ZESZYTY NAUKOWE POLITECHNIKI ŚLĄSKIEJ 1965

Seria: INŻYNIERIA SANITARNA z. 8 Nr kol. 133

JERZY CHMIELOWSKI, ANDRZEJ GROSSMAN
SYLWIA ŁABUŻEK

BIOCHEMICZNY ROZKŁAD NIEKTÓRYCH FENOLI W FERMENTACJI METANOWEJ

Systematyczne badania nad beztlenową degradacją fenolu w fermentacji metanowej ostatnio przeprowadzili CHMIELOWSKI, GROSSMAN i WĘGRZYNOWSKA [1] oraz CHMIELOWSKI i GROSSMAN [2]. W badaniach tych stwierdzono, że mezofilna fermentacja metanowa ulega łatwemu przystosowaniu do rozkładu fenolu, który był jedynym substratem wprowadzanym do środowiska fermentacyjnego. Adaptację do degradacji fenolu można było wywołać w warunkach laboratoryjnych przez wprowadzanie w odstępach 2 do 3 dniowych wzrastających dawek fenolu od 100 do około 3000 mg/l. Fermentacja metanowa przebiegała szczególnie intensywnie przy stężeniu fenolu rzędu 2000 mg/l. Taka porcja substratu uległa całkowitemu rozkładowi do metanu i dwutlenku węgla w czasie trzech dni fermentacji.

W procesie adaptacyjnym w mieszanej populacji bakteryjnej fermentacji metanowej prawdopodobnie rozwijają się bakterie saprofityczne zdolne do przyswajania i rozkładu fenoli. Związki te ulegają przemianie w niezidentyfikowane dotychczas produkty pośrednie, które towarzyszą procesowi beztlenowego rozszczepienia struktury aromatycznej. W dalszym procesie degradacyjnym powstają proste kwasy alifatyczne, które pod wpływem bakterii metanowych zostają przemienione w metan i dwutlenek węgla. Bakterie metanowe cechują się dużą wybiórczością substratową [3] i nie są zdolne do metabolizowania związków aromatycznych.

Należy więc spodziewać się, że dla wywołania fermentacji metanowej związku fenolowego powinny być spełnione dwa podstawowe warunki. Musi wytworzyć się odpowiednia populacja bakterii saprofitycznych zdolnych do rozerwania pierścienia aromatycznego i przemiany fenoli w proste związki alifatyczne. Powinny również utworzyć się zespoły bakterii metanowych odporne na toksyczne działanie wysokich stężeń fenoli. W tych warunkach muszą one zachować zdolność metanogenezy - przemiany dysymilacyjnej prostych związków alifatycznych do metanu i dwutlenku węgla.

Z wyjątkiem wspomnianych badań nad fermentacją metanową fenolu [1, 2] w zasadzie brak w literaturze wiadomości o wpły-

wie fenoli i pokrewnych związków aromatycznych na fermentację metanową. Niedawno CLARK i FINA [4] oraz FINA i FISKIN [5] stwierdzili, że kwas benzoesowy ulega beztlenowemu rozkładowi w czasie fermentacji metanowej. Brak zdolności rozkładu pirokatechiny i kwasu protokatechowego przez bakteryjne kultury mieszane adaptowane do fermentacji kwasu benzoesowego sugeruje, że beztlenowe drogi przemian w degradacji struktury aromatycznej mogą różnić się od szlaków metabolizmu tlenowego [6, 7].

Wydawało się więc interesujące i potrzebne rozpatrzenie możliwości przystosowania drobnoustrojów fermentacji metanowej do rozkładu różnych fenoli jednowodorotlenowych, fenoli wielowodorotlenowych, naftoli i pokrewnych związków aromatycznych jako podstawowych substratów fermentacyjnych. Należało również stwierdzić cechy odróżniające mechanizm beztlenowego rozkładu fermentacyjnego fenoli od tlenowych szlaków metabolicznych tych związków. Próba rozwiązania tych zagadnień jest przedmiotem niniejszej pracy.

Część doświadczalna

Metodyka badań

Badaniom poddawano środowisko fermentacji metanowej stworzone przez osad technicznie przefermentowany, który pochodził z wydzielonej komory dla mezofilnej fermentacji osadów biogennych. Fermentacji metanowej podlegały chemicznie czyste preparaty fenoli i pokrewnych związków aromatycznych wprowadzane do środowiska fermentacyjnego w postaci roztworów wodnych.

Stężenie dozowanych roztworów było związane z rozpuszczalnością badanych związków i odpowiadało 50,0 g/l w przypadku fenolu oraz 12,5 g/l dla o-, m-i p- krezolu. Dawkowanie 1, 2, 4-; 1, 3, 5 - i 1, 4, 5- ksylenolu prowadzono przy pomocy roztworów o stężeniu 5,0 g/l. Fenole dwuwodorotlenowe: pirokatechina, rezorcyna i hydrochinon oraz fenole trójwodorotlenowe: pirogallol i floroglucyna - miały stężenie 20,0 g/l. Naftole stosowano w postaci soli sodowych o stężeniu 10,0 g/l. W badaniu fermentacji kwasu benzoesowego i pokrewnych hydroksykwasów o charakterze fenoli: kwasu o-hydroksybenzoesowego (kwasu salicylowego) oraz meta- i para-hydroksybenzoesowego - użyto roztworów o stężeniu 5,0 g/l.

Doświadczenia nad fermentacją metanową związków fenolowych prowadzono w skali laboratoryjnej w szczelnie zamkniętych ko-

morach fermentacyjnych. Były to butle szklane o dokładnie wyznaczonej objętości przez cechowanie wodą. Doświadczalne komory fermentacyjne znajdowały się w termostacie utrzymującym temperaturę 32°C ± 1°. Temperatura ta odpowiadała optimum dla mezofilnej fermentacji metanowej.

Membrana z miąsistej gumy w plastikowym uchwycie służyła jako zawór gazowy [8, 9]. Takie zawory gazowe umieszczone w korkach zamykających komory umożliwiały pomiary i likwidację ciśnienia wytwarzającego się gazu fermentacyjnego przy pomocy urządzeń zaopatrzonych w igły iniekcyjne. Pozwalały one również na wprowadzenie roztworów związków fenolowych lub aromatycznych kwasów karboksylowych przy pomocy strzykawek iniekcyjnych.

Pomiary ilości wytwarzającego się gazu fermentacyjnego prowadzono metodą manometryczną opracowaną przez jednego z autorów w pracach wcześniejszych [8, 9]. Metoda ta wykorzystuje przemianę izochoryczno-izotermiczną gazu w reaktorze. W pomiarach ciśnienia w komorach doświadczalnych stosowano manometr rtęciowy wyposażony w igłę iniekcyjną. Przez przebicie zaworu membranowego igłą łączyło się komorę z manometrem, co umożliwiało pomiar ciśnienia. Likwidację ciśnienia gazu w komorze dokonywano przez przebicie zaworu igłą i odprowadzenie gazu do otoczenia.

Charakterystykę analityczną fermentacyjnych środowisk stanowiło oznaczenie fenoli ogólnych i lotnych z parą wodną, kwasów lotnych, alkaliczności, suchej pozostałości ogólnej, straty po prażeniu oraz pH. Fenole ogólne oznaczono umownie metodą bromometryczną, zaś fenole lotne kolorymetrycznie przy użyciu p-nitroaniliny [10]. Pozostałe oznaczenia przeprowadzono zgodnie z zaleceniami STANDARD METHODS [11]. Pomiary pH wykonywano potencjometrycznie przy pomocy elektrody szklanej.

Przebieg doświadczeń i wyniki badań

Adaptację fermentacji metanowej do rozkładu związków fenolowych i pokrewnych związków aromatycznych prowadzono w 3-litrowych komorach, które zawierały 1 litr osadu technicznie przefermentowanego. Osad pobrany z wydzielcnej komory fermentacyjnej podlegał cedzeniu przez sito o 3 mm średnicy oczek w celu usunięcia zanieczyszczeń gruboziarnistych naruszających jednorodność środowiska fermentacyjnego. Prawidłowy przebieg fermentacji metanowej wymagał stworzenia warunków beztlenowych w tych środowiskach. Uzyskiwało się to przez przepłukiwanie komór doświadczalnych technicznym dwutlenkiem węgla.

Adaptację środowiska fermentacyjnego do beztlenowego rozkładu fenoli wywoływano przez wprowadzanie w odstępach 2 do 3-dniowych pregresywnie wzrastających dawek 100, 200, 300,.....

itd. mg/l substratu. Dozowany związek fenolowy był jedynym substratem organicznym wprowadzanym do środowiska fermentacyjnego. Sposób ten zapożyczono z prac poprzednich [1, 2] w których uzyskiwano szybką adaptację fermentacji metanowej do rozkładu fenolu jako jedynego substratu fermentacyjnego. Doświadczenia polegały na pomiarze dobowej ilości wytwarzanego gazu fermentacyjnego dokonywanym w odstępach 24 godzinnych. Mieszanie zawartości komór odbywało się raz dziennie podczas pomiarów metanogenezy.

Dawkowanie fenoli przerywano jeżeli w dłuższym okresie obserwacji wytwarzanie gazu w komorze doświadczalnej było niższe niż w komorach kontrolnych lub jeżeli 2 do 3-dniowy okres fermentacji nie wystarczał do całkowitego przefermentowania wprowadzonej porcji związku fenolowego. Stopniowo malejące wytwarzanie gazu przy wzroście stężenia doprowadzonych substratów lub całkowity brak fermentacji związków, które okazały się niepodatne na fermentację metanową wskazywał na zakończenie doświadczenia.

Program badań obejmował obserwację fermentacji metanowej fenoli w kilku ściśle powtórzonych seriach doświadczeń. W każdej takiej serii badanie fermentacji określonego związku fenolowego prowadzono w dwu równolegle traktowanych komorach fermentacyjnych. Od zasady tej odstąpiono w kilku wyjątkowych wypadkach podyktowanych liczebnością użytych komór doświadczalnych. W każdej serii badań dwie komory nie były obciążone substratem fenolowym i służyły jako kontrola obserwacji.

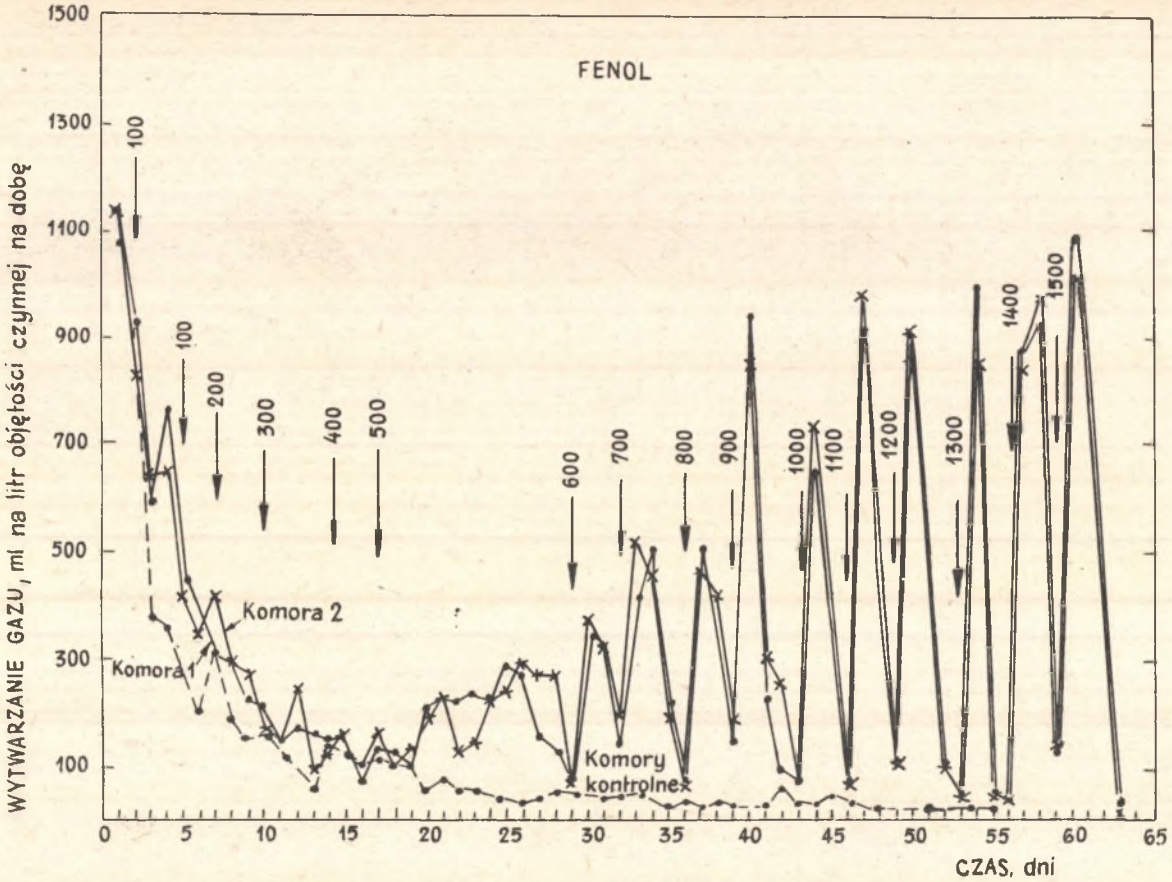
Do szczegółowego omówienia w tej rozprawie wybrano jedną z serii badań. W serii tej użyto 34 komór doświadczalnych. Tablica I podaje symbole i przeznaczenie komór zastosowanych w badaniach fermentacji metanowej fenoli i związków pokrewnych. Badano zdolność przystosowania się fermentacji metanowej do beztlenowego rozkładu fenolu, krezoli, ksylenoli, naftoli, jednowodorotlenowych kwasów benzoesowych oraz kwasu benzoesowego. Zakres stosowanych stężeń substratów dozowanych do środowiska fermentacyjnego określa tablica I.

W czasie 60-dniowego cyklu badań stwierdzono, że liczne związki fenolowe ulegają beztlenowemu rozkładowi w procesie adaptowanej fermentacji metanowej. W grupie lotnych fenoli jednowodorotlenowych całkowitej przemianie w gaz fermentacyjny ulegał fenol (rysunek 1) i p-krezol (rysunek 2). Spośród trzech izomerów fenoli dwuwodorotlenowych fermentacji podlegała jedynie rezorcyna (rysunek 3). Fermentowały oba badane izomery fenoli trójwodorotlenowych: piregallol (rysunek 4) i floroglucyna (rysunek 5). Beztlenowemu rozkładowi ulegał również kwas benzoesowy (rysunek 6) oraz trzy izomery jednowodorotlenowych kwasów benzoesowych o charakterze fenoli: kwas o-hydroksybenzoesowy - kwas salicylowy (rysunek 7), kwas m-hydroksybenzoesowy (rysunek 8) oraz kwas p-hydroksybenzoesowy (rysunek 9). Podane rysunki ilustrują wytwarzanie gazu fermentacyjnego z beztlenowego rozkładu substratów fenolowych w porównaniu z wytwarzaniem gazu przez komory kontrolne.

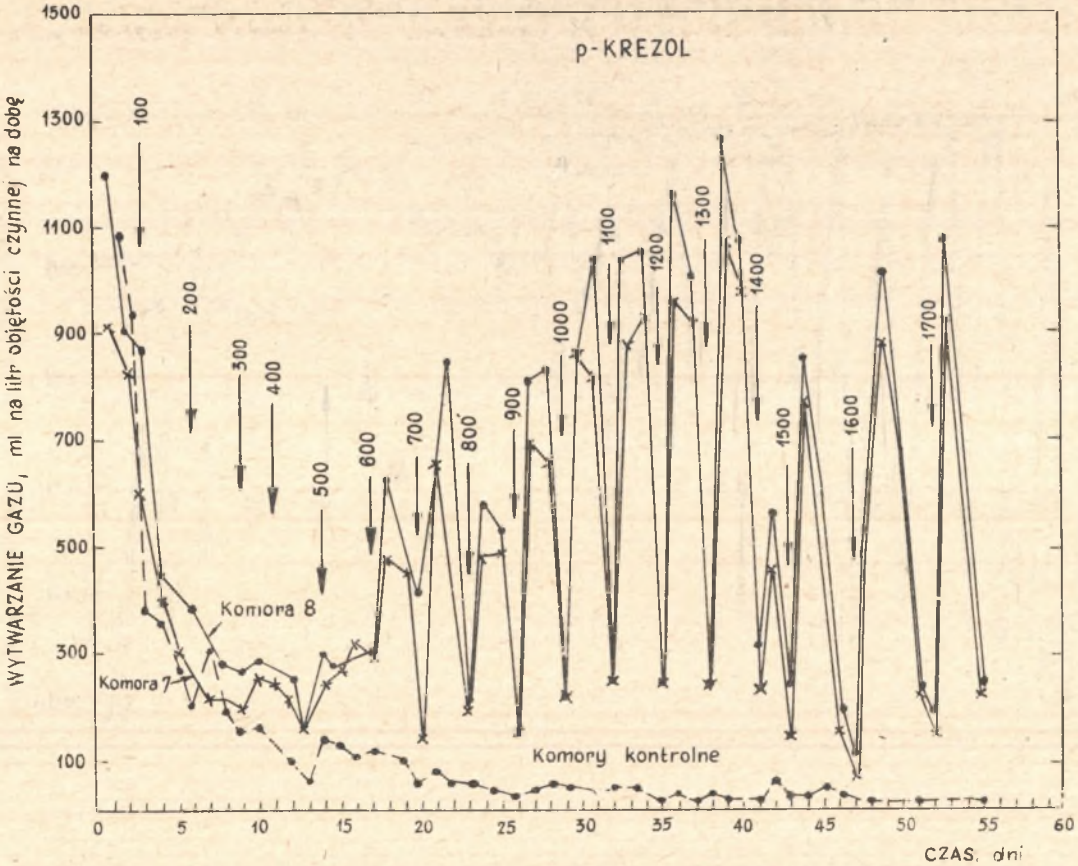
Tablica I

Zdolność wykorzystywania fenoli i pokrewnych związków aromatycznych jako substratów adaptowanej fermentacji metanowej

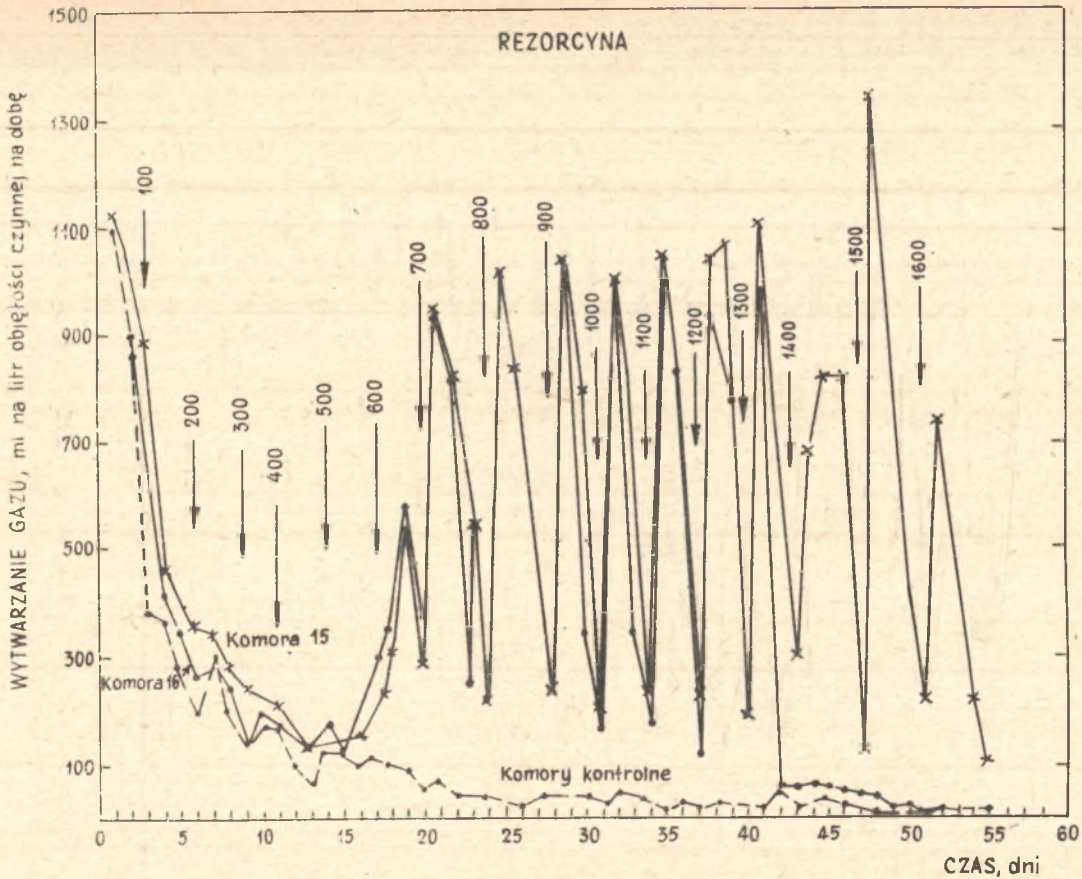
Substraty fermentacji: Grupa związków	Substraty fermentacji: Związek aromatyczny	Symbol komory	Zakres stężeń dozowania substratu mg/l	Fermentacja	Fenole ogólne mg/l	Fenole lotne mg/l	Kwasy lotne mg/l CH_3COOH	Alkaliczność mg/l $CaCO_3$	Sucha pozostałość ogólna %	Strata przy prażeniu suchej pozostałości %	pH
Fenole jednowodorotlenowe	fenol	1 2	100 do 1500	+ +	68 50	62 42	268 242	3310 3260	3,20 3,14	46,21 45,28	8,4 8,4
	o-krezol	3 4	100 do 600	- -	2060 2040	2065 2020	290 282	2980 2960	3,22 3,15	44,60 45,10	8,2 8,2
	m-krezol	5 6	100 do 600	- -	2055 2060	2080 2062	310 315	3100 3055	3,57 3,64	45,15 46,00	8,4 8,4
	p-krezol	7 8	100 do 1700	+ +	30 27	32 15	238 217	2870 2940	3,25 3,34	45,28 45,71	8,3 8,3
	1,2,4-ksylenol	9	100 do 500	-	1435	1460	368	2960	3,78	47,25	8,4
	1,3,5-ksylenol	10 11	100 do 500	- -	1430 1435	1420 1435	335 340	2680 2700	3,40 3,52	46,04 45,90	8,3 8,3
	1,4,5-ksylenol	12	100 do 500	-	1442	1450	352	2950	3,89	48,00	8,4
Fenole dwuwodorotlenowe	pirokatechina	13 14	100 do 600	- -	2080 2085	21 15	198 210	3020 3015	3,76 3,92	46,20 45,38	8,2 8,2
	rezorcyna	15 16	100 do 1600	+ +	50 48	37 40	210 206	3380 3440	2,97 3,05	42,47 43,20	8,4 8,4
	hydrochinon	17 18	100 do 600	- -	2065 2050	10 12	262 295	2960 2985	3,67 3,80	47,20 47,45	8,3 8,3
Fenole trójwodorotlenowe	pirogallol	19 20	100 do 1700	+ +	60 55	6 0	221 235	2860 3000	3,62 3,58	48,21 47,96	8,2 8,3
	florogluoyna	21 22	100 do 1700	+ +	182 121	10 8	276 268	3250 3320	3,96 3,87	47,22 47,30	8,3 8,3
Naftole	α - naftol β - naftol	23 24	100 do 600 100 do 600	- -	2070 2060	0 10	392 350	2940 2980	3,56 3,80	48,20 45,78	8,1 8,1
Aromatyczne kwasy karboksylowe	kwas benzoesowy	25 26	100 do 1700	+ +	69 102	5 15	296 305	3320 3086	3,62 3,41	48,20 48,15	8,3 8,1
	kwas o-hydroksybenzoesowy (salicylowy)	27 28	100 do 1700	+ +	78 110	10 12	268 272	2970 2995	3,60 3,56	48,36 48,30	8,1 8,1
	kwas m-hydroksybenzoesowy	29 30	100 do 1100	+ +	67 70	6 0	229 233	3110 3160	3,66 3,74	49,10 48,95	8,2 8,2
	kwas p-hydroksybenzoesowy	31 32	100 do 1000	+ +	82 87	15 30	302 306	3220 3205	3,70 3,70	48,20 48,20	8,2 8,2
Nieobciążone komory kontrolne - analiza wstępna środowiska przed adaptacją		33 34	-	+ +	0	0	1220	2510	5,10	52,08	7,5
Nieobciążone komory kontrolne - końcowa analiza kontrolna		33 34	-	+ +	0 0	0 0	136 128	4160 4210	3,21 3,48	47,62 46,98	8,4 8,4



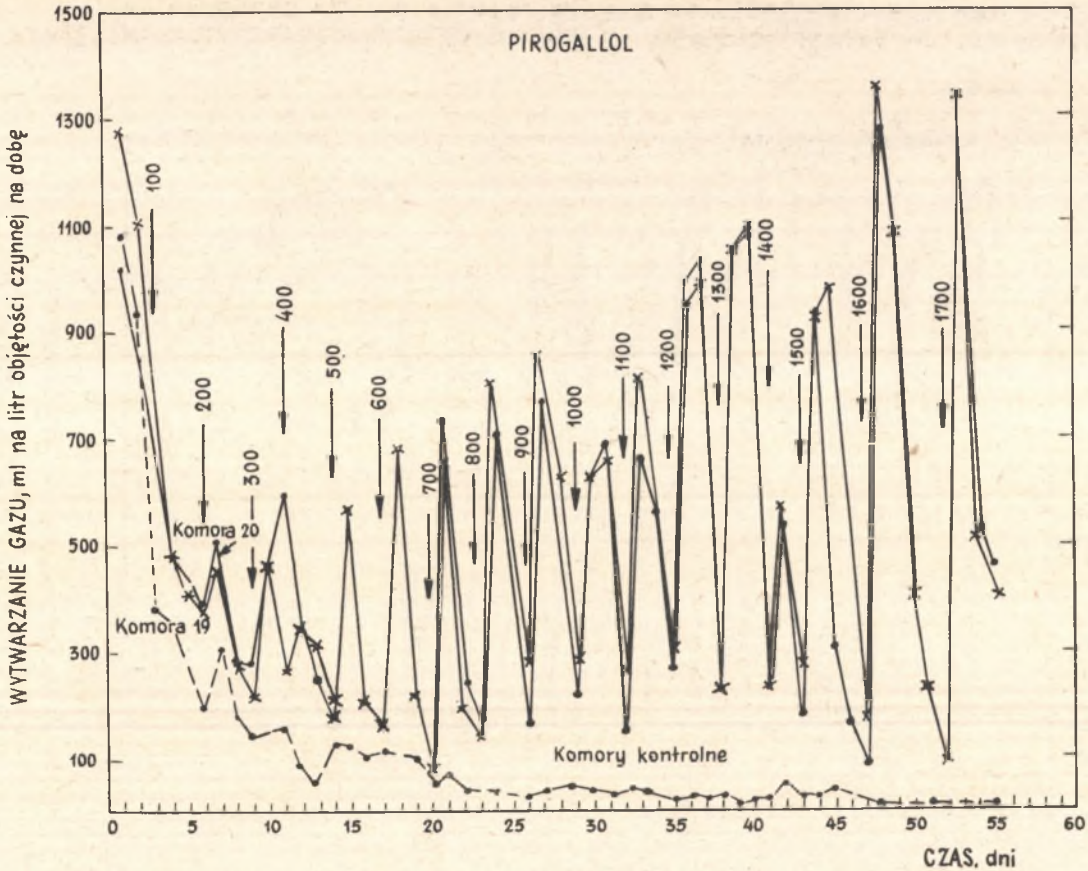
Rys. 1. Przystosowanie fermentacji metanowej do rozkładu fenolu. Dozowanie rosnących dawek od 100 do 1500 mg/l w odstępach kilkudniowych



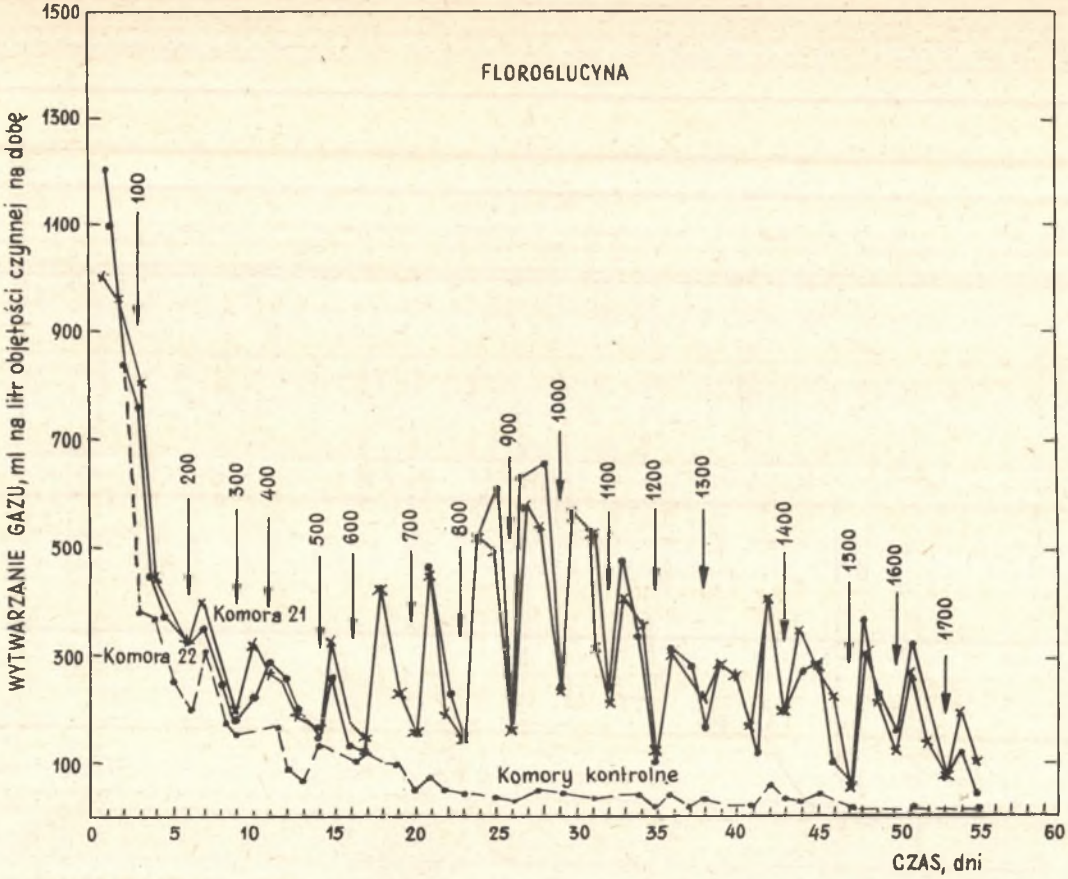
Rys. 2. Przystosowanie fermentacji metanowej do rozkładu p-krezolu. Dozowanie rosnących dawek od 100 do 1700 mg/l w odstępach kilkudniowych



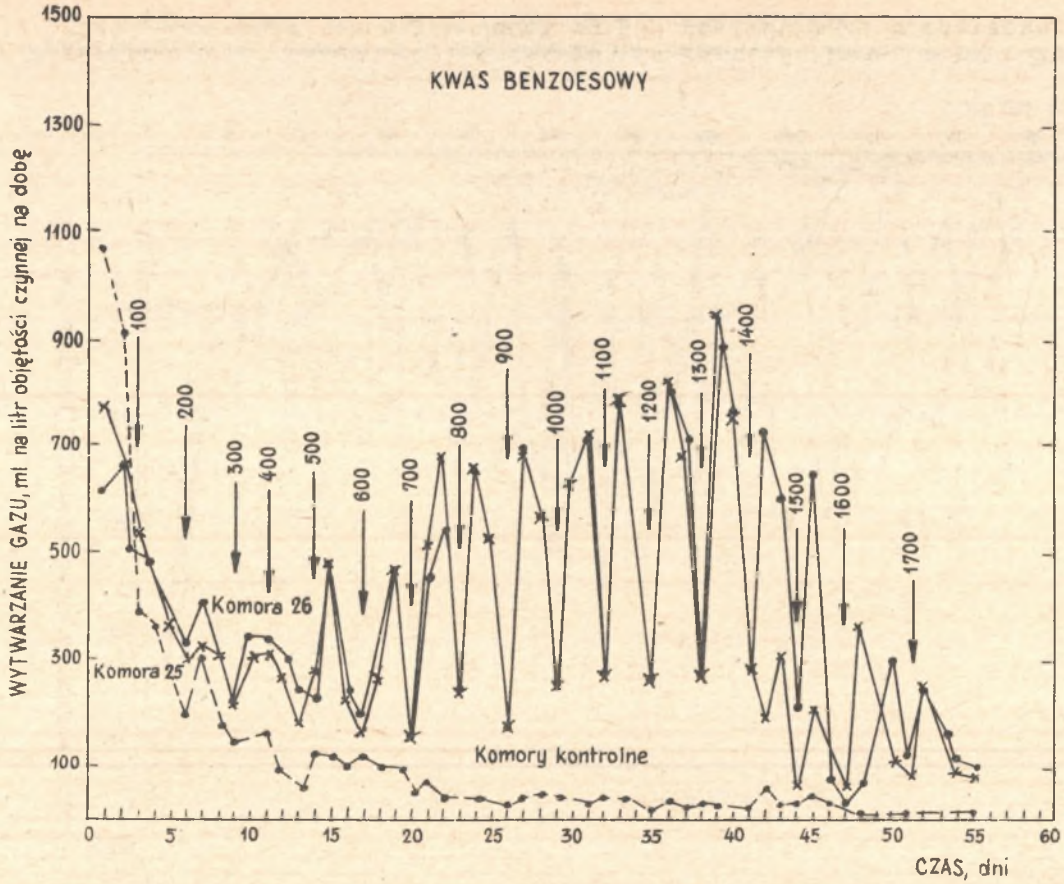
Rys. 3. Przystosowanie fermentacji metanowej do rozkładu rezorcyny. Dozowanie rosnących dawek od 100 do 1600 mg/l w odstępach kilkudniowych



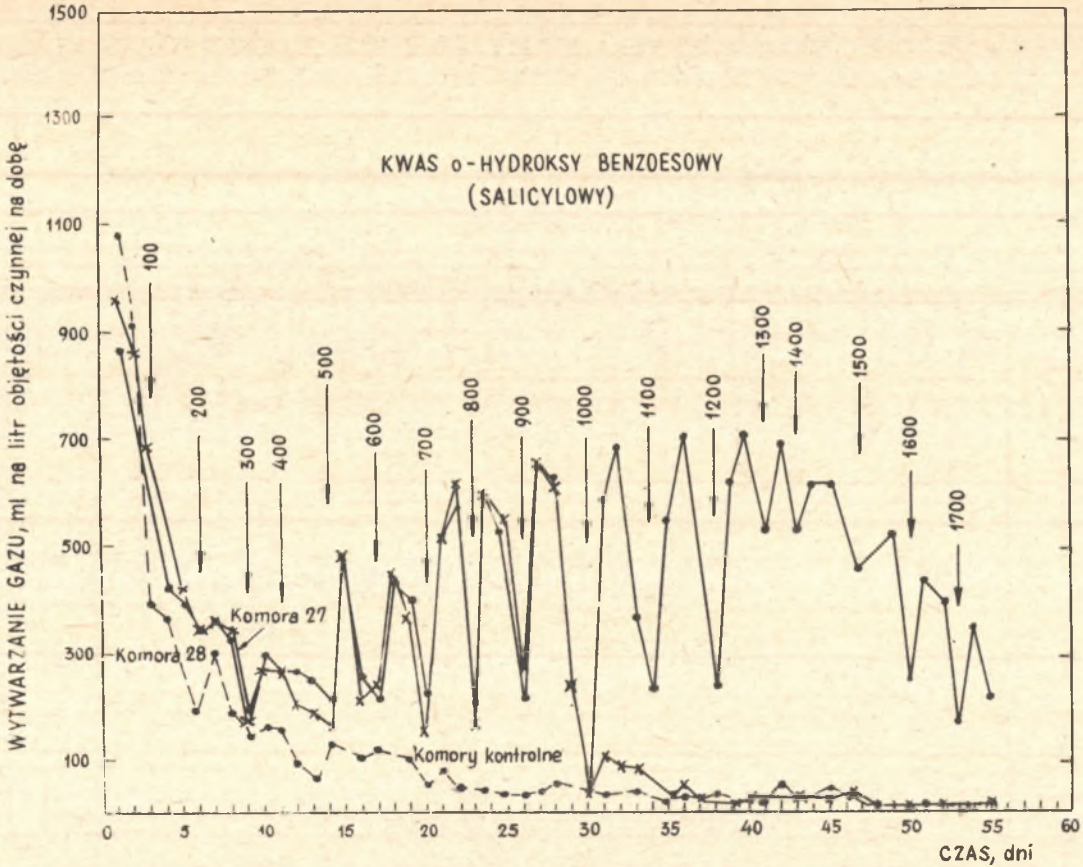
Rys. 4. Przystosowanie fermentacji metanowej do rozkładu pirogallolu. Dozowanie rosnących dawek od 100 do 1700 mg/l w odstępach kilkudniowych



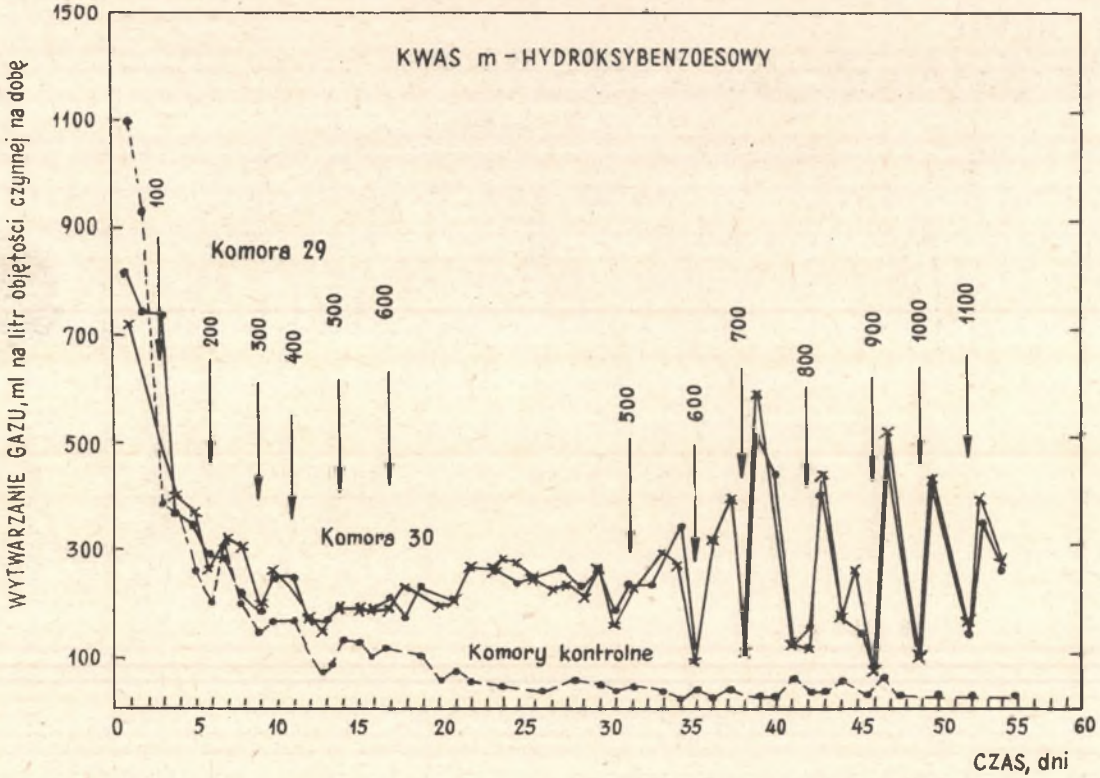
Rys. 5. Przystosowanie fermentacji metanowej do rozkładu floroglucyny. Dozowanie rosnących dawek od 100 do 1700 mg/l w odstępach kilkudniowych



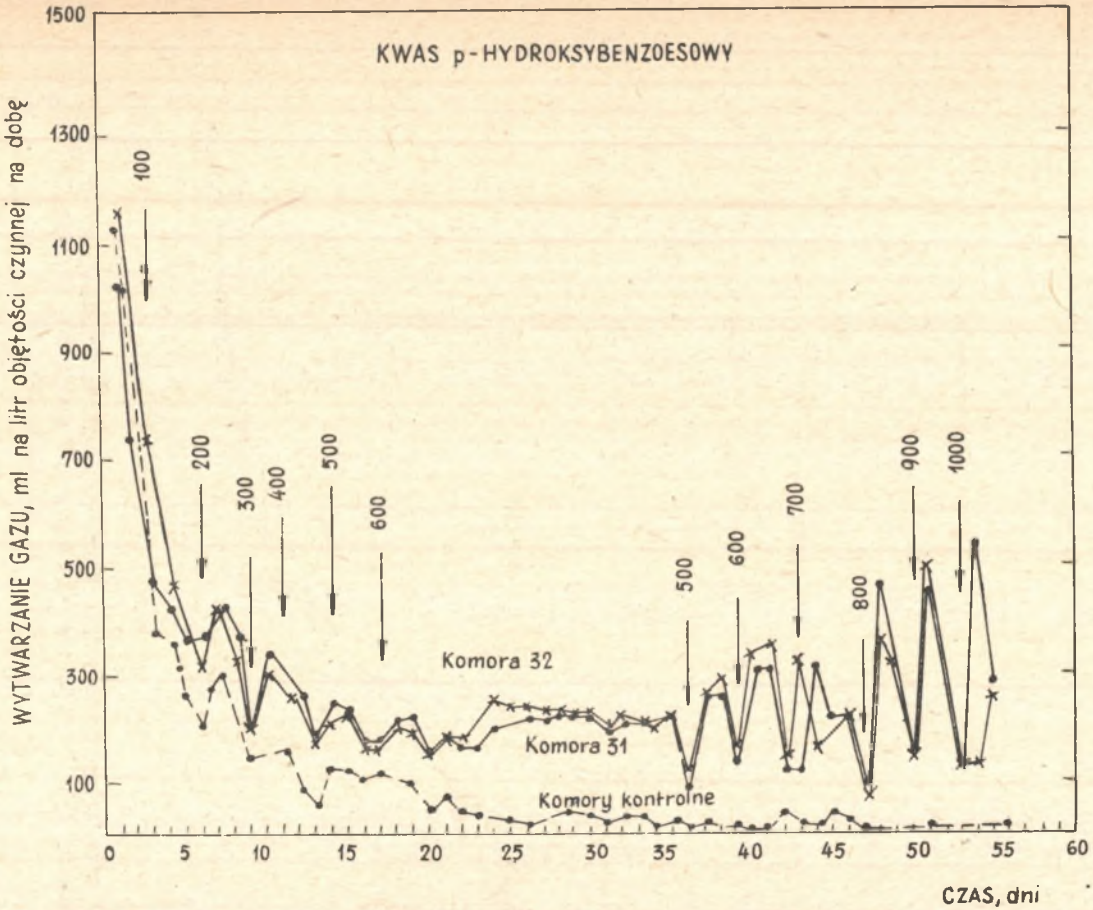
Rys. 6. Przystosowanie fermentacji metanowej do rozkładu kwasu benzoesowego. Dozowanie rosnących dawek od 100 do 1700 mg/l w odstępach kilkudniowych



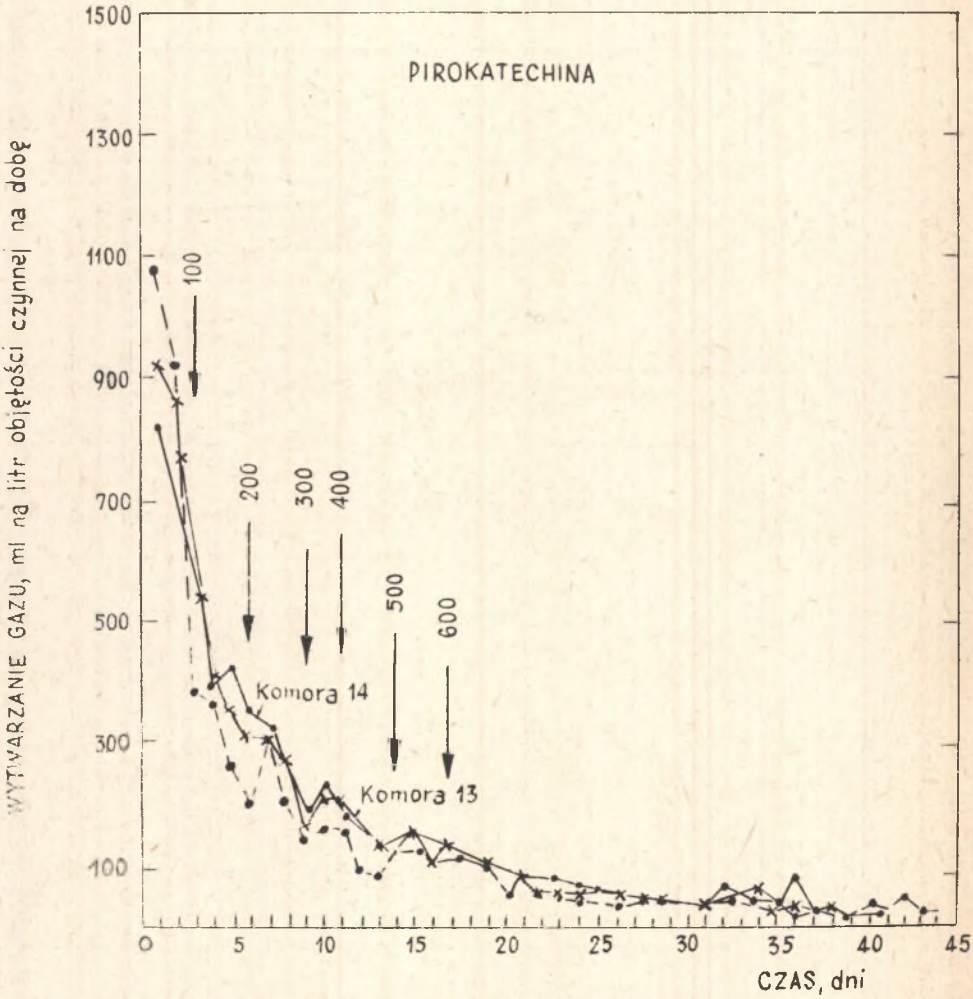
Rys. 7. Przystosowanie fermentacji metanowej do rozkładu kwasu o-hydroksybenzoesowego (salicylowego). Dozowanie rosnących dawek od 100 do 1700 mg/l w odstępach kilkudniowych



Rys. 8. Przystosowanie fermentacji metanowej do rozkładu kwasu m-hydroksybenzoesowego
Dozowanie rosnących dawek od 100 do 1100 mg/l w odstępach kilkudniowych



Rys. 9. Przystosowanie fermentacji metanowej do rozkładu kwasu p-hydroksybenzoesowego
Dozowanie rosnących dawek od 100 do 1000 mg/l w odstępach kilkudniowych

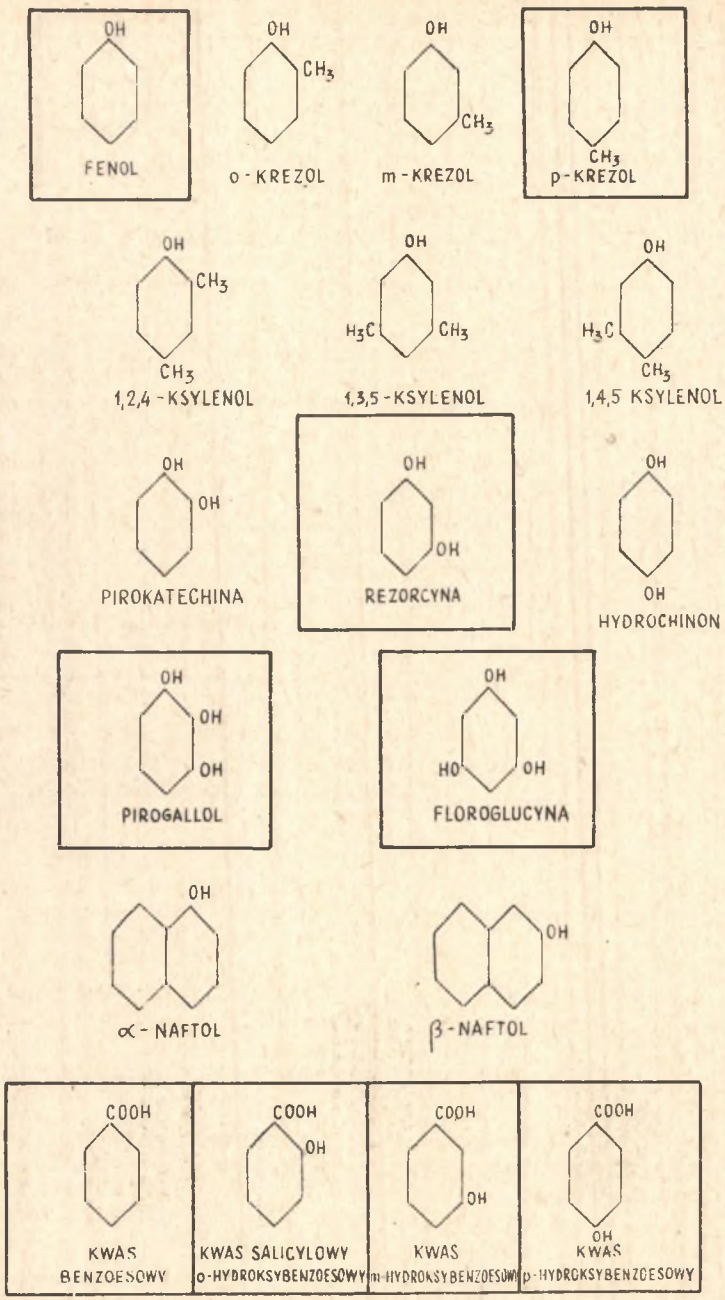


Rys. 10. Przystosowanie fermentacji metanowej do rozkładu pirokatechiny. Dozowanie rosnących dawek od 100 do 600 mg/l w odstępach kilkudniowych

Tablica II

Wytwarzanie gazu fermentacyjnego w czasie rozkładu niektórych fenoli i pokrewnych związków aromatycznych, stwierdzone doświadczalnie i obliczone stechiometrycznie z równania BUSWELLa

Dozowany związek aromatyczny	Symbol komory	Sumaryczna ilość związku aromatycznego wprowadzona podczas dozowania mg/l	Ilość gazu fermentacyjnego			Jednokrotna dawka związku aromatycznego wprowadzona podczas dozowania mg/l	Ilość gazu fermentacyjnego		
			stechiometryczna ml/l	doświadczalna ml/l	% ilości stechiometrycznej		stechiometryczna ml/l	doświadczalna ml/l	% ilości stechiometrycznej
fenol	1	7800	11154	10366	93,0	1000	1430	1314	91,8
	2	6600	9438	9242	97,9	1100	1573	1569	99,7
p-krezol	7	15300	22200	22190	99,9	1500	2175	1971	90,6
	8	15300	22200	21680	97,9	1500	2175	1820	83,6
rezorcyna	15	12300	15018	14270	95,1	1300	1587	1268	80,3
	16	13600	16606	15809	95,8	1500	1831	1720	93,9
pirogallol	19	15300	16310	15820	97,0	1500	1599	1500	93,9
	20	15300	16310	15250	93,5	1500	1599	1466	94,1
floro-glucyna	21	15300	22200	18620	83,9	1300	1386	1320	94,3
	22	15300	22200	16890	76,0	1200	1279	1200	90,9
kwas benzoesowy	25	15300	18681	18000	96,0	1400	1709	1700	99,9
	26	15300	18681	18670	99,9	1500	1832	1812	98,9
kwas o-hydroksy-benzoesowy	27	5500	5863	5422	92,4	700	746	641	86,0
	28	15300	16310	16302	99,5	1600	1706	1698	99,5
kwas m-hydroksy-benzoesowy	29	7900	8421	8320	98,8	700	746	702	94,1
kwas p-hydroksy-benzoesowy	31	6600	7036	7000	99,4	700	746	669	89,6



Rys. 11. Zdolność fermentacyjna a struktura fenoli i pokrewnych związków aromatycznych. Substancje ulegające adaptowanej fermentacji metanowej są w prostokątach

Analogiczny przebieg fermentacji szczątkowej w obu komorach kontrolnych uzasadniał przyjęcie wartości średnich z produkcji gazu dla kontroli doświadczenia.

Całkowitą odporność na działanie środowiska fermentacyjnego wykazywały wśród fenoli jednowodorotlenowych orto- i metakrezol oraz wszystkie badane ksylenole. Nie fermentowały również fenole dwuwodorotlenowe: pirokatechina (rysunek 10) i hydrochinon. Niefermentujące okazały się również oba naftole. Dozowanie związków fenolowych, które nie ulegały fermentacji lub hamowały proces fermentacyjny- przerywano przy dawce rzędu 500 do 600 mg/l. W dalszym jednak ciągu obserwowano wytwarzanie gazu przez komory obciążone przez te fenole do około 45 dnia doświadczenia.

Badania zakończono przez analizę środowisk z poszczególnych komór fermentacyjnych. Tablica I podaje wyniki oznaczeń, które ujawniają zmiany jakie zaszły w tych środowiskach wskutek długotrwałego obciążenia fenolami. Umożliwia ono porównanie zachodzących zmian z wynikami analizy wstępnej i analizą środowiska z komór kontrolnych.

Przeprowadzono również porównanie ilości gazu fermentacyjnego, tworzącego się w adaptowanym środowisku z jednostki masy poszczególnych fenoli fermentujących z wielkością teoretyczną obliczoną ze stechiometrycznego równania BUSWELLa [12, 13]. Tablica II podaje doświadczalne i stechiometryczne ilości gazu fermentacyjnego, które tworzyły się z sumarycznych mas dozowanych substratów fenolowych. Tablica ta informuje również o ilościach gazu tworzących się z niektórych pojedynczych dawek substratów wybranych w okresie ustalonej adaptacji.

Rysunek 11 ilustruje próbę powiązania zdolności fermentacyjnych badanych fenoli i pokrewnych związków aromatycznych z ich budową chemiczną.

O m ó w i e n i e w y n i k ó w

Przeprowadzono badania nad fermentacją metanową fenoli jednowodorotlenowych i polifenoli oraz kilku kwasów aromatycznych o charakterze fenoli. Związki fenolowe służyły w tych badaniach jako jedyny substrat organiczny dla mieszanych populacji drobnoustrojów fermentacji metanowej.

Stwierdzono, że w tym procesie fermentacyjnym beztlenowej degradacji łatwo ulega fenol, p-krezol, rezorcyna, pirogallol, floroglucyna oraz pokrewne związki aromatyczne: kwas benzoesowy, kwas o-hydroksybenzoesowy (salicylowy), kwas m-hydroksybenzoesowy i kwas p-hydroksybenzoesowy.

Z przeprowadzonych badań wynika, że niektóre fenole mogą być substratem fermentacji metanowej, podobnie jak inne związki organiczne występujące w przyrodzie. Jednak proces fermen-

tacyjny musi poddać się adaptacji do wykorzystywania tych "egzotycznych" substratów. Badania te w sposób doświadczalny rozszerzają przypuszczenia TARVINa i BUSWELLa [14] o możliwości fermentacyjnego rozkładu fenolu. Uzupełniają również poprzednie prace CHMIELOWSKIego, GROSSMANa i WĘGRZYNOWSKIej [1] oraz CHMIELOWSKIego i GROSSMANa [2], w których opracowano sposób adaptacji środowiska beztlenowego do fermentacji fenolu.

W badaniu fermentacji metanowej fenolu (rysunek 1) proces przystosował się do przyswajania tego substratu po około 20 dniach adaptacji. W tym czasie wprowadzano sumaryczną ilość fenolu rzędu 1600 mg. Prawdopodobnie w tym okresie w populacji mieszanej tworzył się zespół bakterii saprofitycznych zdolnych do metabolizowania struktury aromatycznej fenolu. W warunkach wytworzonej adaptacji obserwowano maksymalny przyrost gazu fermentacyjnego w drugim dniu od chwili zasilenia, po czym gazowanie spadało do wartości kontrolnych. Zjawisko takie świadczyło o całkowitym rozkładzie wprowadzanych porcji fenolu. Towarzyszyło ono wprowadzeniu wzrastających dawek fenolu do stężenia rzędu 1500 mg/l, które osiągnięto około 60 dnia doświadczenia. Wydaje się jednak, że nie była to jeszcze najwyższa zdolność fermentacyjna układu; jednak dalsze dozowanie substratu zostało przerwane ze względu na program badań.

Wśród lotnych fenoli jednowodorotlenowych intesywnemu rozkładowi ulegał również p-krezol (rysunek 2). Fermentację tę adaptowano analogicznie jak w przypadku fenolu. Układ przystosowywał się do degradacji p-krezolu już po 12 dniach doświadczenia, po wprowadzeniu 400 mg tego substratu. Dozowanie p-krezolu prowadzono do stężenia rzędu 1700 mg/l. Wprowadzona dawka tego związku ulegała przefermentowaniu w ciągu trzech dni. Nie obserwowano gromadzenia się p-krezolu w środowisku. Świadczyło to o łatwym przystosowaniu się środowiska do rozkładu tego związku.

Przebieg wytwarzania gazu w adaptowanej fermentacji metanowej rezorcyny (rysunek 3) wskazuje na łatwe przystosowanie się środowiska fermentacyjnego do degradacji tego dwufenolu. Adaptacja występowała około 12 dnia doświadczenia po wprowadzeniu 1500 mg rezorcyny. Stwierdzono, że czas potrzebny na rozkład porcji tego związku większej od 1200 mg/l przekraczał trzy dni. Rozkład dawek rzędu 1600 mg/l rezorcyny wymagał około czterech dni fermentacji.

Spośród fenoli trójwodorotlenowych badano fermentację dwu dostępnych związków: pirogallolu i floroglucyny. Stwierdzono, że oba te fenole mogą służyć jako substrat dla drobnoustrojów fermentacji metanowej. Fermentacja ta adaptowała się do beztlenowego rozkładu pirogallolu (rysunek 4) już po 6 dniach procesu. W tym okresie wprowadzono 300 mg tego związku. Adaptację doprowadzono do stężenia 1700 mg/l pirogallolu, przy czym nie osiągnięto jeszcze maksymalnej zdolności adaptacyjnej układu. Wprowadzone dawki pirogallolu ulegały zgazowaniu w ciągu dwóch do trzech dni. Potwierdza to przypuszczenie, że również wyższe stężenia pirogallolu mogłyby podlegać rozkładowi beztlenowemu.

Fermentacja metanowa adaptowała się do degradacji floroglucyny (rysunek 5) równie szybko jak do degradacji pirogallolu, po wprowadzeniu 300 mg substratu. W czasie badań nad adaptacją floroglucyny stwierdzono, że wprowadzenie dawek większych od 900 mg/l powodowało stopniowe zmniejszanie się ilości wytwarzanego gazu fermentacyjnego. Wskazuje to na częściowe hamowanie fermentacji metanowej, które zwykle ujawnia się w przypadku przeciążenia komory substratem fermentacyjnym [9].

W celu bardziej wszechstronnego poznania zjawiska beztlenowego rozkładu związków aromatycznych w fermentacji metanowej poddawano badaniu również niektóre aromatyczne kwasy karboksylowe: kwas benzoesowy (rysunek 6) i jego hydroksylowe pochodne: kwas o-hydroksybenzoesowy (kwas salicylowy - rysunek 7), kwas m-hydroksybenzoesowy (rysunek 8) oraz kwas p-hydroksybenzoesowy (rysunek 9). Stwierdzono łatwą adaptację środowiska do beztlenowego rozkładu tych związków aromatycznych.

Kwas benzoesowy (rysunek 6) i kwas salicylowy (rysunek 7) wywoływał przystosowanie się fermentacji do zgazowania tych substratów już po około 10 dniach. W obu przypadkach obserwowano zjawisko przeciążenia substratowego, które ujawniało się po wprowadzeniu dawki rzędu 1300 mg/l. Wskutek tego przeciążenia dozowanie substratów w ilości 1700 mg/l wywoływało już nikłą metanogenezę.

Nieco odmiennie przebiegała adaptacja środowiska fermentacyjnego do degradacji kwasu m-hydroksybenzoesowego (rysunek 8) i kwasu p-hydroksybenzoesowego (rysunek 9). Te procesy adaptacyjne przebiegały wolniej, podobnie jak adaptacja do rozkładu fenolu. Układy przystosowywały się do wykorzystywania tych substratów fermentacyjnych po dwóch tygodniach procesu. W tym okresie układy te obciążano około 1800 mg substratu. Początkowo oba środowiska nie przefermentowywały całych wprowadzonych porcji kwasów hydroksybenzoesowych. Dopiero po zastosowaniu około dwutygodniowej przerwy w dozowaniu substratów i po zgazowaniu zmagazynowanego substratu, dalsze dozowanie kwasów umożliwiło adaptację do rozkładu porcji tych substratów rzędu 1000 mg/l.

Różnice w szybkości przystosowywania się fermentacji metanowej do rozkładu poszczególnych związków fenolowych są prawdopodobnie związane z budową chemiczną tych substratów. Mogą również wskazywać na różną szybkość wzrostu wzbogaconej kultury bakterii saprofitycznych pod wybiórczym wpływem określonego związku fenolowego. Można spodziewać się, że proces przystosowania się fermentacji metanowej do degradacji fenoli polega na utworzeniu specyficznej populacji mieszanej drobnoustrojów. Pod wpływem wzrastających stężeń poszczególnych dozowanych fenoli tworzy się wzbogacona kultura bakterii saprofitycznych, które adaptacyjnie nabyły zdolności rozszczepienia pierścienia aromatycznego. Narasta również populacja bakterii metanowych odpornych na wysokie stężenie fenoli. Substratem metanogenezy są wyłącznie niższe kwasy organiczne, które tworzą się jako pośrednie produkty rozkładu pierścienia aromatycznego związków fenolowych.

Interesujące było również stwierdzenie, że fermentacja metanowa jednej grupy fenoli nie osiągała maksymalnej zdolności adaptacyjnej nawet pod wpływem dawek rzędu 1700 mg/l (fenol, p-krezol, pirogallol). Dla innych fenoli i związków pokrewnych już powyżej stężeń 900 do 1200 mg/l (floroglucyna, kwas benzoesowy i salicylowy) można było zaobserwować substratowe hamowanie fermentacji.

Beztlenowy rozkład fenoli podatnych na fermentację metanową prowadził do przemiany w gaz fermentacyjny (tablica II). Zgazowanie to przebiegało na ogół w sposób zgodny z wyliczeniami teoretycznymi wynikającymi ze stechiometrycznego równania BUSWELLa [12, 13]. Doświadczalnie stwierdzone ilości tworzącego się gazu były rzędu 95% wartości stechiometrycznych. Były one niższe od teoretycznych, ponieważ nie cała masa substratów ulegała dysymilacyjnej przemianie w metan i dwutlenek węgla z dostarczeniem energii swobodnej tej degradacji. Część produktów pośrednich z rozkładu substratów służyła jako materiał budulcowy dla nowych komórek mieszanych populacji mikroorganizmów. Obserwowano też niekiedy, że dobowa ilość tworzącego się gazu fermentacyjnego znacznie odbiegała od przewidzianej stechiometrycznie. Natomiast globalna objętość wytworzonego gazu w całym procesie fermentacyjnym była bliska obliczonej z równania BUSWELLa dla dawki sumarycznej. Te odchylenia dobowe były związane z hamowaniem fermentacji w niektórych komorach doświadczalnych. Ujawniało się ono w początkowym okresie przystosowywania wskutek niedostatecznej adaptacji i przeciążenia substratowego nielicznej jeszcze, czynnej populacji bakteryjnej. W dalszej fermentacji adaptowanej dozowane fenole zmagazynowane w komorze zostały przemienione w gaz.

W czasie przeprowadzonych badań stwierdzono zaskakującą odporność niektórych związków fenolowych na działanie środowiska fermentacji metanowej. Wśród lotnych fenoli jednowodorotlenowych nie fermentował o-krezol, m-krezol oraz wszystkie badane ksylenole: 1.2.4-ksylenol, 1.3.5-ksylenol i 1.4.5-ksylenol. W grupie fenoli wielowodorotlenowych beztlenowemu rozkładowi nie ulegała pirokatechina i hydrochinon. Również α- i β-naftol nie podlegały fermentacji.

Szczególnie niespodziewany był brak zdolności adaptacyjnego fermentowania pirokatechiny (rysunek 10), która ulegała łatwemu rozkładowi przez drobnoustroje w warunkach tlenowych. Jest ona również powszechnym produktem pośrednim w tlenowej degradacji wielu związków fenolowych [6, 7].

Wpływ fenoli niefermentujących na fermentację metanową przebiegał analogicznie jak w przypadku pirokatechiny (rysunek 10). W początkowym stadium adaptacji krzywa wytwarzania gazu przebiegała zgodnie z fermentacją kontrolną. Zwykle po wprowadzeniu dawki 500 mg/l wytwarzanie gazu w komorach doświadczalnych spadało poniżej wartości kontrolnych. Takie hamujące działanie na fermentację szczątkową wyraźnie wykazywał m-krezol, ksylenole, hydrochinon i α-naftol. Wpływ ten można by wiązać z działaniem toksycznym tych związków.

Badania nad przystosowaniem fermentacji metanowej do rozkładu fenoli i związków pokrewnych podlegały kontroli analitycznej. Polegały one głównie na oznaczaniu wartości fenoli ogólnych i lotnych w poszczególnych komorach doświadczalnych oraz na wykonywaniu oznaczeń zwykle stosowanych dla charakterystyki przebiegu fermentacji metanowej. Oznaczenia te (tablica I) wykonane na zakończenie badań podają wyraźny obraz zmian, jakie zachodziły w adaptowanym i nieprzystosowanym środowisku fermentacyjnym w porównaniu z fermentacją kontrolną.

W układach adaptowanych do rozkładu fenolu (Komora 1 i 2) oraz p-krezolu (Komora 7 i 8) ilości fenoli ogólnych i lotnych były resztkowe wskutek całkowitej przemiany tych substratów w gaz fermentacyjny. Analiza końcowa środowisk niezaadaptowanych do degradacji innych fenoli jednowodorotlenowych wykazywała obecność fenoli ogólnych i lotnych w ilościach współmiernych globalnym porojom substratów wprowadzonych do poszczególnych komór. Dowodzi to całkowitego zahamowania lub uszkodzenia fermentacji w środowiskach obciążonych przez o-krezol (Komora 3 i 4), m-krezol (Komora 5 i 6) i różne izomery ksylenoli (Komora 9, 10, 11, 12). Fenole te zostawały całkowicie zmagazynowane w komorach fermentacyjnych.

Analiza końcowa środowiska fermentacyjnego przystosowanego do degradacji fenoli dwuwodorotlenowych wykazała, że ilości fenoli ogólnych, oznaczanych bromometrycznie, były śladowe w komorach adaptowanych do rezorcyny (Komora 15 i 16). Środowisko obciążone przez pirokatechinę (Komora 13 i 14) lub przez hydrochinon (Komora 17 i 18) wykazywało obecność fenoli ogólnych w ilościach współmiernych globalnym porojom wprowadzonych substratów. Związki te akumulowały się w środowisku, nie podlegały degradacji i zgazowaniu.

Fermentacja metanowa łatwo przystosowywała się do beztlenowego rozkładu fenoli trójwodorotlenowych: pirogallolu (Komora 19 i 20) i floroglucyny (Komora 21 i 22). Potwierdzały to spostrzeżenie oznaczenia analityczne, które wykazywały resztkowe ilości fenoli ogólnych w środowiskach obciążonych przez te substraty.

Oba izomery naftoli okazały się odporne na działanie fermentacji metanowej i wykazywały własności toksyczne wyraźnie ujawniające się u α-naftolu. Dozowane naftole gromadziły się w środowisku fermentacyjnym (Komora 23 i 24), w którym ujawniono je w ilościach odpowiadających dozowaniu.

Środowisko fermentacyjne przystosowane do beztlenowego rozkładu kwasu benzoesowego (Komora 25 i 26) i jego hydroksylowych pochodnych o charakterze fenoli (Komora 27, 28, 29, 30, 31, 32) wykazywało obecność tych substratów. Uległy one metanogenezie w adaptowanym procesie fermentacyjnym.

Z punktu widzenia biochemii molekularnej wyjaśnienie beztlenowego rozkładu fenoli w procesie fermentacji metanowej wymaga określenia wpływu podstawników i budowy chemicznej na przydatność fermentacyjną. Próbę podjętą w tym kierunku ilu-

struje rysunek 11. Należy jednak stwierdzić, że wyniki badań nad zdolnością beztlenowego rozkładu fenoli i związków pokrewnych nie pozwalają jeszcze na wyprowadzenie ogólnej tezy, która wyjaśniłaby zależność zdolności fermentacyjnej od chemicznej budowy tych związków. Zagadnienie to wymaga bardziej wielostronnych badań dla których niniejsza praca może stanowić punkt wyjściowy.

Również mechanizm beztlenowego metabolizmu fenoli i związków pokrewnych przez drobnoustroje nie jest dotychczas wyjaśniony. Z przeprowadzonych doświadczeń wynika, że jest to jednak mechanizm zupełnie różny od tlenowych szlaków przemian związków aromatycznych [6, 7]. Przeprowadzono badania nad zdolnością adaptacyjną fermentacji metanowej do rozkładu fenolu (rysunek 1) i pirokatechiny (rysunek 10). Beztlenowy rozkład fenolu, jak wspomniano, następował łatwo, natomiast pirokatechina nie ulegała fermentacji. Gdyby mechanizm beztlenowego rozkładu fenolu był podobny do mechanizmu tlenowej degradacji tego związku fermentacja metanowa powinna adaptować się zarówno do degradacji fenolu jak i pirokatechiny. Co więcej, środowisko rozkładające fenol powinno na podstawie zjawiska jednoczesnej adaptacji być przystosowane do degradacji pirokatechiny. Jest to pośredni produkt biologicznego utleniania fenolu. Pirokatechina jest ważnym metabolitem tlenowej przemiany związków aromatycznych [6, 7]. Nie udało się jednak wywołać fermentacji metanowej tego związku w procesie adaptacji (rysunek 10), zaś środowisko adaptowane do fenolu nie wykazywało jednoczesnej adaptacji do rozkładu pirokatechiny. Dowodzi to, że szlaki przemian fenolu i związków pokrewnych przebiegają odmiennie niż w warunkach tlenowego metabolizmu drobnoustrojowego. Obserwacje te potwierdzają wyniki badań CLARKa i FINA [4]. W przeprowadzanych przez nich doświadczeniach nad beztlenową degradacją kwasu benzoesowego w adaptowanej fermentacji metanowej również nie stwierdzono jednoczesnej adaptacji do pirokatechiny.

Wyniki przeprowadzonych badań pozwalają przypuszczać, że adaptowana fermentacja metanowa mogłaby służyć jako metoda biochemicznego oczyszczania wód fenolowych. Jednak należałoby przeprowadzić badania, w których czyste związki fenolowe byłyby zastąpione przez wody fenolowe zawierające fenol i jego homologi. Należy jednak spodziewać się, że fermentację metanową tych wód różnego pochodzenia mogą hamować inne, niefenolowe związki toksyczne, które towarzyszą fenolom w wodach poprodukcyjnych.

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

Badano możliwość przystosowania fermentacji metanowej do beztlenowej degradacji fenoli jednowodorotlenowych, polifenoli, naftoli i pokrewnych związków aromatycznych jako podstawowych substratów fermentacyjnych. Wyniki badań potwierdzają przewidywania wynikające z prac poprzednich, że fermentację metanową można przystosować do rozkładu różnych fenoli przez zabiegi adaptacyjne. Stwierdzono, że liczne związki fenolowe ulegają beztlenowemu rozkładowi w procesie adaptowanej fermentacji metanowej.

W grupie lotnych fenoli jednowodorotlenowych całkowitej przemianie w gaz fermentacyjny ulegał fenol i p-krezol. Spomiędzy trzech izomerów fenoli dwuwodorotlenowych fermentacji podlegała jedynie rezorcyna. Fermentowały oba badane izomery fenoli trójwodorotlenowych: pirogallol i floroglucyna. Beztlenowemu rozkładowi ulegał również kwas benzoesowy oraz wszystkie izomery jednowodorotlenowych kwasów benzoesowych; kwas orto-hydroksybenzoesowy (salicylowy), kwas meta- i para-hydroksybenzoesowy. Wytwarzanie gazu fermentacyjnego z tych substratów było bliskie wartościom stechimetrycznym i wynosiło około 95% teoretycznej ilości gazu.

Całkowitą odporność na działanie środowiska fermentacyjnego wykazywał wśród fenoli jednowodorotlenowych orto- i meta-krezol oraz wszystkie badane ksylenole. Nie fermentowały również fenole dwuwodorotlenowe: pirokatechina i hydrochinon. Okazały się również niefermentujące oba naftole.

Wyniki badań nad zdolnością beztlenowego rozkładu niektórych fenoli i związków pokrewnych nie pozwalają jeszcze na wyprowadzenie ogólnej tezy, która by wyjaśniła zależność zdolności fermentacyjnej związków od ich budowy chemicznej oraz roli podstawników. Niniejsza praca może jednak stanowić punkt wyjściowy dla szerszych badań w tym kierunku. Obserwacje ujawniły jednak cechy odróżniające mechanizm beztlenowej degradacji fenoli od tlenowych szlaków metabolicznych przemian tych samych związków.

Przeprowadzone badania pozwalają przewidywać, że fermentacja metanowa mogłaby służyć jako metoda biochemicznego oczyszczania wód fenolowych, po należytym wpracowaniu i adaptacji. Należy jednak przeprowadzić badania, w których czyste związki fenolowe będą zastąpione przez wody fenolowe zawierające fenol i jego homologi. Wydaje się jednak, że na fermentację metanową tych wód różnego pochodzenia mogą działać upośledzająco inne, niefenolowe związki toksyczne, które towarzyszą fenolom w wodach poprodukcyjnych.

Politechnika Śląska
Katedra Technologii Wody i Ścieków

LITERATURA

[1] CHMIELOWSKI J., GROSSMAN A. i WĘGRZYNOWSKA I.: "Rozkład fenolu w fermentacji metanowej" - Zeszyty Naukowe Politechniki Śląskiej - Inżynieria Sanitarna 6, 31, (1964).

[2] CHMIELOWSKI J. i GROSSMAN A.: "Degradation du phénol et des substances phénoliques par la fermentation méthanique" - XXXV Międzynarodowy Kongres Chemii Przemysłowej, Warszawa, 1964 - Chemie et Industrie 92, (z. 3 bis), 145, (1964).

[3] BARKER H.A.: "Biological Formation of Methane" - Ind. Eng. Chem. 48, 1438, (1956).

[4] CLARK F.M. i FINA L.R.: "The Anaerobic Decomposition of Benzoic Acid During Methane Fermentation" - Arch.Biochem. 23, 26, (1951).

[5] FINA L.R. i FISKIN A.M.: "The Anaerobic Decomposition of Benzoic Acid During Methane Fermentation. II. Fate of Carbons One and Seven" - Arch. Biochem. Biophys. 91, 163, (1963).

[6] EVANS W.C.: "The Microbiological Degradation of Aromatic Compounds" - J. Gen. Microbiol. 32, 177, (1963).

[7] ROGOFF M.H.: "Oxidation of Aromatic Compounds by Bacteria" w "Advances in Applied Microbiology" - t.III, Acad. Press, New York (1961).

[8] CHMIELOWSKI J., SIMPSON J.R. i ISAAC P.C.G.: "Use of Gas Chromatography in Sludge Digestion" - Sew. Ind. Wastes 31 1237, (1959).

[9] CHMIELOWSKI J.: "Kinetyka i mechanizm fermentacji metanowej" - Zeszyty Naukowe Politechniki Śląskiej - Chemia Nr 17, Gliwice (1963).

[10] ŁURIE J.J. i RYBNIKOWA A.I.: "Chimiczeskij analiz proizwodstwiennych stocznych wod" - Goschimizdat, Moskwa (1963)

[11] STANDARD METHODS for the Examination of Water, Sewage and Industrial Wastes, wyd. 10, Amer. Publ. Health Assn., New York (1955).

[12] BUSWELL A.M. i HATFIELD W.D.: "Anaerobic Fermentations" - Illinois State Water Survey, Bull. No 32, (1939).

[13] BUSWELL A.M.: "Fermentations in Waste Treatments" w "Industrial Fermentations", t.II, Chemical Pub., New York (1954).

[14] TARVIN D. i BUSWELL A.M.: "The Methane Fermentation of Organic Acids and Carbohydrates" - J.Amer. Chem. Soc. 56, 1751, (1934).

БИОХИМИЧЕСКОЕ РАЗЛОЖЕНИЕ НЕКОТОРЫХ ФЕНОЛОВ В МЕТАНОВОМ БРОЖЕНИИ

Р е з ю м е

Исследовалась возможность применения метанового брожения для анаэробной деградации одноатомных и многоатомных фенолов, нафтолов и похожих ароматических соединений в качестве главных субстратов брожения. Результаты исследований подтверждают предположения, следующие из предыдущих работ, что метановое брожение можно применить для разложения различных фенолов путем адаптации. Констатировано, что многие фенольные соединения подвергаются анаэробному разложению в процессе адаптированного метанового брожения.

В группе одноатомных летучих фенолов полному превращению в газ брожения подвергался фенол и п-крезол. Среди трех изомеров двуатомных фенолов брожению подвергался только резорцин. Податливыми брожению были исследуемые изомеры трехатомных фенолов: пирогаллол и флороглюцин. Анаэробному разложению подвергалась также бензойная кислота, а также все изомеры одноатомных бензойных кислот: орто-оксибензойная кислота (салицилвия), мета- и пара-оксибензойная кислоты. Образование газа из этих субстратов было близко стехиометрическим значениям и составляло около 95% теоретического количества газа.

Полное сопротивление действию среды анаэробного брожения проявляли среди одноатомных фенолов орто- и мета-крезол а также все исследуемые ксиленолы. Брожению не подвергались также двуатомные фенолы: пирокатехин и гидрохинон. Не подвергающимися брожению оказались также оба нафтолы.

Результаты исследований по способности анаэробного разложения фенолов и некоторых сходных ароматических соединений не позволяют ещё вывести общий тезиц, который выяснял бы зависимость способности брожения соединений от их химической структуры, а также роли заместителей. Настоящий труд может быть, однако, исходным положением для обширных исследований в этом направлении. Наблюдения показали, однако, качества, отличающие механизм анаэробной деградации фенолов от аэробного пути метаболических превращений этих же соединений.

Проведенные исследования позволяют учитывать, что метановое брожение могло бы послужить методом биохимической очистки фенольных сточных вод, после надлежащей разработки и адаптации. Следует произвести исследования, в которых чистые фенольные соединения будут заменены фенольными сточными водами, содержащими фенол и его гомологические соединения. Кажется, однако, что на метановое брожение этих вод различного происхождения могут вредительно действовать другие, нефенольные токсические соединения, которые сопутствуют фенолам в промышленных сточных водах.

Силезский Политехнический Институт

Кафедра Технологии Воды и Сточных Вод

BIOCHEMICAL DEGRADATION OF SOME PHENOLS DURING THE METHANE FERMENTATION

S u m m a r y

The investigations were undertaken in an effort to observe the behaviour of monohydric and polyhydric phenols, naphtols and related aromatic compounds during the anaerobic methane fermentation. These studies were carried out in batch conditions, where those phenolic compounds were the only organic substrate fed to the fermentation environment. The results obtained confirm the supposition given by previous research that the methane fermentation can be adapted to the degradation of various phenols.

In the group of the volatile monohydric phenolic compounds phenol and p-cresol were fully converted to fermentation gas. Of the three isomers of dihydroxybenzenes only resorcinol was fermented. Both isomers of trihydric phenols under investigation: pyrogallol and phloroglucinol were decomposed during this fermentation. The benzoic acid as well as all isomers of monohydric benzoic acids: ortho-hydroxybenzoic (salicylic) acid, metha- and para-hydroxybenzoic acids were also fermented. The gas production from these substrates were near to the stoichiometric values and amounted 95% of the theoretical yield of fermentation gas.

Attemps to adapt methane fermentation to the decomposition of few other phenols: ortho- and metha-cresols, xylenols, catechol, hydroquinon and naphtols were unsuccesful under the condition used.

The results of the performed studies on the anaerobic degradation of phenols and related compounds do not permit to solve the peculiar dependence of their behaviour and the chemical structure as well as the role of substituents. These observations, however, could serve as a basis to more extensive investigations. They suggest that the anaerobic pathway of the degradation of the ring structure in aromatic compounds may differ from the aerobic metabolic pathway.

The results obtained from this research demonstrate that methane fermentation could be useful to the biochemical purification of phenolic waste waters in the anaerobic conditions after a suitable adaptation. Investigation could be performed, however, with replacement of the pure phenolic compounds by phenolic waste waters. It seems probable that other non-phenolic toxic compounds, associated with phenols in industrial waste waters, could have an injurious effect on the methane fermentation.

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