

JERZY CHMIEŁOWSKI, WOJCIECH WASILEWSKI

BADANIA NAD DYNAMIKĄ BEZTLENOWEGO ROZKŁADU
KILKU FENOLI W FERMENTACJI METANOWEJ

Dotychczas podejmowane prace biochemiczne nad fermentacją metanową fenoli [1, 2, 3] lub pokrewnych związków aromatycznych [4, 5] nie wyjaśniły mechanizmu beztlenowej degradacji struktury aromatycznej. Badania CHMIEŁOWSKIEGO, GROSSMANA i ŁABUŹEK [3] dowiodły, że jest to jednak mechanizm zupełnie różny od tlenowych szlaków przemian związków aromatycznych [6, 7, 8]. Szczególnie zaskakujący był brak zdolności adaptacyjnego fermentowania pirokatechiny [3], która ulega łatwo rozkładowi przez drobnoustroje w warunkach tlenowych. Jest ona bowiem powszechnym produktem pośrednim w tlenowej degradacji fenoli i innych związków aromatycznych [6, 7, 8]. Gdyby mechanizm beztlenowego rozkładu fenolu był zbliżony do szlaków tlenowej degradacji tego związku - drobnoustroje fermentacji metanowej powinny adaptować się równie łatwo do rozkładu fenolu jak i pirokatechiny. Co więcej, środowisko rozkładające fenol powinno na podstawie zjawiska jednoczesnej adaptacji być przystosowane zarówno do degradacji fenolu jak i pirokatechiny. Nie udało się jednak wywołać fermentacji pirokatechiny. Również obserwacje CLARKA i FINA [4] oraz FINA i FISKINA [5] wykazały, że środowisko przystosowane do beztlenowego rozkładu kwasu benzoowego nie fermentowało pirokatechiny.

Omówione obserwacje świadczą o istotnej różnicy w mechanizmie tlenowego i beztlenowego rozkładu związków fenolowych. Możliwość zastosowania fermentacji metanowej związków fenolowych dla celów praktycznych w technologii i inżynierii sanitarnej wymagają jednak znajomości tego mechanizmu. Podjęto więc próby zbadania dynamiki beztlenowego rozkładu kilku fenoli fermentujących. Wydawało się, że takie obserwacje mogą w przyszłości ułatwić ustalenie mechanizmu adaptowanej fermentacji metanowej fenoli.

Jedną z głównych przeszkód w podjęciu tych badań był brak należytych metod doświadczalnych. Wydawało się więc potrzebne opracowanie lub przystosowanie niektórych metod chromatografii cienkowsarstwowej [9, 10] do śledzenia zmian, którym podlegają substraty fenolowe. Można było również przewidywać, że porównanie przebiegu zmian chemicznego zapotrzebowania tlenu (CZT) z dynamiką zmian stężenia substratu fenolowego i wytwarzania gazu w czasie fermentacji - może ułatwić przybliżone rozeznanie grupy związków, do jakiej należą produkty pośrednie beztlenowego rozkładu aromatycznej struktury fenoli.

Jako substraty do niniejszych badań wybrano fenol, p-krezol i rezorcynę. Fenol i p-krezol reprezentowały fermentujące fenole jednowodorotlenowe o różnej ilości atomów węgla w drobinie. Fenol i rezorcyna umożliwiały porównanie przebiegu degradacji jedno i dwuhydroksylowych pochodnych benzenu.

C z ę ś ć d o ś w i a d c z a l n a

Metodyka badań

Badano dynamikę beztlenowego rozkładu fenolu, p-krezolu i rezorcyny w adaptowanej fermentacji metanowej. W czasie tej fermentacji w warunkach periodycznych obserwacjom poddano zmiany stężenia substratu fenolowego, wytwarzania gazu fermentacyjnego, stężenia kwasów lotnych oraz CZT, alkaliczności i pH.

Komory fermentacyjne

Doświadczenia prowadzono w szczelnie zamkniętych butlach szklanych z tubusem dolnym. Laboratoryjne komory fermentacyjne znajdowały się w termostacie o temperaturze $32 \pm 1^\circ\text{C}$, optymalnej dla mezofilnej fermentacji metanowej. Jako zamknięcia komór używano zaworów zaopatrzonych w membrany z mięsistej gumy. Zawory te umożliwiały manometryczny pomiar ciśnienia wytwarzanego gazu. Pozwalały również na wprowadzanie do komór odmierzonych ilości roztworów substratów za pomocą strzykawki zakończonej igłą iniekcijną.

Tubusy dolne zaopatrzone w rurki gumowe i ściskacze pozwalały na pobór prób do analizy. Proby te pobierano przy małym nadciśnieniu gazu w komorze fermentacyjnej.

Oznaczanie fenoli i chromatografia cienkowarstwowa fenoli

W badaniach fermentacyjnego rozkładu poszczególnych substratów prowadzono kontrolę analityczną fenolowego związku dozowanego i pozostałego w środowisku fermentacyjnym.

Fenol oznaczano bezpośrednio z środowiska fermentacyjnego metodą kolorymetryczną z p-nitroaniliną [11] oraz umowną metodą bromometryczną [11]. W reakcji z zdwuazowaną p-nitroaniliną p-krezol wykazuje dużą bierność. Oznaczano więc p-krezol umownie metodą bromometryczną [11], zaś rezorcynę oznaczano metodą kolorymetryczną z p-nitroaniliną [11].

W przypadku substratu mieszanego (rezorcyna + p-krezol) fenole ogólne oznaczano umownie metodą bromometryczną, rezorcynę kolorymetrycznie z p-nitroaniliną, zaś p-krezol określano w sposób przybliżony z różnicy tych oznaczeń.

W celu analitycznej identyfikacji poszczególnych fenoli jedno i wielowodorotlenowych w środowisku fermentacyjnym posłużono się metodą chromatografii cienkowarstwowej. Opracowano metodę umożliwiającą rozdzielenie grupy fenoli jednowodorotlenowych od poszczególnych fenoli wielowodorotlenowych. Rozdział taki uzyskano w warstwach Kieselgel G przez rozmycie mieszaniną benzenu i octanu etylu (4:1).

Opracowana metoda chromatografii cienkowarstwowej okazała się prostsza od znanych metod rozdziału fenoli [9, 10]. Była ona szczególnie użyteczna dla celów przeprowadzonych badań. Umożliwiała należyty rozdział p-krezolu od rezorcyny w badaniu fermentacji substratu mieszanego. Pozwoliła też na przeprowadzenie obserwacji, które wykluczyły pojawianie się pirokatechiny jako produktu pośredniego z beztlenowym rozkładzie fenoli jednowodorotlenowych.

Płytki do chromatografii cienkowarstwowej przygotowywano przez sporządzenie pasty z 1,1 g Kieselgel G (Merck) i 3,3 ml wody destylowanej. Pastę rozprowadzano równomiernie na całej powierzchni płytki szklanej o wymiarach 8,5x15cm, którą umieszczano na poziomej płaszczyźnie celem wysuszenia. Po wyschnięciu warstwy na powietrzu, płytkę suszono przez 1 godz. w suszarce o temperaturze 105°C. Gips zawar-

ty w preparacie Kieselgel G powodował tworzenie się dobrze przylegającej warstwy żelu na płytce szklanej.

Analizowane próby środowiska fermentacyjnego w ilości 5 do 10 μ l наносzono bezpośrednio na płytki chromatograficzne. Chromatogramy rozwijano metodą wstępującą mieszaniną benzenu i octanu etylu (4:1) w szczelnie zamkniętych komorach, wyłożonych bibułą filtracyjną zanurzoną w rozpuszczalniku rozmywającym. Chromatogramy wysuszone na powietrzu wywoływano przez spryskiwanie roztworem 0,1 g z dwuazowanego kwasu sulfanilowego w 20 ml 10% roztworu sody [9]. Identyfikację poszczególnych fenoli prowadzono na podstawie położenia plamy na chromatogramie w porównaniu z substancjami wzorcowymi.

W kilku przypadkach w celu rozdzielania fenoli jednowodorotlenowych użyto techniki cienkowarstwowej chromatografii dwukierunkowej opracowanej przez CRUMPA [10] dla identyfikacji fenoli występujących w produktach naftowych. Fenole jednowodorotlenowe rozdzielano w postaci barwników azowych. W tym celu fenole zawarte w próbce sprzęgano z zdwuazowaną p-nitroaniliną w środowisku alkalicznym. Tak przygotowany roztwór наносzono w ilości 5 μ l na płytkę pokrytą warstwą Kieselgel G наносzonej w postaci pasty z 0,5 n wodnym roztworem NaOH. W celu dwukierunkowego rozmycia chromatogramu stosowano dwa układy rozpuszczalników: chloroform z acetonem (9:1) oraz benzen z monoetyloaminą (4:1). Identyfikację związków fenolowych prowadzono na podstawie położenia plamy na chromatogramie i charakterystycznego zabarwienia [10]. Intensyfikację barwy plam związków fenolowych uzyskiwano przez działanie gazowego amoniaku na płytki chromatograficzne wysuszone na powietrzu.

Pomiary wytwarzania gazu fermentacyjnego

Ogólną ilość wytwarzanego gazu w fermentacji metanowej wyznaczano przez manometryczny pomiar ciśnienia w komorze fermentacyjnej za pomocą manometru rtęciowego metodą opracowaną przez CHMIEŁOWSKIEGO [12, 13] w pracach wcześniejszych. Wytwarzanie gazu fermentacyjnego przeliczano na 1 liter masy fermentującej w komorze doświadczalnej. W warunkach periodycznych przeprowadzanych badań pobór prób zwiększał objętość gazową w komorach. W celu uniknięcia

błędów konieczne było dla poszczególnych pomiarów korygowanie wartości stałej C komory w obliczeniach wytwarzania gazu [12, 13].

Konwencjonalne oznaczenia analityczne środowiska fermentacyjnego

Charakterystykę analityczną fermentujących środowisk oparto na oznaczeniach stężenia kwasów lotnych i alkaliczności, które przeprowadzano według STANDARD METHODS [14]; pH badano potencjometrycznie przy pomocy elektrody szklanej, zaś CZT oznaczano metodą skróconą [15].

Skrócone oznaczenie CZT polegało na wprowadzaniu do 10 ml próbki odsączonej przez ultrafiltr membranowy - małej ilości siarczanu srebra w celu związania chlorków. Wprowadzano następnie 5 ml roztworu 0,25 n $K_2Cr_2O_7$ i 15 ml stężonego kwasu siarkowego. Powodowało to silne zagrzanie się próby. Po 5 minutach dodawano 15 ml wody destylowanej zaś po ostygnięciu próbki wprowadzano 2 krople ferroiny jako wskaźnika i miareczkowano 0,25 n roztworem soli Mohra. Równolegle przeprowadzano "ślepią próbę" z wodą destylowaną zamiast badanego przesączu. Wynik analizy przeliczano na mg tlenu zużytego na chemiczne zapotrzebowanie tlenu (CZT) przez litr badanego środowiska.

Przebieg doświadczeń

Adaptacja fermentacji metanowej do beztlenowej degradacji fenolu, p-krezolu i rezorcyny

Przystosowanie środowiska technicznie przefermentowanego osadu biogenego do rozkładu fenoli prowadzono w laboratoryjnych komorach fermentacyjnych. Zawierały one w około 1/3 objętości masę zaszczipiającą fermentację metanową. Przed rozlaniem do komór osad fermentujący mieszano w stosunku 4:1 z surowym osadem biogenym i w celu ujednorodnienia cedzono przez sito o średnicy oczek około 3 mm. Dodatek osadu surowego stosowano w celu pobudzenia fermentacji w okresie adaptacji drobnoustrojów tego środowiska do rozkładu fenoli. Komory przepłukiwano gazowym technicznym

dwutlenkiem węgla celem uzyskania warunków beztlenowych wymaganych w procesach fermentacji metanowej.

Adaptacja środowiska opracowana w badaniach wcześniejszych [2, 3] polegała na wprowadzaniu do masy fermentującej rosnących dawek substratu fenolowego w ilości od 100 do 1000 mg/l w odstępach około 3-dniowych. W ten sposób adaptowano komory doświadczalne do rozkładu fenolu, p-krezolu i rezorcyny.

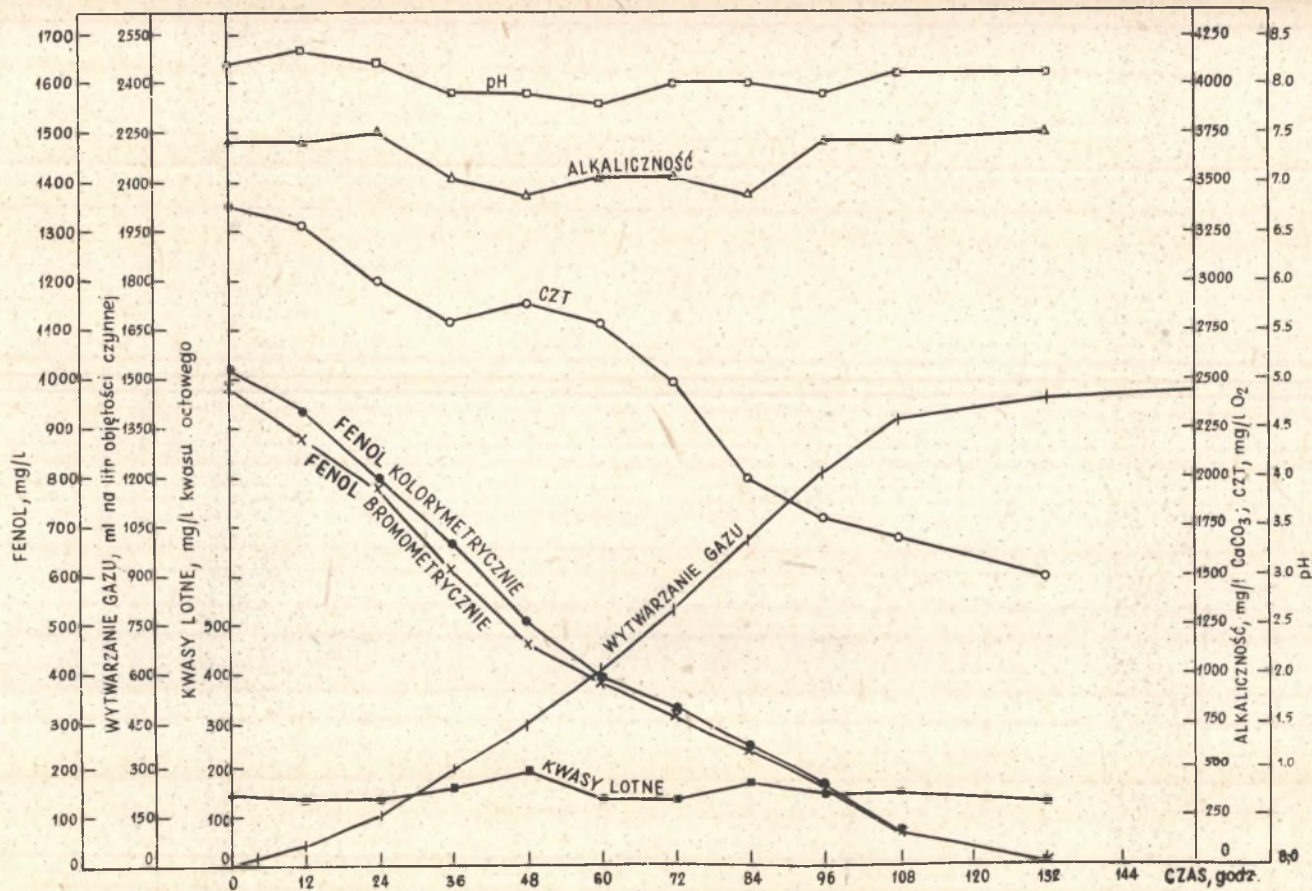
W adaptacji środowiska fermentacyjnego do rozkładu dwuskładnikowego substratu fenolowego: p-krezolu i rezorcyny zastosowano wstępną adaptację układu do degradacji rezorcyny w stężeniu 1000 mg/l. Wtórne przystosowanie do rozkładu p-krezolu nastąpiło przez wprowadzanie co kilka dni dawek 500 mg/l p-krezolu. Tak zaadaptowany osad przystosowano następnie do równoczesnego rozkładu rezorcyny i p-krezolu w porcjach po około 500 mg/l.

W celu kontroli przebiegu fermentacji w seriach adaptacyjnych prowadzono resztkową fermentację w komorach nieobciążonych substratem fenolowym.

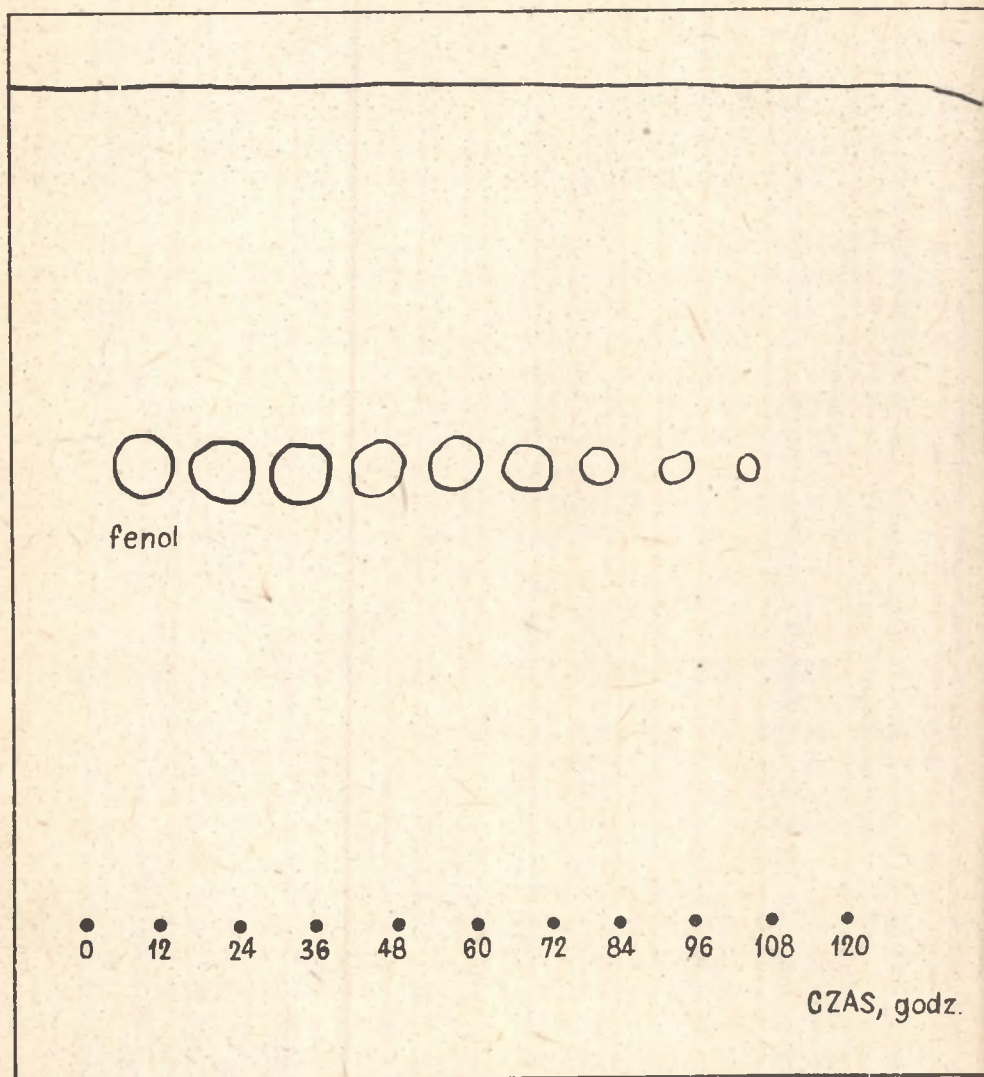
Beztlenowa degradacja fenolu w fermentacji metanowej

Śledzono przebieg fermentacji metanowej jednorazowo wprowadzonej dawki 1000 mg/l fenoli przez adaptowane środowisko fermentacyjne. W chwili rozpoczęcia doświadczenia pobierano przez tubus dolny 100 ml próbki w celu wykonania analizy wstępnej środowiska. Następnie wprowadzano dawkę 1000 mg/l fenolu i ponownie pobierano 100 ml masy fermentacyjnej do analizy (godzina 0 doświadczenia). W odstępach 12-godzinnych odprowadzano po 100 ml tej masy w celu wykonania oznaczeń analitycznych. Postępowanie takie powtarzano aż do zaniku gazowania. W tych samych odstępach czasu mierzono ciśnienie wytworzonego gazu. Ciśnienie to każdorazowo likwidowano po pomiarze.

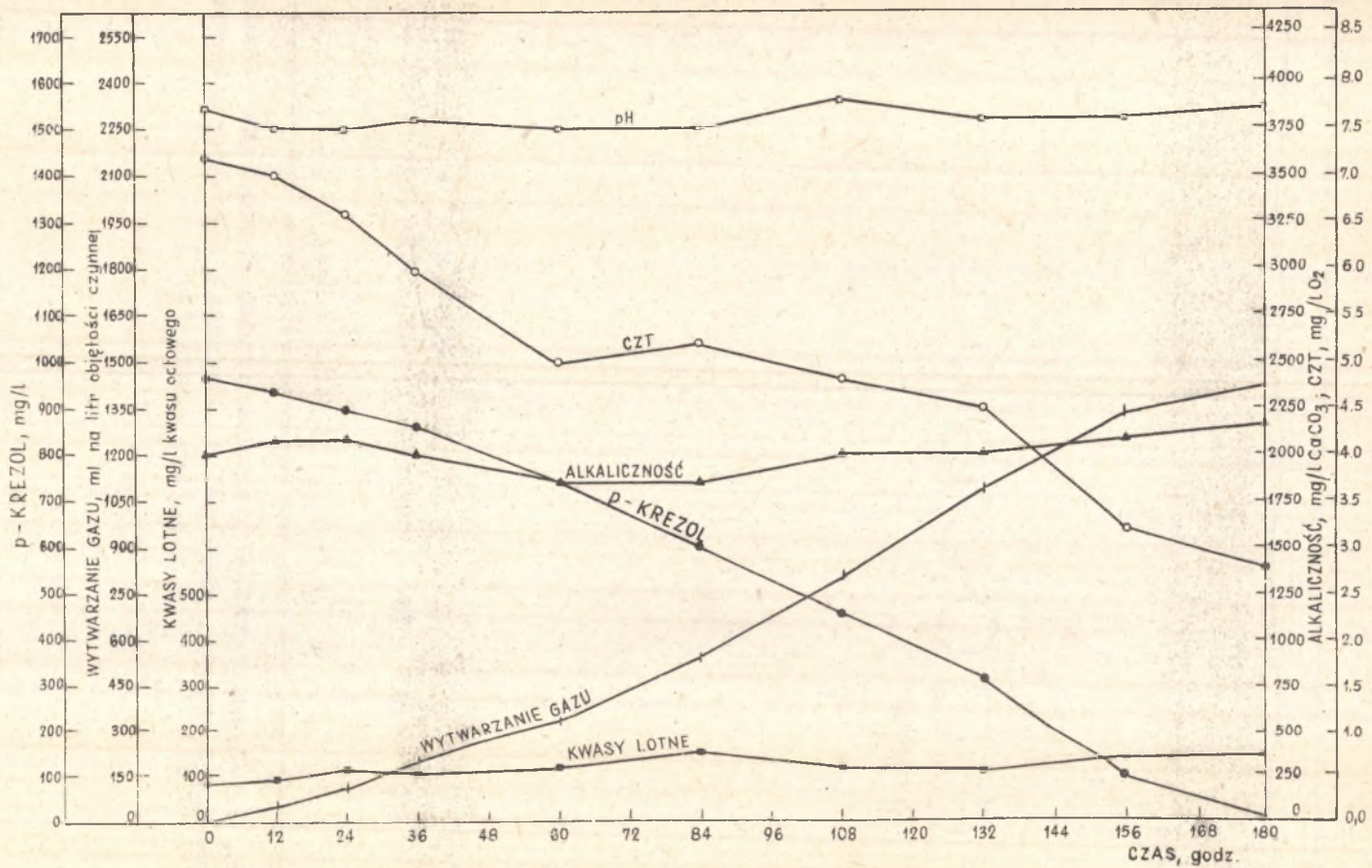
Dynamikę zmian zachodzących w środowisku fermentacyjnym w czasie degradacji wprowadzonej dawki fenolu określano na podstawie oznaczeń stężenia fenolu prowadzonych kolorymetrycznie i bromometrycznie, CZT, stężenia kwasów lotnych, alkaliczności, pH i wytwarzania gazu fermentacyjnego. Umowne oznaczenie fenoli metodą bromometryczną miało na celu wykazanie zmian "ogólnej liczby bromowej" środowiska w porównaniu z testem kolorymetrycznym.



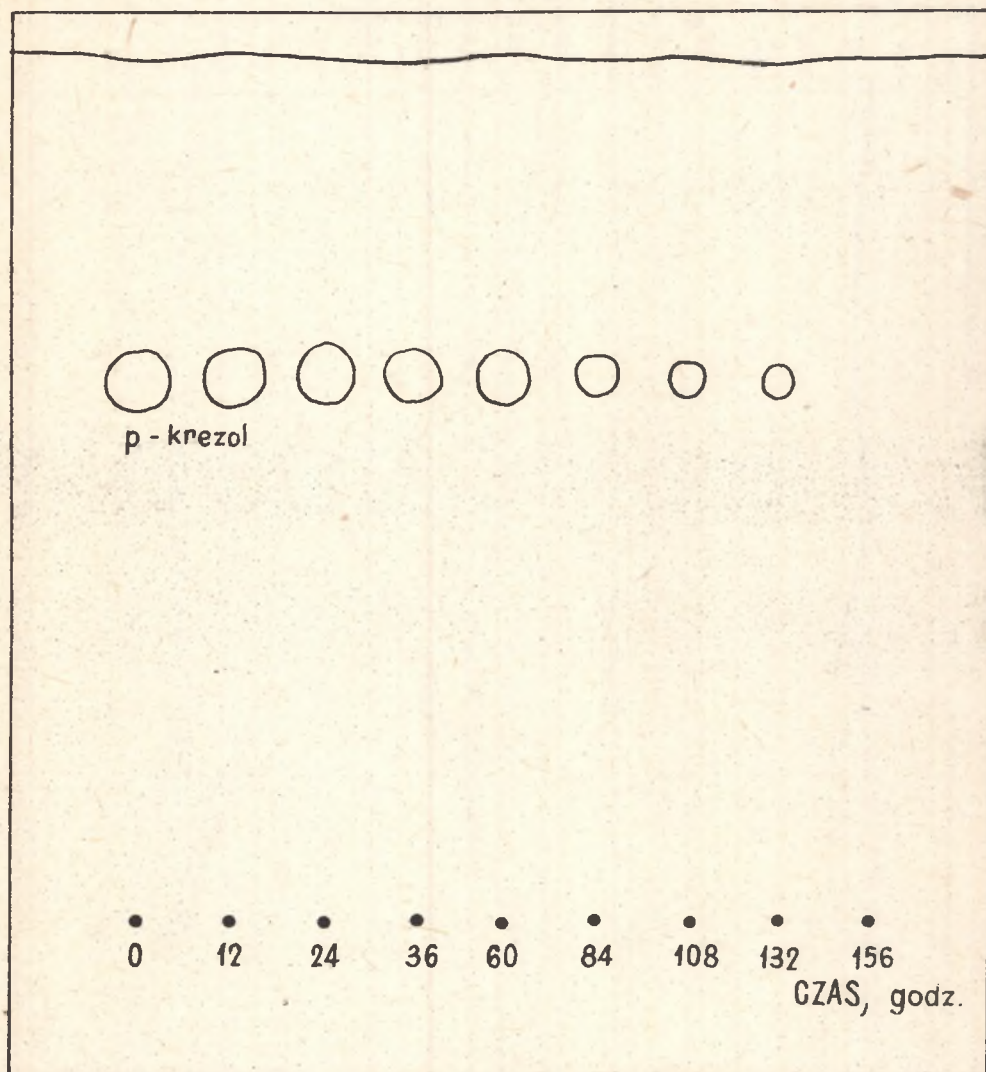
Rys. 1. Dynamika fermentacji metanowej fenolu w stężeniu 1000 mg/l



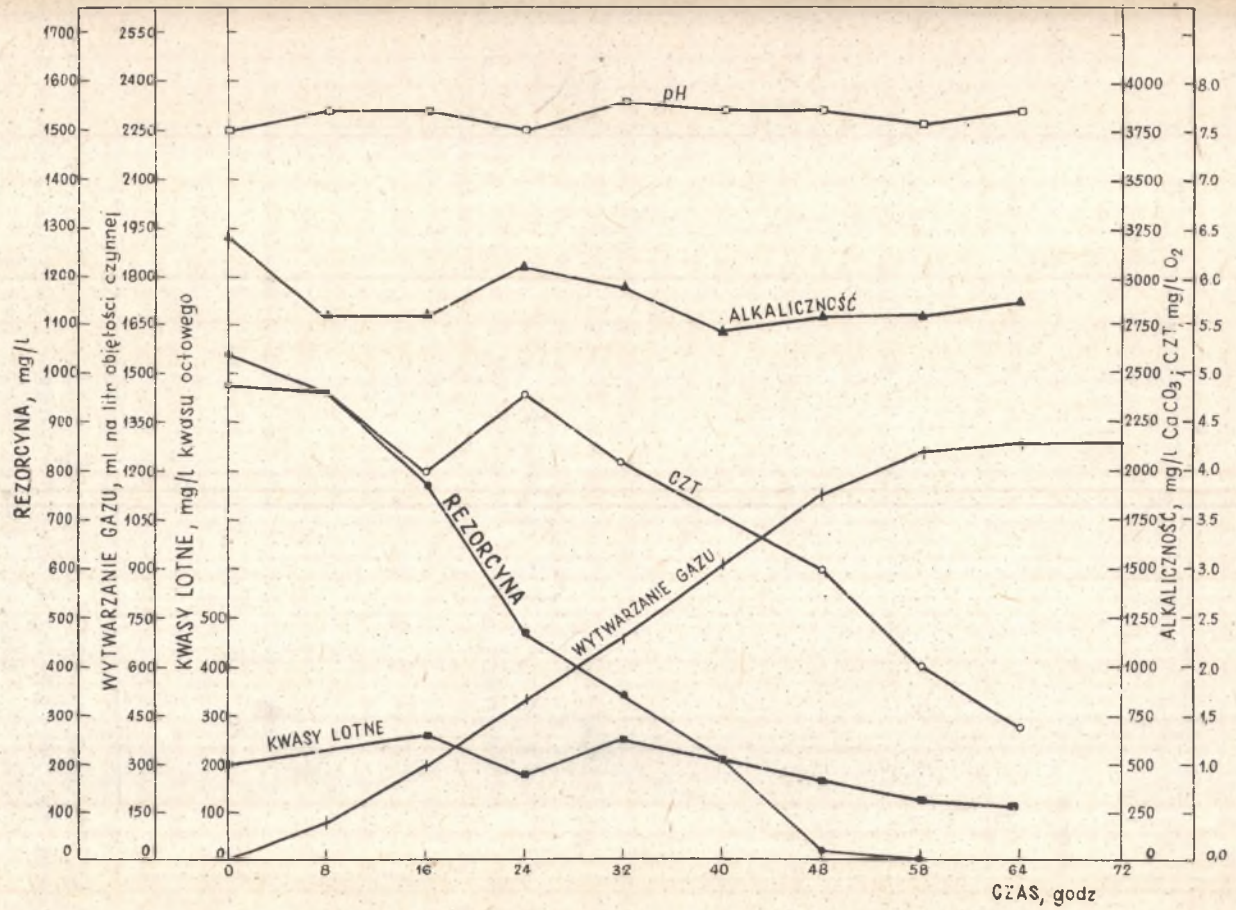
Rys. 2. Chromatografia cienkowarstwowa środowiska fermentującego fenol. Kieselgel G. Rozmycie mieszaniną benzenu i octanu etylu (4:1)



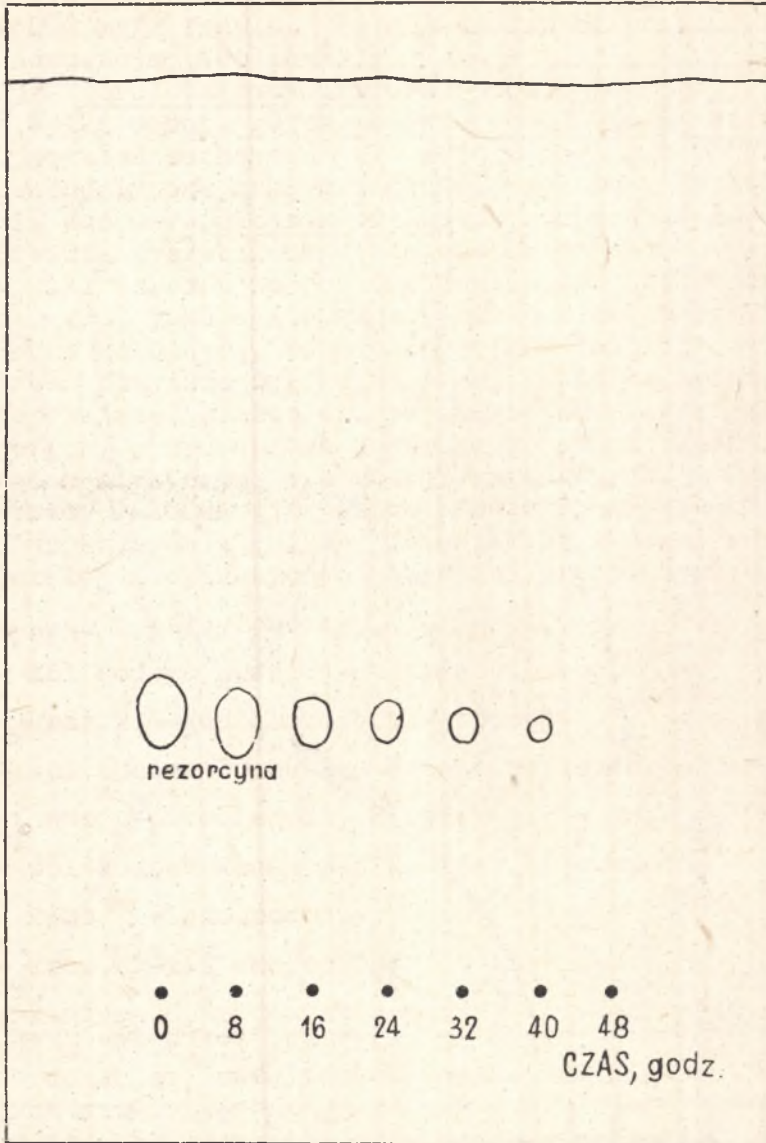
Rys. 3. Dynamika fermentacji metanowej p-krezolu w stężeniu 1000 mg/l



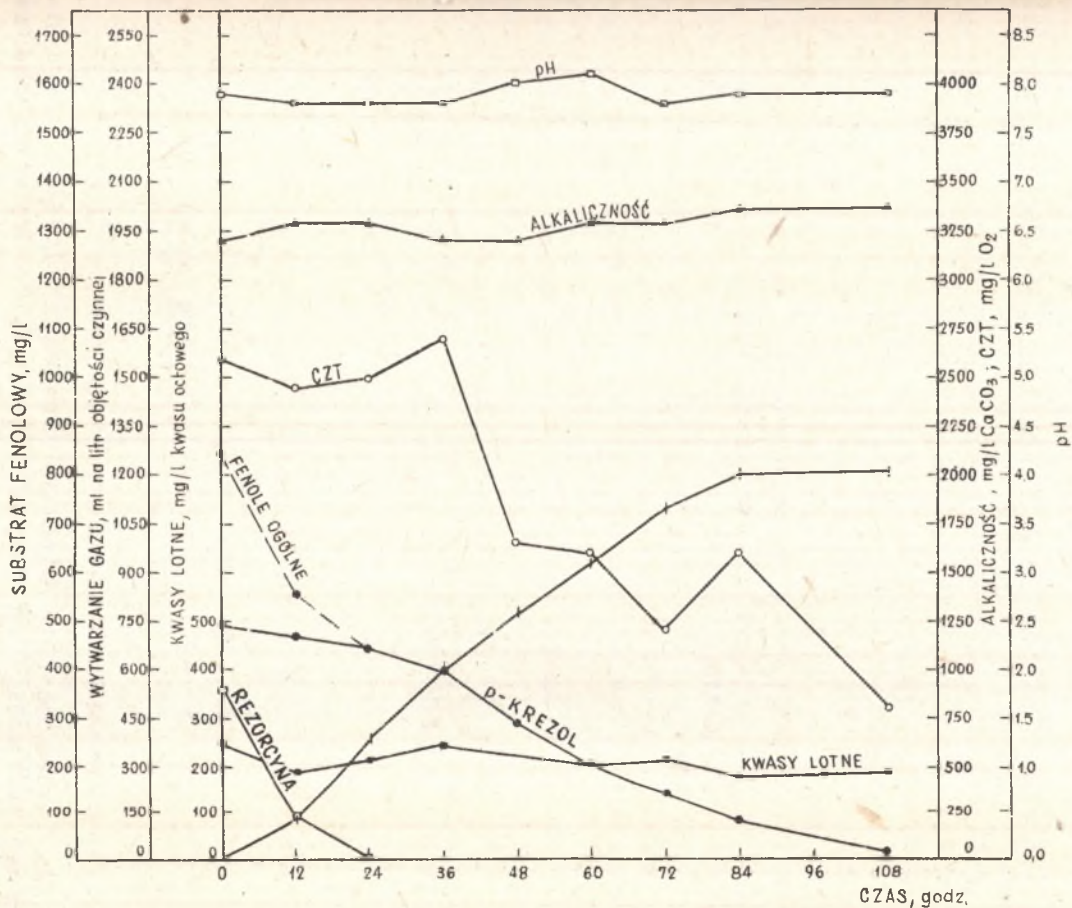
Rys. 4. Chromatografia cienkowarstwowa środowiska fermentującego p-krezol. Kieselgel G. Rozmycie mieszaniną benzenu i octanu etylu (4:1)



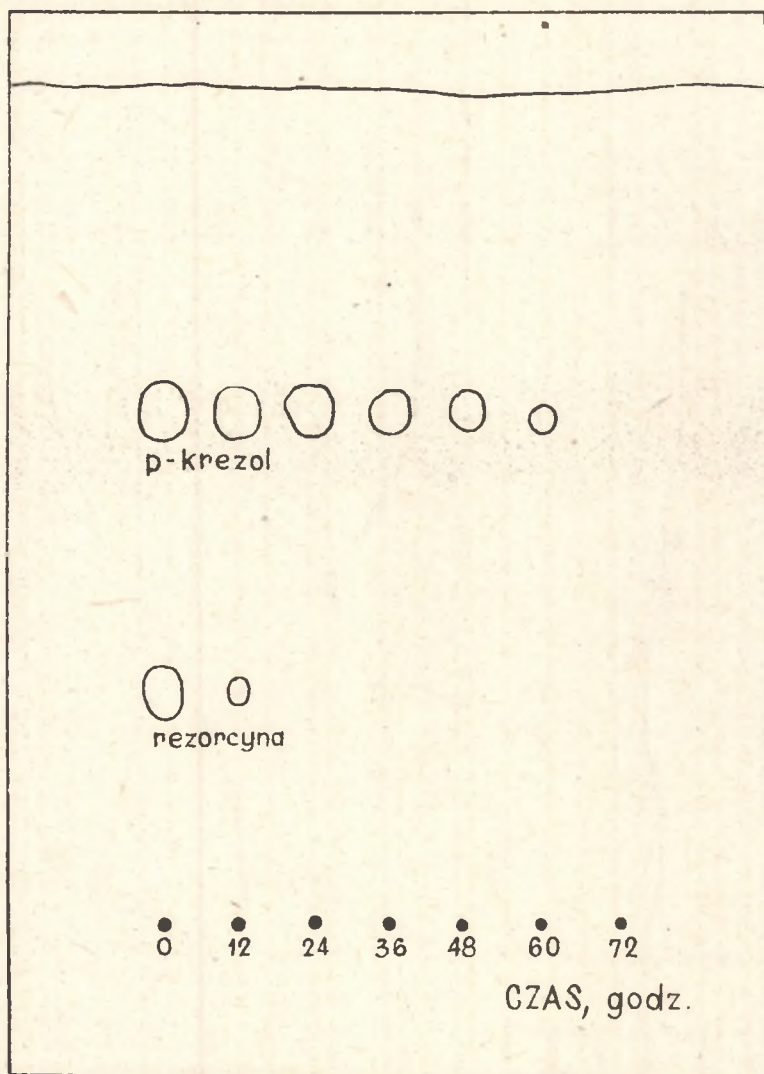
Rys. 5. Dynamika fermentacji metanowej rezorcyny w stężeniu 1000 mg/l



Rys. 6. Chromatografia cienkowarstwowa środowiska fermentującego rezorcyną. Kieselgel G. Rozmycie mieszaniną benzenu i octanu etylu (4:1)



7. Dynamika fermentacji metanowej p-krezolu i rezorcyny w stężeniu po około 500 mg/l



Rys. 8. Chromatografia cienkowarstwowa środowiska fermentującego p-krezol i rezorcynę. Kieselgel G. Rozmycie mieszaniną benzenu i octanu etylu (4:1)

Dynamikę fermentacji metanowej fenolu w jednej z komór doświadczalnych obrazuje Rys. 1. Przebieg zmian stężenia fenolu w czasie tej fermentacji wykazano również metodą chromatografii cienkowsarstwowej (rys. 2).

Beztlenowa degradacja p-krezolu w fermentacji metanowej

Obserwację przebiegu fermentacji p-krezolu w komorze zaadaptowanej do rozkładu p-krezolu rozpoczęto po odfermentowaniu ostatniej dawki w serii adaptacyjnej tego związku. Następnie pobrano 100 ml próbki do analizy wstępnej, po czym po wprowadzeniu p-krezolu w ilości 1000 mg/l ponownie pobrano próbę o objętości 100 ml (godzina 0 doświadczenia). Dalsze 100 ml próby pobierano w początkowym przebiegu procesu w odstępach 12 godzin zaś później, wskutek wolniejszej fermentacji, co 24 godziny aż do zaniku gazowania. Jednocześnie z poborem prób mierzono ciśnienie wytworzonego gazu i każdorazowo likwidowano je. Pobrane próby służyły do wykonywania oznaczeń p-krezolu bromometrycznie w sposób umowny, CZT, kwasów lotnych, alkaliczności i pH. W tej serii badań nie można było stosować kolorymetrycznego oznaczenia związku fenolowego, ponieważ p-krezol wykazuje bierność w reakcji p-nitroanilinowej.

Dynamikę beztlenowego rozkładu p-krezolu podaje rys.3. Chromatogram na rys. 4 obrazuje spadek stężenia p-krezolu w czasie tej fermentacji metanowej.

Beztlenowa degradacja rezorcyny w fermentacji metanowej

Przebieg fermentacji rezorcyny badano w komorach zaadaptowanych do rozkładu rezorcyny. Do tego środowiska wprowadzano dawkę 1000 mg/l substratu i pobierano 100 ml próby dla wykonania analizy wstępnej (godzina 0 doświadczenia). Dalsze próby pobierano co 8 godz. aż do zaniku fermentacji. W próbach tych oznaczano: rezorcynę kolorymetrycznie, CZT, kwasy lotne, alkaliczność i pH. Jednocześnie z poborem prób prowadzono pomiary wytwarzania gazu.

Dynamikę rozkładu rezorcyny w fermentacji metanowej podaje rys. 5. Chromatogram na rys. 6 obrazuje spadek stężenia rezorcyny w czasie tej fermentacji.

Beztlenowa degradacja dwuskładnikowego substratu fenolowego: rezorcyny i p-krezolu

Badano dynamikę beztlenowego rozkładu dwuskładnikowego substratu fenolowego: p-krezolu i rezorcyny - w fermentacji metanowej adaptowanej do degradacji poszczególnych fenoli. Do komory fermentacyjnej zaadaptowanej do rozkładu rezorcyny i p-krezolu wprowadzano po około 500 mg/l każdego z tych substratów i pobrano 100 ml próbki do analizy wstępnej (godzina 0 doświadczenia). Pobierano następnie kolejne 100 ml próby w odstępach co 12 godz. W tych odstępach czasu prowadzono również pomiary wytwarzanego gazu. W pobranych próbach środowiska fermentującego oznaczano fenole ogólne metodą bromometryczną zaś rezorcynę kolorymetrycznie; p-krezol określano umownie z różnicy oznaczeń fenoli ogólnych i rezorcyny.

Przebieg fermentacyjnego rozkładu obu substratów fenolowych (p-krezol + rezorcyna) podaje rys. 7. Spadek stężenia poszczególnych fenoli w czasie tej fermentacji wykazano chromatograficznie na rys. 8.

Obserwacje ogólne

W celu wykazania stopnia przemiany substratów fenolowych w gaz fermentacyjny w tabelicy I porównano całkowite ilości gazu uzyskane w przeprowadzonych badaniach z ilością stechiometryczną [16], która odpowiadała porcjom fermentowanych związków fenolowych.

W tabelicy II zestawiono teoretyczne wartości chemicznego zapotrzebowania tlenu (CZT) badanych fenoli i odpowiadających im cykloheksanoli. Zestawienie to wykazuje wzrost CZT wskutek uwodornienia struktury pierścieniowej związków.

O m ó w i e n i e w y n i k ó w

Przeprowadzone badania służyły do wstępnej obserwacji mechanizmu rozkładu związków fenolowych w fermentacji metanowej. Mieszane populacje bakteryjne tej fermentacji były wstępnie przystosowane do beztlenowego rozkładu poszczególnych fenoli.

Tablica I

Wytwarzanie gazu fermentacyjnego
w beztlenowym rozkładzie kilku związków fenolowych,
stwierdzone doświadczalnie i obliczone stechiometrycznie z równania BUSWELLA

Substrat fenolowy	Dawka substratu	Symbol komory	Ilość gazu fermentacyjnego		
			stechiome- tryczna mg/l	doświad- czalna ml/l	% ilości stechio- metrycznej
fenol	1045	I	1495	1481	99,1
	1020	II	1460	1452	99,0
p-krezol	965	III	1400	1432	102,3
rezorcyna	1037	IV	1268	1300	102,5
	1028	V	1258	1269	101,0
p-krezol + rezorcyna	487 358	VI	1144	1211	105,8

Tablica II

Teoretyczne chemiczne zapotrzebowanie tlenu (CZT) kilku fenoli
i odpowiednich cykloheksanoli

Substrat	Teoretyczne molowe CZT g O ₂	Teoretyczne CZT 1000 mg substratu przed i po uwo- dornieniu mg O ₂	Przyrost teoretycznego CZT %
fenol cykloheksanol	224 272	2383 2894	21,4
p-krezol metylocykloheksanol	272 320	2519 2963	17,7
rezorcyna cykloheksanol	208 256	1891 2338	23,6

Bardzo niewiele wie się o przebiegu beztlenowej degradacji fenoli. Prace STANIERA [6], EVANSA [7], ROGOFFA [8] i innych wyjaśniły szlaki drobnoustrojowego rozkładu związków aromatycznych w warunkach tlenowych. Przez izolację metabolitów pośrednich tych przemian [7] lub procesy jednoczesnej adaptacji [6] wykazali oni, że pirokatechina jest głównym produktem przejściowym, wspólnym dla większości związków aromatycznych. Okazało się jednak, że pirokatechina nie stanowi związku pośredniego w beztlenowym rozkładzie fenoli. Wykazały to badania CHMIEŁOWSKIEGO, GROSSMANA i LABUŹEK [3], w których nie udało się wywołać fermentacji pirokatechiny. Również obserwacje CLARCKA i FINA [4] wykazały, że pirokatechina nie podlega fermentacji w środowisku przystosowanym do beztlenowego rozkładu kwasu benzoowego. Nie stwierdzono w tych badaniach zjawiska jednoczesnej adaptacji do pirokatechiny. Obserwacje te wyłączają pirokatechinę z możliwych związków pośrednich beztlenowej degradacji fenoli. Wyniki badań FINA i FISKINA [5] nad fermentacją metanową kwasu benzoowego sugerują, że beztlenowa degradacja tego związku aromatycznego przebiega przez wstępne nasycenie pierścienia, po czym następuje jego rozerwanie pomiędzy węglem C_1 i C_2 z uwolnieniem propionianu. Innych kwasów nie udało się izolować z środowiska tej fermentacji.

Jednym z zadań niniejszej pracy było wstępne zorientowanie się w charakterze związków pośrednich, które tworzą się wskutek beztlenowej degradacji aromatycznej struktury fenoli. Obserwacje chromatograficzne rozkładu fenoli i p-krezolu oraz rezorcyny (rys. 2, 4, 6) w fermentacji metanowej przeprowadzone w trakcie badań wykazały, że w procesie tym nie pojawiają się związki pośrednie o charakterze fenoli. Chromatograficznie nie wykryto takich związków obok pojedynczego substratu fenolowego wprowadzanego do środowiska fermentacji.

Opierając się na analogii z tlenową degradacją fenoli można było spodziewać się powstawania pośrednich produktów rozkładu o charakterze związków nienasyconych [7, 8]. Starano się je wykryć przez oznaczenie "ogólnej liczby bromowej" środowiska, wyrażonej umownie w mg/l fenolu i porównanie tego stężenia fenolu z oznaczonym kolorymetrycznie (rys. 1). Przebieg zmian stężenia fenolu wykreślony na podstawie obu tych oznaczeń w czasie beztlenowego rozkładu fenolu był analogiczny. Może to świadczyć o niepojawianiu

się w środowisku fermentującym fenol - nowych, nienasyconych związków pośrednich. W przeciwnym wypadku krzywa spadku "ogólnej liczby bromowej" roztworu nie pokrywałaby się z przebiegiem spadku stężenia fenolu oznaczonym kolorymetrycznie i miałyby prawdopodobnie inny charakter.

Szczególnie ciekawe dla określenia mechanizmu degradacji związków fenolowych w fermentacji metanowej okazało się wyznaczenie krzywej przebiegu CZT w porównaniu z krzywą spadku stężenia rozkładanego substratu fenolowego i przebiegiem wytwarzania gazu (rys. 1, 3, 5, 7). Rysunki te ilustrują zaskakujące zjawisko. Rozkładowi około połowy wprowadzonego substratu, niezależnie od rodzaju fermentującego związku fenolowego, towarzyszyło widoczne zahamowanie spadku lub nawet wzrost CZT. Należy podkreślić, że w fermentacji dwuskładnikowego substratu fenolowego (p-krezol + razorcyna) przebieg zmian CZT miał wyraźny charakter dwustopniowy (rys. 7).

Nasuują się dwa alternatywne tłumaczenia zjawiska wzrostu wartości CZT w obserwowanym układzie izolowanym.

Zahamowanie spadku CZT lub jego wzrost mogło wynikać z samej metodyki oznaczenia chemicznego zapotrzebowania tlenu. Zastosowana skrócona metoda oznaczania CZT mogła nie dawać pełnej wartości teoretycznego zapotrzebowania tlenu, potrzebnego na przemianę związków organicznych do końcowych produktów utlenienia: CO_2 i H_2O . Utlenienie to mogło nie być całkowite wskutek wad metodycznych. W takim przypadku różnica pomiędzy teoretycznym a oznaczonym CZT powinna być szczególnie wyraźna dla substratu fenolowego. Aromatyczne związki fenolowe powinny się utleniać trudniej niż niepierscieniowe produkty pośrednie. Wynikałaby stąd możliwość zwiększonego CZT w fazie degradacji, w której mogłoby pojawiać się najwięcej produktów pośrednich. Dodatkowe obserwacje wykazały jednak, że związki fenolowe w warunkach przeprowadzonego oznaczenia CZT ulegają pełnemu utlenieniu. Pozostawała więc druga alternatywa interpretacji zjawiska.

W fazie przefermentowania połowy substratu obserwowano wyraźne opóźnienie spadku lub wzrost CZT w porównaniu ze stałym spadkiem stężenia fermentującego związku fenolowego. Zjawisko to może być spowodowane przez nagromadzenie się produktów pośrednich beztlenowej degradacji fenoli. Wytłumaczenie tego zjawiska zdaje się wyjaśniać pierwsze stadia mechanizmu fermentacji metanowej związków aromatycz-

nych. Otóż, jak sugerują obserwacje FINA i FISKINA [5] w procesach beztlenowej degradacji kwasu bezoesowego prawdopodobnie przebiega wstępne nasycenie podwójnych wiązań struktury aromatycznej poprzedzające rozerwanie pierścienia. Nasycenie to, jak się wydaje, może nastąpić z udziałem wodoru, którego obecność w układach enzymatycznych przewiduje BARKER [17] w swoim uogólnionym schemacie metanogenezy. Wodór ten pochodzi z procesów dehydrogenacji utlenianej części substratów. Można więc spodziewać się, że wskutek uwodornienia z fenoli tworzą się odpowiednie cykloheksanole. Związki te mają teoretyczne chemiczne zapotrzebowanie tlenu większe o ponad 20% od analogicznych fenoli. Wykazuje to tablica II, która podaje teoretyczne chemiczne zapotrzebowanie tlenu dla obserwowanych fenoli i odpowiadających im cykloheksanoli.

Przeprowadzone badania w sposób pośredni dostarczyły dowodów umożliwiających postawienie hipotezy wstępnego uwodornienia aromatycznej struktury fenoli z utworzeniem związków alicyklicznych jako produktów przejściowych w fermentacji metanowej fenoli. Uwodornienie to poprzedza rozszczepienie pierścienia alicyklicznego związku pośredniego i dalszy proces metanogenezy.

Na poparcie podanej hipotezy należałoby jednak uzyskać dalsze dowody na innej drodze. Badanie jednoczesnej adaptacji środowiska fermentującego fenol powinno na przykład wykazać zdolność beztlenowego rozkładu cykloheksanolu, jeżeli jest to rzeczywiście pośredni produkt tej fermentacji.

W badaniach dynamiki fermentacyjnego rozkładu fenoli prowadzono również konwencjonalne oznaczenia kwasów lotnych (rys. 1, 3, 5, 7). Uważa się je za powszechnie występujące metabolity pośrednie w procesach fermentacji metanowej [17]. Przebieg zmian stężenia kwasów lotnych nie wydawał się jednak wskazywać na te związki jako na główne produkty pośrednie degradacji. Stężenie kwasów lotnych kształtowało się w fermentacji metanowej fenoli na prawie stałym poziomie. Było ono zbliżone do zawartości kwasów lotnych w komorach kontrolnych z fermentacją szczątkową środowiska zaszczipiającego i co najmniej dziesięciokrotnie niższe niż w aktywnej fermentacji metanowej osadów organicznych [13].

Utrzymywanie się małego stężenia kwasów lotnych w środowisku fermentującym fenole mogło być wynikiem złożonego zjawiska. Wprowadzanie substratu fenolowego w okresie a-

daptacyjnym powodowało wytworzenie się swoistych mieszanych populacji drobnoustrojowych, zdolnych do rozkładu określonej grupy związków fenolowych. Z drugiej jednak strony obecność dużych stężeń związku fenolowego mogła spowodować upośledzenie lub eliminowanie populacji bakteryjnych, które dominowały w fermentacji osadów. Środowisko to zostało użyte do zaszczepienia komór aklimatyzowanych do beztlenowego rozkładu fenoli. Z tej początkowej fazy fermentacyjnej mogły pochodzić obserwowane kwasy lotne.

Omówione cechy odróżniające przebieg fermentacji metanowej fenoli od beztlenowego rozkładu innych, mniej egzotycznych substratów - nie wpływały na pełną przemianę związków fenolowych w gaz fermentacyjny (tab. I). Doświadczalnie stwierdzone ilości gazu tworzącego się z rozkładu określonych porcji fenoli, w granicach błędu doświadczalnego, były bliskie wartościom stechiometrycznie wyliczonym z równania BUSWELLA [17].

Wydaje się, że również interesujące były pewne obserwacje marginesowe dla tej pracy, związane z fermentacją metanową dwuskładnikowego substratu fenolowego: p-krezolu i rezorcyny. Wskazały one na wybiórcze działanie bakterii fermentujących te związki. Dowodem tego może być wyraźnie dwustopniowy przebieg rozkładu obu substratów (rys. 7). Wykazały to również badania przeprowadzone metodą chromatografii cienkwarstwowej (rys. 8). W sposób wyraźny zaznaczyła się większa szybkość rozkładu rezorcyny od p-krezolu pomimo wstępnego adaptowania układu do degradacji obu substratów. Można nawet przypuszczać, że rozkład tych dwóch związków fenolowych następował kolejno. Zanikowi rezorcyny towarzyszył tylko nikły spadek stężenia p-krezolu. Fermentacja tego związku przebiegała właściwie dopiero po całkowitym rozkładzie rezorcyny (rys. 7, 8).

Pojawienie się różnic szybkości beztlenowego rozkładu może być związane z budową chemiczną p-krezolu i rezorcyny. Wiadomo, że rezorcyna wykazuje słabsze własności aromatyczne niż p-krezol. Można spodziewać się, że wskutek tej różnicy rezorcyna była bardziej podatna na drobnoustrojowe przemiany biochemiczne.

Na szczególny przebieg fermentacji metanowej dwuskładnikowego substratu fenolowego mógł mieć również pewien wpływ sposób aklimatyzacji środowiska fermentacyjnego. Adaptacja ta przebiegała przez wstępne przystosowanie środowiska do fermentacji rezorcyny zaś wtórnie do rozkładu

p-krezolu. Dopiero do tak zaadaptowanego środowiska wprowadzano kolejne dawki dwuskładnikowego substratu fenolowego: mieszaniny równych stężeń p-krezolu i rezorcyny.

STRESZCZENIE

Przeprowadzono badania dynamiki beztlenowego rozkładu fenolu, p-krezolu i rezorcyny w fermentacji metanowej w warunkach periodycznych. Mieszane populacje bakteryjne tej fermentacji przystosowano adaptacyjnie do pełnej przemiany substratów fenolowych w gaz fermentacyjny. Stwierdzono, że w fazie aktywnej fermentacji dawki 1000 mg/l związku fenolowego w środowisku fermentacyjnym, nagromadzały się niezidentyfikowane produkty pośrednie beztlenowego rozkładu fenoli. Zjawisko to ujawniało się przez okresowy wzrost chemicznego zapożrebowania tlenu (CZT) cieczy fermentującej. Metody chromatografii cienkowarstwowej wykazały, że związki te nie miały własności dwufenoli na przykład pirokatechiny, która występuje jako główny produkt przejściowy tlenowych przemian związków fenolowych. Stwierdzono, że okresowo nagromadzające się produkty pośrednie mają charakter związków nasyconych. Nie były to jednak kwasy lotne powszechnie występujące w fermentacji metanowej osadów organicznych.

Przeprowadzone badania umożliwiły stwierdzenie, że wstępne stadia beztlenowego rozkładu fenoli polegają na uwodornieniu struktury aromatycznej z utworzeniem związków alicyklicznych jako produktów pośrednich w fermentacji metanowej fenoli. Uwodornienie to poprzedza rozszczepienie pierścienia pośredniego związku alicyklicznego i dalszy proces metanogenezy.

W beztlenowej degradacji dwuskładnikowego substratu fenolowego stwierdzono wyraźnie dwustopniowy przebieg procesu. Fermentacja p-krezolu następowała dopiero po przefermentowaniu rezorcyny. Łatwiejszy rozkład fermentacyjny rezorcyny można tłumaczyć przez słabiej zaznaczone własności aromatyczne tego dwufenolu niż p-krezolu.

Wydaje się, że obserwacje zgromadzone w przeprowadzonych badaniach będą przydatne w poznaniu podstaw procesu fermentacyjnego, który może mieć praktyczne znaczenie w technologii biochemicznej procesów oczyszczania wód fenolowych.

Politechnika Śląska
Katedra Technologii Wody i Ścieków

LITERATURA

- [1] CHMIEŁOWSKI J., GROSSMAN A.: "Dégradation du phénol et des substances phénoliques par la fermentation méthanique" - XXXV Międzynarodowy Kongres Chemii Przemysłowej, Warszawa, 1964 - Chimie et Industrie 92, (z. 3 bis), 145 (1964).
- [2] CHMIEŁOWSKI J., GROSSMAN A. i WĘGRZYŃSKA I.: "Rozkład fenolu w fermentacji metanowej" - Zesz. Nauk. Pol. Śl. Inżynieria Sanitarna 6, 31 (1964).
- [3] CHMIEŁOWSKI J., GROSSMAN A. i ŁABUŹEK S.: "Biochemiczny rozkład niektórych fenoli w fermentacji metanowej" - Zesz. Nauk. Pol. Śl. Inżynieria Sanitarna 8, 97 (1965).
- [4] CLARK F.M., FINA L.R.: "The Anaerobic Decomposition of Benzoic Acid During Methane Fermentation" - Arch. Biochem. 23, 26 (1951).
- [5] FINA L.R., FIŠKIN A.: "The Anaerobic Decomposition of Benzoic Acid During Methane Fermentation. II. Fate of Carbons One and Seven" - Arch. Biochem. Biophys. 91, 163 (1963).
- [6] STANIER R.Y.: "Problems of Bacterial Oxidative Metabolism" - Bact. Rev. 14, 179 (1950).

- [7] EVANS W.C.: "The Microbiological Degradation of Aromatic Compounds" - J. Gen. Microbiol. 32, 177 (1963).
- [8] ROGOFF M.H.: "Oxidation of Aromatic Compounds by Bacteria" w "Advances in Applied Microbiology" t. III, Acad. Pres., New York (1961).
- [9] STAHL E.: "Dunnschicht - Chromatographie ein Laboratoriumshandbuch", Springer Verlag, Heidelberg (1962).
- [10] CRUMP G.B.: "Thin Layer Chromatographic Analysis of Simple Alkyl Phenols" - Anal. Chem. 36, 2447 (1964).
- [11] LURIE J.J., RYBNIKOWA A.J.: "Chimiczeskij analiz prizwodstwiennykh stocznykh wod", Goschimizdat, Moskwa (1958).
- [12] CHMIEŁOWSKI J., SIMPSON J.R. i ISAAC P.C.G.: "Use of Gas Chromatography in Sludge Digestion" - Sew. Ind. Wastes 31, 1237 (1959).
- [13] CHMIEŁOWSKI J.: "Kinetyka i mechanizm fermentacji metanowej" - Zesz. Nauk. Polit. Śl. Chemia nr 17, Gliwice (1963).
- [14] "STANDARD METHODS for the Examination of Water, Sewage and Industrial Wastes", wyd. 10, Amer. Publ. Health. Assn., New York (1955).
- [15] ZDYBIEWSKA M.: "Oznaczanie chemicznego zapotrzebowania tlenu w ściekach" - Gaz, Woda Tech. Sanit. 34, 254 (1960).
- [16] BUSWELL A.M., HATFIELD W.D.: "Anaerobic Fermentations" - Illionis State Water Survey Bull. No. 32 (1939).
- [17] BARKER H.A.: "Biological Formation of Methane" - Ind. Eng. Chem. 48, 1438 (1956).

ИССЛЕДОВАНИЯ ПО ДИНАМИКЕ АНАЭРОБНОЙ ДЕГРАДАЦИИ НЕКОТОРЫХ ФЕНОЛОВ
В МЕТАНОВОМ БРОЖЕНИИ

Резюме

Проведено исследование по динамике анаэробной деградации фенола, р-крезола и резорцина в метановом брожении в периодических условиях. Смешанные популяции бактерий этого брожения адаптивно применены к полному превращению фенольных субстратов в ферментационный газ. Обнаружено, что в активной фазе брожения дозы 1000 мг/л фенольного соединения в среде брожения накаплились не определенные промежуточные продукты анаэробной деградации фенолов. Это явление выявилось посредством периодического роста химической потребности в кислороде (ХПК) ферментационной среды. Методы тонкослойной хроматографии показали, что у этих соединений не было свойств дефенолов, например, пирокатахина, который выступает в качестве основного промежуточного продукта аэробного метаболизма фенольных соединений. Пришли к заключению, что периодически накапливающиеся промежуточные продукты имеют характер насыщенных соединений. Однако это не были летучие кислоты, широко выступавшие в метановом брожении органических илов.

Произведенные исследования дали возможность убедиться в том, что предварительные этапы анаэробной деградации фенолов заключаются в гидрогенизации ароматической структуры с образованием алициклических соединений в качестве промежуточных продуктов в метановом брожении фенолов. Гидрогенизация эта опережает расщепление кольца промежуточного алициклического соединения и дальнейший процесс метаногенезиса.

В анаэробной деградации двухкомпонентного фенольного субстрата обнаружено ярко двухступенный ход процесса. Брожение р-крезола производилось только что после брожения резорцина. Более свободную деградацию брожения резорцина можно пояснить слабее отмечающимися ароматическими свойствами этого дифенола, чем р-крезола.

Кажется, что наблюдения, накоплены в произведенных исследованиях пригодятся при определении оснований процесса брожения, который может иметь практическое значение в биохимической технологии процессов очистки фенольных сточных вод.

Силезский политехнический институт
Кафедра технологии воды и сточных вод

AN INVESTIGATION OF THE DYNAMICS OF ANAEROBIC DECOMPOSITION OF SOME PHENOLS IN THE METHANE FERMENTATION

S u m m a r y

The dynamics of the anaerobic degradation of phenol, p-cresol and resorcinol was under investigation. These studies were performed in batch conditions with the fermentation of the dose of 1000 p.p.m. of phenolic compound. The mixed bacterial populations of this fermentation process were acclimated to complete conversion of phenolics to the fermentation gas.

It was found that in active phase of this fermentation some unidentified products were accumulated in the fermentation medium. This phenomenon was shown by temporary increased values of COD of the fermenting liquor. The thin-layer chromatographic analysis indicated that those unknown intermediates had no dihydroxybenzene properties such as catechol. This particular polyhydric phenol occurs as the general intermediate product of the aerobic metabolism of phenolics.

The results of performed investigations showed that these temporary accumulated intermediates had the nature of saturated compounds. They were not, however, the volatile acids generally occurring during the methane fermentation of organic sludges. It was found that primary stages of anaerobic degradation of phenols in this fermentation were based on the hydrogenation of the aromatic structure with the formation of some alicyclic compounds as intermediate products. The hydrogenation process was followed by the ring - fission of alicyclic intermediates and then by the methanogenesis from the degradation products.

A distinct two-stages course of the fermentation was observed during the anaerobic degradation of two - component phenolic substrate. The resorcinol fermentation was followed by the degradation of p-cresol. Facility of the decomposition of resorcinol could be explained by less distinct aromatic properties of this polyhydric compound than those of p-cresol.

It seems, that the results of these studies will be useful for the basic knowledge of the methane fermentation of phenols. This process could be practically applied for the biochemical treatment of phenolic waste waters.

Silesian Technical University
Laboratory of Water and Waste Waters Technology