодны в интерпретации явления подкисления метантенков.

Силезский Политехнический Институт
Кафедра Технологии Воды и Сточных Вод

THE ANAEROBIC DECOMPOSITION
OF LOWER FATTY ACIDS DURING METHANE FERMENTATION

S u m m a r y

The lower fatty acids are common intermediates during the anaerobic digestion of a complex organic matter. The degradation of formic, acetic, propionic, valeric and caproic acids has been investigated. These substrates were used in form of free acids or ammonium salts. It was found that these particular fatty acids fed to the digesting supernatant liquor are converted to the fermentation gas generally in conformity with the stoichiometric equation of BUSWELL.

The maximal doses of the particular acids that can be decomposed during one day of fermentation amounted to 2500 p.p.m. of formic and acetic acids and to 800-1200 p.p.m. of other acids. It was found that the increase of concentration of acids above these values slowed down the fermentation process and limited the fermentation gas production to about 60 percent of theoretical amount. Only the formic and acetic acids were fermented in higher concentrations and converted to fermentation gas accordingly to theoretical calculations. Both of these acids were decomposed easier than the others by the mixed populations of methane bacteria.

In contrary to the volume of gas produced, the composition of fermentation gas from the formic and acetic acids was considerably different than the value obtained by means of BUSWELL'S equation. In case of the other four acids the experimentally detected composition of fermentation gas was more conform with the theoretically calculated values.

The results of performed investigations can be useful in the interpretation of the phenomenon of the sour digestion.

Silesian Technical University at Gliwice
Laboratory of Water and Waste Water Technology