

Modelowe kompleksy agroenergetyczne

jako przykład kogeneracji rozproszonej opartej na lokalnych i odnawialnych źródłach energii

MONITORING I STEROWANIE PROCESEM TECHNOLOGICZNYM BIOGAZOWNI



Sławomir JABŁOŃSKI, Andrzej VOGT, Marek KUŁAŻYŃSKI, Marcin ŁUKASZEWICZ

MONITORING I STEROWANIE PROCESEM TECHNOLOGICZNYM BIOGAZOWNI

**Sławomir JABŁOŃSKI
Andrzej VOGT
Marek KUŁAŻYŃSKI
Marcin ŁUKASZEWICZ**

MONITORING I STEROWANIE PROCESEM TECHNOLOGICZNYM BIOGAZOWNI

WROCŁAW 2014

**Sławomir JABŁOŃSKI¹, Andrzej VOGT²,
Marek KUŁAŻYŃSKI³, Marcin ŁUKASZEWICZ¹**

**MONITORING I STEROWANIE
PROCESEM TECHNOLOGICZNYM BIOGAZOWNI**

Recenzent: **dr hab. Paweł CYPLIK**

Redaktor naukowy: **dr hab. inż. Marcin ŁUKASZEWICZ**

Praca wchodzi w skład monograficznej serii wydawniczej, wydanej w ramach projektu kluczowego „Modelowe kompleksy agroenergetyczne jako przykład kogeneracji rozproszonej opartej na lokalnych i odnawialnych źródłach energii”, nr POIG.01.01.02-00-016/08, koordynowanego przez Instytut Maszyn Przepływowych PAN w Gdańsku i realizowanego w ramach Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka na lata 2007-2013.

© Copyright by Politechnika Wrocławska

ISBN: 978-83-63503-29-1

Skład, druk i oprawa:

druk-24h.com.pl
DRUKARNIA CYFROWA

Białystok, ul. Zwycięstwa 10

tel. 85 653-78-04

e-mail: biuro@partnerpoligrafia.pl

Politechnika Wrocławska

Wybrzeże Wyspiańskiego 27; 50-370 Wrocław

¹ Uniwersytet Wrocławski, Wydział Biotechnologii

² Uniwersytet Wrocławski, Wydział Chemii

³ Politechnika Wrocławska, Wydział Chemiczny

SPIS TREŚCI

1. Wprowadzenie	9
2. Modele matematyczne w opisie procesu fermentacji metanowej	11
2.1. Teoretyczny uzysk biogazu	11
2.2. Strategia postępowania w modelowaniu procesu fermentacji metanowej.	12
2.3. ADM1	14
2.4. Zastosowanie i modyfikacje ADM1	36
3. Metody biochemiczne w analizie procesu metanogenezy	43
3.1. Analiza składu substratu	43
3.2. Badanie aktywności enzymatycznej	48
3.3. Metody chromatograficzne w analizie fermentacji metanowej	52
3.4. Określanie aktywności mikroorganizmów w złożach metanogennych.	55
4. Analiza składu populacji mikroorganizmów w środowisku beztlenowym	57
4.1. Metody hodowlane w badaniu składu populacji mikroorganizmów	58
4.2. Biologia molekularna w analizie populacji mikroorganizmów metanogennych	63
4.3. Interaktywne bazy danych dotyczące mikroorganizmów metanogennych	76
5. Sterowanie i monitoring w instalacjach przeznaczonych do prowadzenia fermentacji metanowej.	81
5.1. Bioreaktory fermentacji metanowej.	81
5.2. Stanowisko laboratoryjne przeznaczone do badania procesu fermentacji metanowej.	81
5.3. Skalowanie systemu sterowania.	88
5.4. Koncepcje zarządzania	90
5.5. Wrażliwe elementy procesu fermentacji metanowej w świetle sterowania biogazownią	93
5.6. Podsumowanie i uwagi końcowe	97

WSTĘP / OD AUTORA

Od kilku lat na terenie Unii Europejskiej kładzie się coraz większy nacisk na rozwijanie odnawialnych źródeł energii. Jednym ze sposobów produkcji energii odnawialnej jest przetwarzanie odpadów organicznych na biogaz w wyniku fermentacji metanowej. Pomimo że proces ten znany jest już o wielu lat, wciąż nie zbadano szczegółowo jego podstaw biochemicznych, a technologia budowy i sterowania instalacjami przeznaczonymi do prowadzenia fermentacji metanowej jest wciąż rozwijana. Zagadnienia związane z rozwiązywaniem problemów związanych z procesem produkcji biogazu stały się częścią projektu kluczowego POIG.01.01.02-00-016/08 „Modelowe kompleksy agroenergetyczne jako przykład kogeneracji rozproszonej opartej na lokalnych i odnawialnych źródłach energii”. Niniejsze opracowanie jest obszernym zbiorem informacji dotyczących monitorowania przebiegu fermentacji, jak również automatyzacji kontroli w układach przeznaczonych do produkcji biogazu.

1. WPROWADZENIE

Biogaz powstaje w procesie beztlenowego rozkładu materii organicznej. Jest to mieszanina gazów, w której skład wchodzi głównie metan (30-70%) i ditlenek węgla (30-70%), a także małe ilości siarkowodoru, pary wodnej, wodoru, azotu i amoniaku. Wartość opałowa metanu to $39,7 \text{ MJ/m}^3$ (9470 kcal/m^3), co oznacza, że biogaz o średniej zawartości metanu na poziomie 62% ma wartość opałową $22,1 \text{ MJ/m}^3$. Dzięki temu możliwe jest wykorzystanie biogazu do napędzania pojazdów oraz produkcji energii elektrycznej i ciepłej. Z uwagi na zawartość pary wodnej i siarkowodoru do wielu zastosowań niezbędne jest odsiarczanie i osuszanie biogazu.

Mikrobiologiczna produkcja biogazu jest zjawiskiem rozpowszechnionym w przyrodzie. W warunkach naturalnych proces ten zachodzi między innymi w przewodach pokarmowych przeżuwaczy i termitów, na terenach podmokłych i na dnie zbiorników wodnych, a także podczas rozkładu nawozów pochodzenia zwierzęcego (gnojowica, obornik). Biogaz tworzony jest również w środowiskach powstałych na skutek działalności człowieka takich jak: składowiska odpadów, oczyszczalnie ścieków, pola ryżowe oraz hodowle zwierząt.

W procesie tworzenia biogazu część energii zmagazynowanej w substratach jest wykorzystywana przez mikroorganizmy do wzrostu, jednakże końcowy produkt przemiany materii (metan) w dalszym ciągu jest nośnikiem znacznej ilości energii. Metan może być wykorzystany jako paliwo w istniejących jednostkach napędowych. Dlatego też proces metanogenezy stanowi interesującą drogę produkcji odnawialnej energii.

Obecnie fermentacja metanowa jest definiowana jako zespół beztlenowych procesów biochemicznych, w których wielkocząsteczkowe substancje organiczne są rozkładane do niższych kwasów organicznych i alkoholi, a następnie do metanu, ditlenku węgla i wody. Taka definicja jest zgodna z biotechnologicznym znaczeniem terminu fermentacji rozumianej jako proces biologicznej konwersji materii organicznej zachodzący w reaktorze. W dalszej części tekstu wyrażenie fermentacja metanowa będzie rozumiane zgodnie z wyżej opisaną definicją.

Warto jednak pamiętać także o innych możliwych znaczeniach terminu fermentacja. Z punktu widzenia biochemii fermentacją należy nazwać jedynie procesy przemian związków organicznych związane z pozyskiwaniem energii, w których równoważniki redukcyjne są przekazywane na związek organiczny (Schlegel 2000). Tak rozumiana fermentacja stanowi jedynie część procesów prowadzonych przez niektóre grupy mikroorganizmów biorących udział w beztlenowym rozkładzie związków organicznych, prowadzącym w efekcie końcowym do

produkcji metanu. Końcowy etap - proces metanogenezy - jest rozumiany jako szlak metaboliczny archeonów, prowadzący bezpośrednio do powstania metanu w wyniku rozszczepienia cząsteczki kwasu octowego lub redukcji związków jednowęglowych (Schlegel 2000). Sama metanogeneza jest więc z biochemicznego punktu widzenia procesem oddychania beztlenowego, a nie fermentacją.

Ponieważ proces fermentacji metanowej stanowi źródło odnawialnego paliwa, od ponad 140 lat prowadzone są badania mające na celu zgłębienie mechanizmów tego zjawiska. Poszczególne procesy rozkładu materii organicznej prowadzone są przez odrębne grupy mikroorganizmów, dlatego też dla prawidłowego przebiegu procesu fermentacji konieczna jest symbioza wielu drobnoustrojów. Procesy hydrolizy i fermentacji materii organicznej prowadzone są przez różnego rodzaju bakterie, natomiast za powstawanie metanu odpowiedzialne są archeony.

Archeony są dość rozpowszechnione w przyrodzie; można je spotkać między innymi: w osadach naturalnych wód, rzek, jezior, mórz i oceanów (Munson, Nedwell et al. 1997), w wodach gejzerów, w szczelinach wulkanów (Kelly and Deming 1988), w instalacjach fermentujących osadach ściekowych (Saiki, Iwabuchi et al. 2002), w treści przewodów pokarmowych zwierząt (Miller and Wolin 2001).

W instalacjach fermentacyjnych jako substrat wykorzystuje się różnego rodzaju substancje organiczne takie jak: odpady przemysłu spożywczego i produkcji rolnej, odchody zwierzęce, osady ściekowe oraz rośliny energetyczne (np. kukurydza).

Z uwagi na zróżnicowane wymagania życiowe bakterii biorących udział w procesie fermentacji, optymalne warunki do jej przebiegu mieszczą się w wąskim zakresie. Odczyn środowiska powinien wynosić od 6,5 do 8 (Hawkes, Hussy et al. 2007; Arudchelvam, Perinpanayagam et al. 2010). W zależności od składu mikroflory baterijnej prowadzącej proces fermentacji, można wyróżnić kilka optymalnych zakresów temperaturowych: 8-20 °C (warunki psychrofilne), 20-40 °C (warunki mezofilne), 55-65 °C (warunki termofilne) (Perera, Ketheesan et al. 2012). Fermentacja w warunkach termofilnych charakteryzuje się większą szybkością procesu, jednakże jest bardziej podatna na działanie czynników szkodliwych. Pomimo tego, że często etapem limitującym proces fermentacji metanowej jest hydroliza i dezintegracja substratu, warunki w układach z jedną komorą fermentacyjną muszą być dostosowywane do etapu metanogenezy. Przyspieszenie procesu próbuje się uzyskać różnymi sposobami. Przykładowo można dodać odpowiednie szczepionki (Gannoun, Khelifi et al. 2008), prowadzić proces kaskadowo w dwóch zbiornikach lub połączyć oba działania. Etap hydrolizy można przyspieszyć przez wprowadzenie mikroorganizmów naturalnie wytwarzających hydrolazy (Krasowska and Łukaszewicz 2007) lub dodanie enzymów produkowanych w systemach nadekspresyjnych (Carrère, Dumas et al. 2010). Rozdzielenie procesu na dwa zbiorniki pozwala również na uzyskanie wodoru, co podnosi zysk energetyczny całego procesu fermentacji (Venetsaneas, Antonopoulou et al. 2009).

2. MODELE MATEMATYCZNE W OPISIE PROCESU FERMENTACJI METANOWEJ

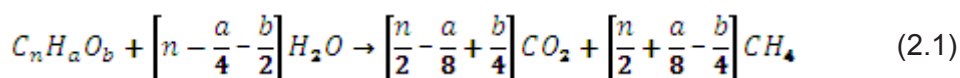
Podobnie jak inne zjawiska przyrodnicze, proces fermentacji metanowej możliwy jest do opisania językiem matematyki. Stworzenie dobrego modelu matematycznego opisującego fermentację metanową pociągnie za sobą następujące skutki:

- wzrost zastosowania modelu w opisie procesów prowadzonych w skali przemysłowej;
- ustanowienie wspólnej podstawy dla dalszego rozwoju modelu, badań wалиdacyjnych oraz zapewnienia zgodności wyników;
- rozwój prac nad optymalizacją procesów sterowania i kontroli przeznaczonych dla przemysłu;
- usprawnienie projektowania instalacji fermentacyjnych dzięki możliwości komputerowego symulowania procesu fermentacji;
- wspieranie transferu technologii od badań do przemysłu.

Poniższy rozdział przybliży czytelnikowi problematykę związaną z procesem modelowania procesu fermentacji metanowej.

2.1. TEORETYCZNY UZYSK BIOGAZU

Teoretyczną ilość biogazu, możliwą do uzyskania z substratu, oblicza się na podstawie składu pierwiastkowego. Ponieważ biogaz składa się głównie z metanu i ditlenku węgla, objętość biogazu możliwa do uzyskania w wyniku fermentacji metanowej jest uzależniona od zawartości węgla w danym substracie. Proporcja między ditlenkiem węgla a metanem wynika ze stopnia zredukowania badanej substancji. Teoretyczną objętość i skład biogazu można wyliczyć korzystając ze wzoru Buswella (Venetsaneas, Antonopoulou et al. 2009):



Wzór (2.1) pozwala wyliczyć stosunek ilości ditlenku węgla do metanu dla głównych grup substratów takich jak:

- węglowodany (polisacharydy lub monosacharydy) - 1 : 1,
- białka i aminokwasy - 7 : 3,
- tłuszcze podobnie jak białka czyli 1:1.

Powyższe równanie nie daje jednak żadnych informacji dotyczących wydajności i kinetyki procesu fermentacji. Dane takie są wymagane w procesie projektowania instalacji, w których ma być prowadzona fermentacja. Aby otrzymać takie informacje, należy posłużyć się bardziej skomplikowanymi modelami matematycznymi.

Stworzenie dobrego modelu kinetycznego opisującego fermentację metanową jest zadaniem trudnym z uwagi na stopień skomplikowania procesów stanowiących składowe tego zjawiska oraz złożoność materii organicznej.

Problem mechanizmów beztlenowego rozkładu biomasy – źródła metanu – od dawna stanowił ogromne wyzwanie dla mikrobiologów, biochemików, chemików czy biotechnologów. Wynika to z niezwykle skomplikowanego składu surowca używanego do generowania tego gazu oraz złożonej populacji mikroorganizmów przeprowadzającej różne reakcje biochemiczne. W skład surowca wchodzi bowiem nie tylko jednorodny związek chemiczny, lecz także ich mieszaniny, od monocukrów przez polisacharydy, proste aminokwasy, polipeptydy, białka, po lipidy. Ponadto fermentacja metanowa to proces o zmiennej dynamice, zależnej od koncentracji produktów pośrednich, co niezwykle komplikuje problem ich opisu. Dodatkowym utrudnieniem jest często niejednorodność warunków w wnętrzu reaktora.

W związku z wyżej opisanymi trudnościami stworzenie uniwersalnego i dokładnego modelu matematycznego opisującego proces fermentacji metanowej jest bardzo trudne. Obecnie stosowane modele muszą być optymalizowane na potrzeby danej instalacji fermentacyjnej, jak również wykorzystywać szereg uproszczeń w opisie poszczególnych procesów cząstkowych.

2.2. STRATEGIA POSTĘPOWANIA W MODELOWANIU PROCESU FERMENTACJI METANOWEJ.

Proces modelowania zjawiska fermentacji metanowej (jak również innych procesów fermentacyjnych) można podzielić na kilka etapów:

- wybór i zaprogramowanie modelu symulującego proces (fermentacyjny),
- wstępna kalibracja modelu, często oparta na danych literaturowych,
- zaprojektowanie i przeprowadzenie doświadczeń mających dostarczyć danych dla modelu,

- wybór i optymalizacja parametrów modelu mająca na celu dopasowanie wyników symulacji do danych eksperymentalnych,
- walidacja opracowanych danych na podstawie porównania z danymi z kolejnych doświadczeń.

Dokładniejszy opis podejścia do modelowania komputerowego procesów można znaleźć w opracowaniach takich jak: „System identification: theory for the user” (Ljung 1987). Poniżej przedstawione zostanie jedynie uproszczony opis dla przedstawienia ogólnej koncepcji zagadnienia.

W pierwszym etapie następuje przełożenie modelu teoretycznego do wersji cyfrowej, umożliwiającej rozwiązanie układu równań różniczkowych składających się na symulację. Model można zaprogramować w różnych językach programowania lub środowiskach obliczeniowych w zależności od umiejętności informatycznych eksperymentatora. Dogodną bazą dla rozwijania modeli opisujących zjawisko tworzenia biogazu jest ADM1, opisany w dalszych rozdziałach niniejszej pracy. Dzięki opracowaniu tego modelu powstała ujednolicona wersja równań opisujących procesy biologiczne i fizykochemiczne zachodzące podczas fermentacji metanowej. Model ten opisuje jedynie podstawowe procesy, dlatego też jego struktura jest często modyfikowana na potrzeby opisu konkretnych systemów fermentacyjnych.

Kolejnym etapem jest dobranie odpowiednich współczynników dla równań kinetycznych modelu. Z uwagi na ilość możliwych zmiennych, często używa się danych literaturowych opisujących warunki podobne do planowanego doświadczenia.

Następnym krokiem jest zaprojektowanie i przeprowadzenie doświadczeń, na podstawie których nastąpi optymalizacja wcześniej wybranych parametrów modelu. Najprostszym podejściem są eksperymenty w trybie hodowli okresowej. Prostota aparatury oraz mała skala pozwalają na wykonanie dużej ilości powtórzeń, co w znaczącym stopniu poprawia wiarygodność wyniku. Należy jednak pamiętać o znaczących ograniczeniach takiego podejścia (Lauwers, Appels et al. 2013):

- eksperymentator ma ograniczony wpływ na przebieg samego procesu fermentacji, ponieważ kontrolowanym zmianom mogą podlegać głównie warunki początkowe,
- jeżeli jedynym prowadzonym pomiarem jest odczyt ilości powstającego biogazu, to dynamika tego procesu będzie odzwierciedlać jedynie szybkość najwolniejszego z procesów pośrednich,
- duży wpływ na wartość wyznaczonych wartości parametrów kinetycznych ma stosunek ilości dostarczonego substratu do ilości mikroorganizmów (niestety parametr ten jest często pomijany).

W czwartym etapie wykonywane jest dostosowanie wybranych parametrów modelu tak, aby różnica pomiędzy wynikami eksperymentalnymi a symulacją była jak najmniejsza. W celu określenia, które parametry mają największy wpływ na poprawność modelu, wykonuje się często analizę czułości. W postępowaniu tym

określa się, jak duży wpływ na zgodność z danymi eksperymentalnymi ma zmiana danego parametru (Liwarska-Bizukojc and Biernacki 2010).

Po ustaleniu najbardziej wrażliwych parametrów na podstawie analizy czułości, można przystąpić do ich optymalizacji. Do obliczenia odchyleń między seriami danych należy użyć funkcji „kosztu”. Najczęściej stosowaną funkcją w tym przypadku jest obliczanie kwadratów odchylenia. Jednym ze sposobów optymalizacji jest prowadzenie modyfikacji wprowadzanych manualnie, jednakże jest to proces bardzo pracochłonny. Inną możliwością jest zastosowanie algorytmów optymalizujących, takich jak na przykład oparty na metodzie simplexu (Biernacki, Steinigeweg et al. 2013).

Ostatnim z etapów jest walidacja uzyskanych parametrów na przykład przez skonfrontowanie modelu z kolejnymi danymi eksperymentalnymi. Jeżeli wynik tego etapu jest niezadowolający należy powtórzyć postępowanie przy modyfikacji któregoś z wcześniejszych etapów (Ljung 1987).

Powyższy opis stanowi jedynie jeden z możliwych schematów postępowania, a poszczególne jego etapy mogą być wykonywane na wiele różnych sposobów w zależności od preferencji eksperymentatora. Bardziej szczegółowy opis zagadnienia modelowania można znaleźć w pracach przeglądowych takich jak autorów jak Donoso i Lauwers (Donoso-Bravo, Mailier et al. 2011; Lauwers, Appels et al. 2013).

Przykładem implementacji modelu ADM1 w środowisku Octave, jest model wykonany w Zakładzie Biotransformacji Uniwersytetu Wrocławskiego i Zakładzie Chemii i Technologii Paliw Wydziału Chemii Politechniki Wrocławskiej. Przygotowano dwie wersje wyżej opisanego modelu, służące do modelowania procesów fermentacji okresowej (odwzorowanie testów specyficznej aktywności metanogennej), jak również fermentacji ciągłej prowadzonej w bioreaktorach. Zastosowane współczynniki stechiometryczne oraz stałe kinetyczne zamieszczono w tabelach od 2 do 12. Dane te są orientacyjne i na potrzeby konkretnych zastosowań należy przeprowadzić ich optymalizację. W efekcie przeprowadzonych badań, dla lepszego oddania warunków panujących w doświadczeniach okresowych, wprowadzono do modelu dodatkową zmienną dynamiczną opisującą stężenie gazu obojętnego wprowadzonego na początku doświadczenia w celu usunięcia tlenu.

2.3. ADM1

Anaerobic digestion model No.1 (ADM1), stworzony przez Group for Mathematical Modeling of Anaerobic Digestion Processes (IWA, 2002), jest modelem matematycznym pierwotnie stworzonym do opisu procesu fermentacji metanowej osadów z tlenowych oczyszczalni ścieków (Batstone 2002). Założeniem było stworzenie dość uniwersalnego modelu opisującego proces fermentacji metanowej.

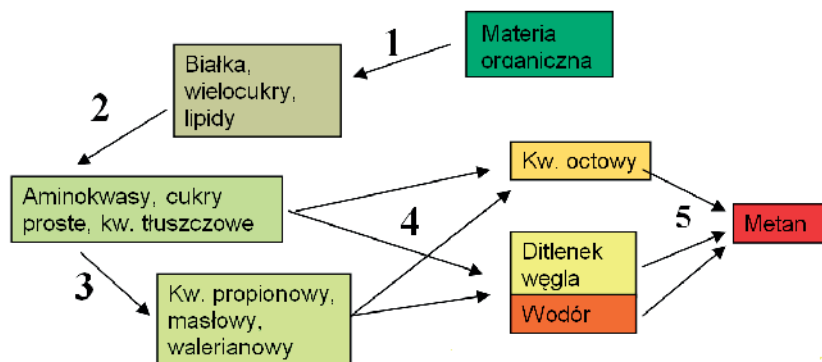
Starano się uprościć opis zachodzących procesów przy jednoczesnym zachowaniu przejrzystości i kompletności opisywanego zagadnienia. Autorzy starali się stworzyć model nadający się do dalszych modyfikacji, pozwalających na jego dostosowanie do konkretnych warunków i dalszej optymalizacji. Zakłada się więc zarówno upraszczanie modelu, jak i jego rozwijanie w celu uwzględnienia dodatkowych niezbędnych parametrów. Kolejne wersje modelu powinny być użytecznym narzędziem do przewidywania wydajności procesu, optymalizacji istniejących procesów i tworzenia nowych, a także ułatwiać sterowanie instalacjami przemysłowymi.

Przemiany materii zachodzące podczas fermentacji metanowej w modelu ADM1 opisywane są przez 19 równań opisujących procesy biologiczne, które można przyporządkować do 5 etapów: dezintegracji, hydrolizy, kwasogenezy (ang. acidogenesis) acetogenezy, metanogenezy (tabele 3 i 4) oraz 11 równań opisujących procesy fizyko-chemicznych (tabele 5 i 6). Pierwotnie model przeznaczony był do opisu procesu metanogenezy w reaktorach typu CSTR (ang. completely stirred tank reactor). Dzięki temu podejściu możliwe było zastosowanie uproszczenia obliczeń polegające na pominięciu procesów dyfuzji związków i sedymentacji części stałych.

Jako jednostkę miary opisującą ilość materii organicznej w ADM1 przyjęto chemiczne zapotrzebowanie na tlen (ang. Chemical Oxygen Demand – COD). COD jest to ilość tlenu potrzebna do całkowitego utlenienia związków organicznych w badanych próbach. Do oznaczania tej wartości najczęściej wykorzystuje się reakcję utleniania związków organicznych dwuchromianem potasu. Ponieważ pomiar COD jest powszechnie stosowany w analizie wody i ścieków, dane uzyskane tą metodą mogą być bezpośrednio wprowadzone do modelu bez konieczności konwersji do innej jednostki miary. Należy jednak pamiętać że wartość COD nie odzwierciedla dokładnie ilości węgla organicznego i jest zależna od stopnia zredukowania materii organicznej. Dodatkowo część związków organicznych, które można utlenić chemicznie nie będzie wykorzystywana przez mikroorganizmy w procesie fermentacji metanowej (Gossett and Belser 1982). W modelu uwzględnia się więc frakcję materii organicznej wyrażonej w COD, która nie będzie biodegradowalna. Tak jak pozostałe komponenty część nie biodegradowalną podzielono na komponent rozpuszczalny S_i i nierozpuszczalny X_i .

W ADM1 nie uwzględniono procesów takich jak homoacetogeneza, redukcja siarczanów i azotanów przez odpowiednie bakterie w środowisku beztlenowym. Procesy te stanowią alternatywną drogę wykorzystania wodoru cząsteczkowego i dla niektórych systemów fermentacyjnych mogą być bardzo ważne. ADM1 pomija również występowanie alternatywnych związków pośrednich dla fermentacji takich jak etanol czy kwas mlekowy, ponieważ związki te występują w reaktorach metanogennych w bardzo małych ilościach i prawdopodobnie są szybko przekształcane do kwasów ujętych w modelu.

Procesy biologiczne ujęte w modelu ADM1 można zaliczyć do jednego z następujących etapów: dezintegracji, hydrolizy, kwasogenezy, acetogenezy lub metanogenezy (Rysunek 1). W dalszej części tego rozdziału zostaną one opisane w sposób szczegółowy.



Rysunek 1. Przemiany materii organicznej podczas fermentacji metanowej. 1- dezintegracja, 2 – hydroliza, 3 – kwasogeneza, 4 – acetogeneza, 5 – metanogeneza.

2.3.1. Dezintegracja

Pierwszym krokiem w łańcuchu reakcji prowadzących do przemiany materii organicznej do biogazu, jaki ujęto w modelu ADM1, jest dezintegracja. Proces ten polega na rozdrobnieniu i rozpuszczeniu związków, z których zbudowany jest materiał wsadowy. Etap dezintegracji jest matematycznym odwzorowaniem procesu lizy komórek lub innych cząstek stałych stanowiących substrat. W wyniku dezintegracji do roztworu zostają uwolnione następujące związki: węglowodany X_{ch} , białka X_{pr} , tłuszcze X_{li} oraz niedegradowalne (obojętne dla procesu) związki rozpuszczalne S_i i nie rozpuszczalne X_i (Tabela 3). Uwzględnienie procesu dezintegracji pozwala również na łatwe ponowne włączenie materii pochodzącej z obumarłych bakterii do szlaku fermentacji metanowej. Takie uproszczenie nie sprawdza się jednak w sytuacji, gdy substrat znacząco różni się składem od bakterii. Dlatego też często stosuje się modyfikację ADM1 polegającą na rozdzieleniu procesów dezintegracji substratu i martwych mikroorganizmów (Wett 2006).

W modelu ADM1 proces dezintegracji opisywany jest zgodnie z kinetyką pierwszego rzędu (ilość powstającego produktu jest jedynie zależna od stężenia substratu), niezależną od ilości bakterii w reaktorze (Batstone 2002). Należy jednak pamiętać, że jest to uproszczenie, sprawdzające się jedynie w przypadku reaktorów przystosowanych do danego rodzaju substratu o stabilnej populacji mikroorganizmów, w których ilość mikroorganizmów znacznie przewyższa ilość dostępnego substratu. Rozwiązanie takie przyjęto za poprawne z uwagi na mnogość i różnorodność indywidualnych procesów, których efektem jest dezintegracja materii

organicznej. W literaturze są przedstawione również inne równania kinetyczne opisujące proces dezintegracji. Więcej szczegółów można znaleźć w pracy Vavilina i współpracowników z 2008 roku (Vavilin, Fernandez et al. 2008). Porównanie z innymi modelami kinetycznymi wykazało jednak małe odchylenia w odniesieniu do kinetyki pierwszorzędowej, co potwierdza słuszność zastosowania tego modelu w opisie procesu dezintegracji (Batstone 2002).

2.3.2. Hydroliza (depolimeryzacja)

Kolejnym etapem przemian materii organicznej uwzględnionym w modelu ADM1 jest hydroliza, podczas której organiczne związki polimerowe takie jak węglowodany, białka i tłuszcze ulegają depolimeryzacji. Hydrolizowane polimery są najczęściej bardzo słabo rozpuszczalne i występują w postaci dużych agregatów. Jest więc dość trudno precyzyjnie rozdzielić proces dezintegracji od hydrolizy, w trakcie której z nierozpuszczalnych polimerowych agregatów oddzielane są rozpuszczalne monomery. Proces ten jest etapem limitującym fermentację metanową (Eastman and Ferguson 1981). Powstałe monomery (kwasy tłuszczowe - S_{fa} , aminokwasy - S_{aa} , monosacharydy i glicerol - S_{su}) są następnie metabolizowane do mieszaniny lotnych kwasów tłuszczowych (ang. volatile fatty acids - VFA) podczas kwasogenezy. Proces hydrolizy jest katalizowany przez enzymy takie jak: lipazy, proteazy, celulazy oraz amylazy. W zależności od sposobu wydzielania enzymów przez mikroorganizmy proces hydrolizy może być opisany przez dwa modele:

- 1) białka enzymatyczne są wydzielane do roztworu, gdzie adsorbują do powierzchni cząstek koloidu bądź też reagują ze związkami rozpuszczonymi w medium hodowlanym,
- 2) mikroorganizm przyłącza się do powierzchni substratu i wydziela enzymy do bliskiego otoczenia oraz wchłania produkty hydrolizy powstałe w najbliższym sąsiedztwie.

W ADM1 na podstawie wcześniejszych badań (Vavilin, Rytov et al. 1996; Sanders, Geerink et al. 2000) przyjęto, że dominuje model drugi. Zakłada się więc, że czynnikiem katalitycznym są mikroorganizmy przyłączające się do substratu, a nie enzymy. Ponieważ równanie użyte do opisu procesu hydrolizy nie zakłada udziału w nim mikroorganizmów, w przypadku reaktorów, które nie dostosowały się do nowego substratu, wyniki symulacji mogą być zawyżone w stosunku do wartości rzeczywistych.

Proces hydrolizy może być dość złożony, katalizowany przez szereg enzymów i zależny od sekwencji różnych czynników fizykochemicznych, np. dyfuzja czy adsorpcja. Kumulatywny efekt wszystkich czynników może być w pewnym przybliżeniu odzwierciedlony przez równanie kinetyki pierwszego rzędu przyjęte w modelu ADM1 (Eastman and Ferguson 1981).

2.3.3. Kwasogeneza - powstawanie mieszaniny krótkich kwasów organicznych.

Kwasogeneza jest to etap łączący w sobie kilka procesów biochemicznych, w wyniku których powstaje mieszanina lotnych kwasów tłuszczowych, ditlenku węgla oraz wodoru. Kwasogeneza w przeciwieństwie do następnego etapu (octanogenezy) może przebiegać bez zewnętrznych akceptorów elektronów. Cukry są przekształcane na szlakach, w których ostatecznym akceptorem elektronów jest związek organiczny (jest to fermentacja w biochemicznym znaczeniu tego terminu). Aminokwasy mogą być przekształcane zarówno na szlaku, w którym powstają zredukowane związki organiczne, jak i na szlaku prowadzącym do powstania wodoru cząsteczkowego.

Do opisu matematycznego kwasogenezy posłużono się równaniem Monoda (Batstone 2002). Model ADM1 wyróżnia dwie grupy związków, które ulegają przemianom do mieszaniny kwasów organicznych: cukry i aminokwasy. Ponieważ kwasy tłuszczowe głównie przekształcane są do kwasu octowego, a reakcje wymagają zewnętrznego akceptora elektronów, przemiany ich zostały uwzględnione wyłącznie w następnym etapie (octanogenezie). Przemiany każdej z grup opisywane są osobnym równaniem i prowadzone są przez odrębną grupę mikroorganizmów. Na szybkość procesu kwasogenezy mają wpływ - obok stężenia substratów - dostępność azotu w podłożu oraz odczyn środowiska (współczynniki inhibicji I_{Nlim} , I_{pH} - Tabela 2).

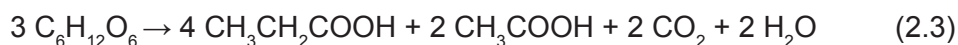
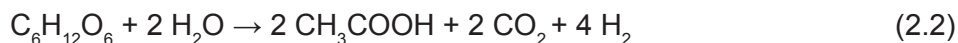
W modelu ADM1 jako produkty kwasogenezy uwzględniono następujące związki: kwas octowy - S_{ac} , kwas propionowy - S_{pro} , kwas masłowy - S_{bu} , kwas walerianowy - S_{va} , ditlenek węgla - S_{IC} , wodór - S_{H_2} oraz amoniak - S_{IN} (powstający w wyniku rozkładu aminokwasów). Do ważnych z biochemicznego punktu widzenia produktów fermentacji należą również etanol i kwas mlekowy, jednak ponieważ związki te są rzadko obserwowane w znaczących stężeniach w reaktorach beztlenowych, nie uwzględniono ich w modelu ADM1.

Obok głównych produktów fermentacji powstają również inne związki takie jak: aldehydy (aldehid mrówkowy, octowy, glioksal, aldehid glicerynowy), ketony (aceton), tioalkohole (z metabolizmu aminokwasów) i aminy (również produkt przemian aminokwasów), których nie uwzględniono w modelu z tych samych przyczyn co etanolu i kwasu mlekowego.

Fermentacja monosacharydów

Modelową cząsteczką dla fermentacji monosacharydów w modelu ADM1 jest glukoza. Dla potrzeb modelu przyjęto założenie, że fermentacja innych heksoz będzie taka sama pod względem energetycznym oraz stechiometrycznym, natomiast w wyniku fermentacji pentoz powstanie o jedną cząsteczkę CO_2 mniej.

Model obejmuje jedynie trzy procesy fermentacyjne węglowodanów, zachodzące według równań:



Produktami powyższych procesów są: kwas masłowy - S_{bu} , kwas propionowy - S_{pro} , kwas octowy - S_{ac} , ditlenek węgla - S_{IC} oraz wodór S_{H_2} . Mimo że możliwe jest również powstawanie innych produktów fermentacji węglowodanów, model ADM1 uwzględnia jedynie następujące kwasy: octowy, propionowy i masłowy. Inne produkty fermentacji (przede wszystkim etanol i kwas mlekowy) obserwowane są w tak małych ilościach w instalacjach fermentacyjnych, że dla uproszczenia obliczeń pominięto je. Uproszczenie to może jednak skutkować sporymi odchyleniami wyników modelowania w zakresie pH oraz stężenia VFA, szczególnie w reaktorach działających przy dużym obciążeniu. W przypadku stosowania modelu ADM1, do symulacji procesów produkcji wodoru wskazane jest uwzględnienie tych dodatkowych produktów (Peiris, Rathnasiri et al. 2006).

Przemiany aminokwasów

Aminokwasy otrzymane w wyniku hydrolizy białek, polipeptydów ulegają przekształceniu w fazie kwasogenezy na różne, mniej lub bardziej skomplikowane w zależności od macierzystej budowy kwasy karboksylowe. Jest to kilkietapowy proces (szczególnie dla aminokwasów o skomplikowanej budowie), z którego najważniejszym etapem jest proces dezaminacji.

W wyniku dezaminacji powstają jony amonowe (amoniak - S_{IN}) oraz mieszanina kwasów organicznych. Dalsze przemiany kwasów organicznych mogą zachodzić na dwóch drogach: poprzez fermentację Sticklanda oraz przez utlenianie z zewnętrznym akceptorem elektronów. Pierwszy ze szlaków charakteryzuje się tym, że przekazywanie wodoru następuje pomiędzy samymi kwasami organicznymi (np. utlenienie alaniny do kwasu pirogronowego połączone jest z redukcją glicyny do kwasu octowego). W przypadku wyczerpania dostępnych akceptorów organicznych degradacja aminokwasów przebiega drugim ze szlaków, w którym równoważniki redukcyjne przekazywane są na akceptor nieorganiczny, w wyniku czego uwalniany jest wodór cząsteczkowy lub kwas mrówkowy. Utlenianie z akceptorem zewnętrznym możliwe jest jedynie w środowisku o niskim stężeniu wodoru i kwasu mrówkowego lub podczas fermentacji prowadzonej w warunkach termofilnych. Wynikiem przemian jest mieszanina lotnych kwasów tłuszczowych,

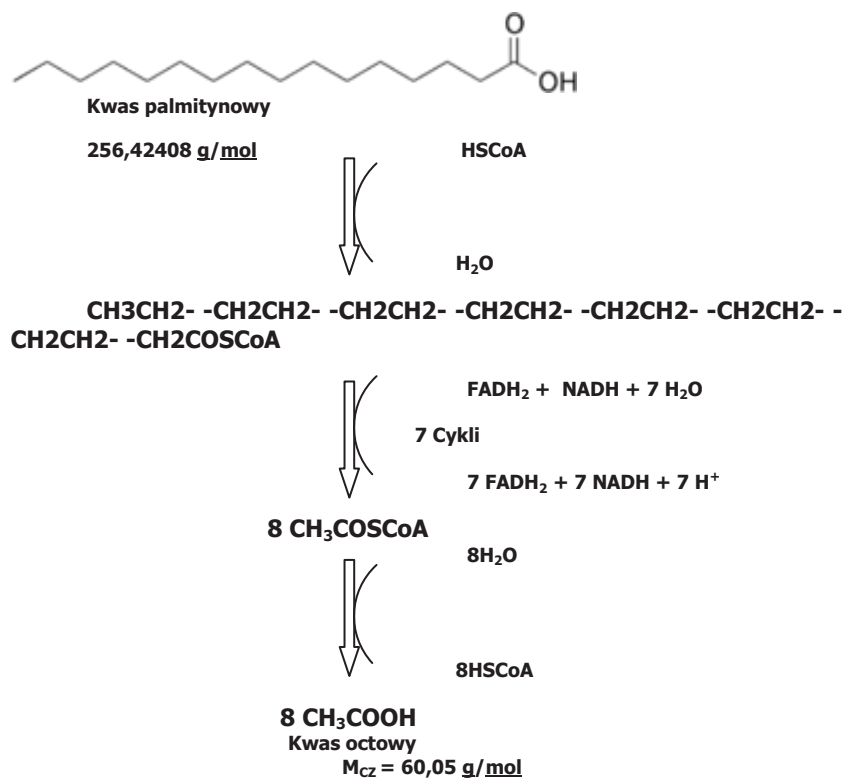
niewielka ilość związków aromatycznych, CO_2 , H_2 oraz zredukowana siarka. Na podstawie danych dotyczących udziału poszczególnych aminokwasów w budowie białka stanowiącego substrat możliwe jest przewidzenie przybliżonego składu mieszaniny kwasów powstałych w wyniku degradacji aminokwasów.

Zastosowanie szlaku Sticklanda w modelu ADM1 uzasadnia się następująco:

- proces ten dominuje w większości instalacji fermentacyjnych,
- szlak ten nie podlega inhibicji przez duże stężenie wodoru cząsteczkowego,
- możliwe jest oszacowanie produktów na podstawie znajomości składu substratu.

2.3.4. Acetogeneza - utlenianie kwasów organicznych przez organizmy syntroficzne

Ponieważ kwasy organiczne powstałe na skutek hydrolizy tłuszczów, fermentacji cukrów oraz przemian aminokwasów (poza kwasem octowym) nie mogą być włączone do szlaku metabolicznego syntezy metanu, muszą ulec dalszym przekształceniom. Kwasy organiczne o parzystej liczbie węgla podlegają procesowi β -oksydacji, w wyniku którego powstaje kwas octowy - S_{ac} . Nadmiarowe elektrony są wykorzystywane przez bakterie do tworzenia wodoru cząsteczkowego - S_{H_2} lub kwasu mrówkowego (nie uwzględniony w modelu ADM1). Ponieważ proces utleniania kwasów organicznych jest termodynamicznie niekorzystny (w stanie równowagi dominującą formą są substraty), może on zachodzić jedynie przy niskim stężeniu wodoru i/lub kwasu mrówkowego, które są produktami tej reakcji. Schemat na rysunku 2 przedstawia proces utleniania kwasu palmitynowego w szlaku β -oksydacji.



Rysunek 2. Schemat rozkładu kwasu palmitynowego w szlaku β-oksydacji.

Ponieważ reakcja utleniania kwasów organicznych w środowisku beztlenowym jest mocno hamowana przez jej produkty (kwas octowy i wodór), organizmy utylizujące kwasy organiczne muszą działać w ścisłej współpracy z mikroorganizmami metanogennymi, które do produkcji metanu zużywają zarówno kwas octowy, jak i wodór.

Model ADM1 zawiera równania kinetyczne dla następujących związków utylizowanych na drodze utleniania: kwasu propionowego, kwasu masłowego, kwasu walerianowego oraz długołańcuchowych kwasów tłuszczowych. Podobnie jak w przypadku kwasogenezy, do opisu matematycznego wykorzystano równanie Monoda. Czynniki hamujące proces utleniania kwasów organicznych są: obecność wodoru cząsteczkowego, niedobór azotu oraz niewłaściwy odczyn środowiska (współczynniki inhibicji I_{Nlim} , I_{pH} , I_{h_2} - Tabela 2).

2.3.5. Metanogeneza

Metanogeneza jest procesem wytwarzania metanu przez archeony ze związków organicznych (kwas octowy - S_{ac} , związki jednowęgłowe) lub nieorganicznych

(ditlenek węgla - S_{IC} , wodór - S_{H_2}). Ocenia się, że do 70% metanu powstającego w wyniku rozkładu materii organicznej w bioreaktorach jest wynikiem rozszczepienia cząsteczki kwasu octowego (metanogeneza acetoklastyczna), a pozostały metan produkowany jest na skutek redukcji ditlenku węgla wodorem (Garcia, Patel et al. 2000).

Archeony metanogenne są w stanie prowadzić również redukcję organicznych związków jednowęglowych takich jak metanol, metyloamina, aldehyd mrówkowy, jednakże tych reakcji nie uwzględniono w modelu kinetycznym ADM1 ze względu na rosnący stopień skomplikowania modelu, a także ich niskim wkładem w produkcję metanu w warunkach przemysłowych.

Metanogeneza będąca wynikiem redukcji ditlenku węgla w modelu jest opisywana równaniem uwzględniającym tylko jedną grupę mikroorganizmów. Dodatkowo założono, że na proces ten może mieć negatywny wpływ jedynie obniżone pH oraz niedostateczna ilość azotu nieorganicznego (współczynniki inhibicji odpowiednio I_{Nlim} i I_{pH} - tabela 2).

Metanogeneza acetoklastyczna może być prowadzona przez mikroorganizmy należące do dwóch grup: *Methanosarcina* lub *Methanosaeta*. Archeony z grupy *Methanosarcina* wymagają wyższych stężeń kwasu octowego, charakteryzują się wyższą szybkością przetwarzania substratu oraz niższą wrażliwością na obniżone pH w porównaniu z *Methanosaeta*. Ponieważ różnice w wymaganiach co do stężenia kwasu octowego w otoczeniu są znaczne, w zależności od tego stężenia dominować będzie jedna z grup archeonów acetoklastycznych. Stężeniem granicznym kwasu octowego dla bakterii acetoklastycznych jest 10^{-3} M. Poniżej tej wartości dominują *Methanosaeta*, natomiast przy stężeniach wyższych przeważają *Methanosarcina* (Sekiguchi, Kamagata et al. 1999).

Model ADM1 uwzględnia tylko jedną grupę mikroorganizmów acetoklastycznych. Charakterystyczne dla tej grupy współczynniki powinny być uzależnione od tego, która z grup bakterii acetoklastycznych dominuje w danym systemie. Równanie opisujące zużywanie kwasu octowego uwzględnia hamujący wpływ następujących czynników: niskiego pH (I_{pH}), dostępności azotu (I_{Nlim}) oraz stężenia toksycznego amoniaku ($I_{NH_3,ac}$).

2.3.6. Obieg azotu w modelu ADM1

Azot w środowisku beztlenowym pełni bardzo ważne funkcje. Po pierwsze jest składnikiem budulcowym mikroorganizmów, dlatego też wydajność procesu metanogenezy będzie obniżona przy zbyt niskim stężeniu tego pierwiastka. Przyjmuje się, że optymalna proporcja między zawartością węgla i azotu w pożywce powinna wynosić od 1:10 do 1:30. W Tabeli 1 zebrano przykładowe stosunki zawartości węgla i azotu w substratach stosowanych w biogazowniach. Jony amonowe pełnią również rolę buforu w reaktorach beztlenowych, dzięki czemu możliwe

jest uzyskanie wyższych stężeń kwasów organicznych będących półproduktami w procesie metanogenezy, co podnosi szybkość procesu. Przyjmuje się, że stężenie jonów amonowych optymalne dla prowadzenia procesu fermentacji metanowej zawiera się między 100 a 1500 mg/L. Górna granica tolerancji dla jonów amonowych może być jednak znacznie wyższa w przypadku kultur, które uległy adaptacji do wysokich stężeń jonów amonowych (Schattauer and Weiland 2005).

Tabela 1. Stosunek zawartości węgla do azotu w wybranych substratach biogazowych*

Substrat	Stosunek C:N
Gnojowica krowia	10-30
Pomiot kurzy	5-15
Gnojowica wieprzowa	10-20
Siano	32
Odpady rybne	2,5-5,5
Odpady rzeźnicze	2-4
Słoma	100-150

*) na podstawie <http://www.norganics.com/applications/cnratio.pdf>

Pierwotna wersja modelu ADM1 uwzględniała azot jedynie w formie amonowej. Azot do reaktora mógł być wprowadzony jako sole amonowe (S_{IN}) w pożywce lub jako część materii organicznej w postaci białek (X_{pr}). Po przekształceniu białek do mieszanki kwasów organicznych azot jest uwalniany w postaci jonów amonowych. Dodatkowo model ADM1 uwzględnia pobieranie azotu z podłoża przez rosnące bakterie (X_{su} , X_{aa} , X_{fa} , X_{c4} , X_{pro} , X_{ac} , X_{h2}). Azot w formie amonowej ma również wpływ na równowagę kwasowo zasadową w reaktorze (Tabela 6) oraz stałe inhibicji procesów pobierania substratów na skutek jego niedoboru. Amoniak wpływa hamująco na proces pobierania kwasu octowego; stałe inhibicji tego procesu wynoszą od 2 do 10 mM (Batstone 2002).

Model ADM1 nie uwzględnia procesów redukcji azotanów do formy amonowej, co jest dokładniej opisane w rozdziale „Modyfikacje obiegu azotu”.

2.3.7. Modelowanie inhibicji procesów biochemicznych w modelu ADM1

Reakcje biochemiczne uwzględnione w modelu AMD1 mogą być hamowane na skutek działania następujących czynników:

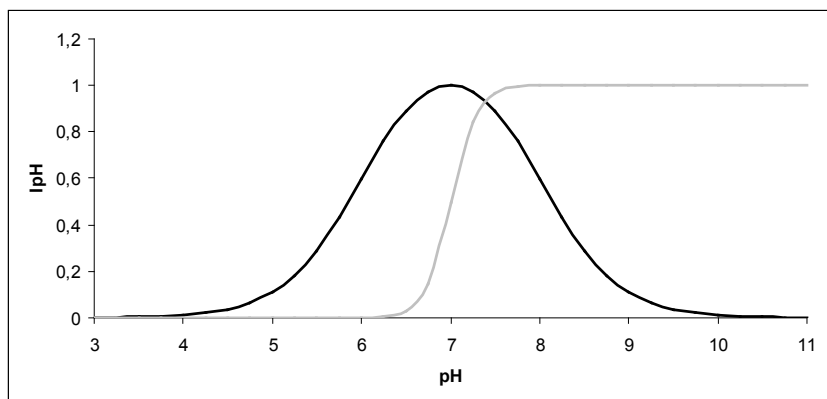
- obecności wolnego amoniaku,
- niedoboru azotu w podłożu,
- nadmiaru wodoru,
- nieodpowiedniego odczynu środowiska,
- obecności alternatywnego substratu.

Do opisu matematycznego inhibicji wywołanej obecnością amoniaku i nadmiarem wodoru wykorzystano równanie opisujące inhibicję niekompetycyjną (Tabela 2). W modelu obecność amoniaku wpływa hamująco na proces rozkładania kwasu octowego, natomiast nadmiar wodoru powoduje zahamowanie procesów utleniania kwasów tłuszczowych i VFA.

Niedobór azotu wpływa hamująco na wzrost mikroorganizmów, co z kolei hamuje procesy, w których model uwzględnia obecność bakterii. Do opisu matematycznego tego zjawiska przyjęto równanie Monoda, opisujące wykorzystanie dodatkowego substratu (proces ten nie jest inhibicją w dosłownym znaczeniu tego terminu).

Obniżenie szybkości procesów biochemicznych na skutek niewłaściwego odczynu środowiska jest wypadkową działania kilku mechanizmów prowadzących do zaburzenia homeostazy komórek, dlatego do opisu matematycznego tego zjawiska nie da się zastosować klasycznych równań opisujących proces inhibicji. Odpowiednie równanie pozwalające obliczyć współczynnik inhibicji w zależności od pH roztworu przedstawiono w Tabeli 2. Równanie to obejmuje dwie wartości krytyczne, pomiędzy którymi proces zachodzi wydajnie. Wartości te powinny być określone indywidualnie dla każdej z grupy mikroorganizmów. Wartość, jaką przybiera współczynnik inhibicji w zależności od pH środowiska można odczytać z wykresu na rysunek 3. Model ten nadaje się do symulacji fermentacji w systemach dobrze zbuforowanych (np. zawierających wysoki poziom amoniaku), gdzie możliwa jest inhibicja na skutek zbyt wysokiego pH.

Do symulacji inhibicji w środowisku słabo buforowanym, gdzie prawdopodobne jest jedynie zahamowanie procesu fermentacji metanowej, z powodu zbyt niskiego pH lepiej sprawdza się równanie zastosowane przez Lübkena (Lubken, Wichern et al. 2007) (Tabela 2). Równanie wymaga podania dwóch wartości granicznych, jednakże służą one do określenia stopnia nachylenia krzywej inhibicji (Rysunek 3). Podobnie jak w przypadku inhibicji dwustronnej, we wzorze proponowanym przez Lübkena wymagane jest określenie indywidualnych wartości granicznych dla poszczególnych grup mikroorganizmów. Sugerowane wartości graniczne inhibicji pH dla poszczególnych grup mikroorganizmów można znaleźć w Tabeli 7.



Rysunek 3. Wartość współczynnika inhibicji I_{pH} w zależności od wartości pH. Linia czarna – inhibicja dwustronna (Angelidaki, Alves et al. 2006), linia szara – inhibicja jednostronna (Lubken, Wichern et al. 2007). Dla obu funkcji przyjęte wartości graniczne to 6 i 8.

Tabela 2. Równania inhibicji procesów biochemicznych

Rodzaj inhibicji	Wzór	Opisywany proces	Stałe inhibicji
Inhibicja niekompetycyjna	$I = \frac{1}{1 + S_I / K_I}$	Inhibicja spowodowana NH_3 i H_2	$I_{NH_3, Xac}$ I_{h_2}
Dodatkowy substrat	$I = \frac{1}{1 + K_I / S_I}$	Inhibicja spowodowana niedoborem azotu	$I_{NI, lim}$
Inhibicja pH „dwustronna”	$I = \frac{1 + 2 \times 10^{0,5(pH_{Hll} - pH_{Hul})}}{1 + 10^{(pH - pH_{Hul})} + 10^{(pH_{Hll} - pH)}}$	Inhibicja wynikająca z odczynu środowiska	I_{pH}
Inhibicja pH „jednostronna”	$I = 1 - \frac{((pH_{ul} + pH_{ll})/2)^{pH_{ul}pH_{ll}}}{((pH_{ul} + pH_{ll})/2)^{pH_{ul}pH_{ll}} + pH^{pH_{ul}pH_{ll}}}$	Inhibicja wynikająca z odczynu środowiska	I_{pH}
K_I - stała inhibicji, S_I - stężenie inhibitora, pH_{ll} - dolna wartość progowa pH, pH_{ul} - wartość progowa pH			

Skróty i symbole używane przy opisie modelu

c	-	Kompozyt
ch	-	Węglowodany (wielocukry: skrobia, glikogen, celuloza, hemiceluloza)
c4	-	Węgiel
pr	-	Białka
li	-	Tłuszcze
su	-	Cukry
aa	-	Aminokwasy
fa	-	Wyższe kwasy tłuszczowe
va	-	Waleriany
bu	-	Maślany
pro	-	Propioniany
ac	-	Octany
h2	-	Wodór
ch4	-	Metan
IC	-	Węgiel nieorganiczny
cat	-	Kationy
an	-	Aniony
X	-	Stężenie komponentu rozdrobnionego
Y_s	-	Wynik procesu na substracie s
$f_{i,j}$	-	Wynik procesu (katabolizmu) produktu i na substracie j
S	-	Stężenie komponentu rozpuszczonego

Tabela 3. Biochemiczne współczynniki i równania kinetyki procesów p_i komponentów rozpuszczalnych

Komp	$\rightarrow$	i	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Sztywność ρ_3 kg COD m ⁻³ d ⁻¹
1	↓ Proces Dezintegracja		S_{a0}	S_{a0}	S_{b0}	S_{a0}	S_{b0}	S_{pro}	S_{se}	S_{b2}	S_{b24}	S_{ic}	S_N	S_i	$k_{d0} X_c$
2	Hydroлиза węglowodanów	1													$k_{hyd,chw} X_{ch}$
3	Hydroлиза białek		1												$k_{hyd,pb} X_{pr}$
4	Hydroлиза tłuszczu	$1-f_{d,h}$													$k_{hyd,l} X_l$
5	Pobór cukrów	-1					$(1-Y_{a0})f_{b,ca0}$	$(1-X_{a0})f_{p,ca0}$	$(1-Y_{a0})f_{b,ca0}$	$(1-Y_{a0})f_{b,2,ca0}$		$-\sum_{i=1}^{C_{b,1,24}} \frac{C_{b,1,24}}{i+1}$	$-(Y_{a0})N_{buc}$		$k_{m,ba} \frac{S_{ba}}{K_{S,ba} + S_{ba}} X_{ba} I_1$
6	Pobór aminokwasów			-1		$(1-Y_{a0})f_{b,ca0}$	$(1-Y_{a0})f_{b,ca0}$	$(1-X_{a0})f_{p,ca0}$	$(1-Y_{a0})f_{b,ca0}$	$(1-Y_{a0})f_{b,2,ca0}$		$-\sum_{i=1}^{C_{b,1,24}} \frac{C_{b,1,24}}{i+1}$	N_{ba}^* $(Y_{a0})N_{buc}$		$k_{m,aa} \frac{S_{aa}}{K_{S,aa} + S_{aa}} X_{aa} I_1$
7	Pobór kwasów tłuszczowych				-1				$(1-Y_{a0})0,7$	$(1-Y_{a0})0,3$			$-(Y_{a0})N_{buc}$		$k_{m,fa} \frac{S_{fa}}{K_{S,fa} + S_{fa}} X_{fa} I_2$
8	Pobór kwasu walerianowego					-1		$(1-Y_{a0})0,54$	$(1-Y_{a0})0,31$	$(1-Y_{a0})0,15$			$-(Y_{a0})N_{buc}$		$k_{m,va} \frac{S_{va}}{K_{S,va} + S_{va}} X_{va} \frac{1}{1 + S_{ba}/S_{va}} I_2$
9	Pobór kwasu masłowego						-1		$(1-Y_{a0})0,8$	$(1-Y_{a0})0,2$			$-(Y_{a0})N_{buc}$		$k_{m,bu} \frac{S_{bu}}{K_{S,bu} + S_{bu}} X_{bu} \frac{1}{1 + S_{ba}/S_{bu}} I_2$
10	Pobór kwasu propionowego							-1	$(1-Y_{pro})0,57$	$(1-Y_{pro})0,43$		$-\sum_{i=1}^{C_{b,1,24}} \frac{C_{b,1,24}}{i+1}$	$-(Y_{pro})N_{buc}$		$k_{m,pr} \frac{S_{pr}}{K_{S,pr} + S_{pr}} X_{pr} I_2$
11	Pobór kwasu octowego								-1		$(1-Y_{oa})$	$-\sum_{i=1}^{C_{b,1,24}} \frac{C_{b,1,24}}{i+1}$	$-(Y_{oa})N_{buc}$		$k_{m,oa} \frac{S_{oa}}{K_{S,oa} + S_{oa}} X_{oa} I_2$
12	Pobór wodoru									-1	$(1-Y_{h2})$	$-\sum_{i=1}^{C_{b,1,24}} \frac{C_{b,1,24}}{i+1}$	$-(Y_{h2})N_{buc}$		$k_{m,h2} \frac{S_{h2}}{K_{S,h2} + S_{h2}} X_{h2} I_1$
13	Rozkład X_{su}														$k_{d0c, Xsu} X_{su}$
14	Rozkład X_{an}														$k_{d0c, Xan} X_{an}$
15	Rozkład X_{fa}														$k_{d0c, Xfa} X_{fa}$
16	Rozkład X_{c4}														$k_{d0c, Xc4} X_{c4}$
17	Rozkład X_{pro}														$k_{d0c, Xpro} X_{pro}$
18	Rozkład X_{se}														$k_{d0c, Xse} X_{se}$
19	Rozkład X_{h2}														$k_{d0c, Xh2} X_{h2}$
			Monosacharydy (kgCODm ⁻³)	Aminokwasy (kgCODm ⁻³)	Wysze kwasy tłuszczowe (kgCODm ⁻³)	Waleriany razem (kgCODm ⁻³)	Masłany razem (kgCODm ⁻³)	Propioniany razem (kgCODm ⁻³)	Octany razem (kgCODm ⁻³)	Wodór gaz (kgCODm ⁻³)	Metan gaz (kgCODm ⁻³)	Węgiel nieorganiczny (kgCODm ⁻³)	Azot nieorganiczny (kgCODm ⁻³)	Rozpuszczalne odpady (kgCODm ⁻³)	Czynniki hamujące: $I_1 = I_{pH} I_{N_{buc}} I_{N_{pro}}$ $I_2 = I_{pH} I_{N_{buc}} I_{N_{h2}}$ $I_3 = I_{pH} I_{N_{buc}} I_{N_{h2}} I_{N_{se}}$

Tabela 6. Równania opisujące proces transferu gazów między fazą wodną i gazową

Komponent →		i	8	9	10	Tempo
j	↓ Proces		S_{H_2}	S_{CH_4}	S_{IC}	
T8	Transfer H_2		-1			$K_L a (S_{liq,H_2} - 16 K_{H,H_2} p_{gas,H_2})$
T9	Transfer CH_4			-1		$K_L a (S_{liq,CH_4} - 16 K_{H,CH_4} p_{gas,CH_4})$
T10	Transfer CO_2				-1	$K_L a (S_{liq,CO_2} - 16 K_{H,CO_2} p_{gas,CO_2})$

Tabela 7. Wartości współczynników dla równań kinetycznych przemian procesów biologicznych

Współczynnik	Wartość	Opis	Jednostka
pHUL_a	5,5	górna wartość pH krytyczna dla procesów 5-10	pH
pHLL_a	4	dolna wartość pH krytyczna dla procesów 5-10	pH
km_su	0,5	stała szybkości poboru cukrów	1/d
KS_su	5,5	stała substratowa dla poboru cukrów	kg COD/m3
km_aa	50	stała szybkości poboru aminokwasów	1/d
KS_aa	0,3	stała substratowa dla poboru aminokwasów	kg COD/m3
km_fa	6	stała szybkości poboru kwasów tłuszczowych	1/d
KS_fa	0,4	stała substratowa dla poboru kwasów tłuszczowych	kg COD/m3
KI_H2_fa	5,00E-06	stała inhibicji pobierania kwasów tłuszczowych wodorem	kg COD/m3
km_c4	20	stała szybkości poboru kwasów C4	1/d
KS_c4	0,2	stała substratowa dla poboru kwasów C4	kg COD/m3
KI_H2_c4	1,00E-05	stała inhibicji pobierania kwasów c4 wodorem	kg COD/m3
km_pro	13	stała szybkości poboru kwasu propionowego	1/d
KS_pro	0,1	stała substratowa dla poboru kwasu propionowego	kg COD/m3
KI_H2_pro	3,50E-06	stała inhibicji pobierania kwasu propionowego wodorem	kg COD/m3
km_ac	8	stała szybkości poboru kwasu octowego	1/d
KS_ac	0,15	stała substratowa dla poboru kwasu octowego	kg COD/m3
KI_NH3	0,0018	stała inhibicji wolnym amoniakiem	k mole N/m3
pHUL_ac	7	górny limit pH dla pobierania kwasu octowego	pH
pHLL_ac	6	dolny limit pH dla pobierania kwasu octowego	pH
km_h2	35	stała szybkości poboru wodoru	1/d
KS_h2	7,00E-06	stała substratowa dla poboru wodoru	kg COD/m3
pHUL_h2	6	górny limit pH dla pobierania wodoru	pH
pHLL_h2	5	dolny limit pH dla pobierania wodoru	pH
KS_IN	1,00E-04	stała substratowa dla pobierania azotu nieorganicznego	k mole N/m3

Tabela 8. Wartości stałych dla procesów rozpadu substratu i mikroorganizmów oraz stałych hydrolizy

Współczynnik	Wartość	Opis	Jednostka
kdis	0,5	stała dezintegracji	1/d
khyd_ch	10	stała hydrolizy węglowodanów	1/d
khyd_pr	10	stała hydrolizy białek	1/d
khyd_li	10	stała hydrolizy lipidów	1/d
kdec_Xsu	0,02	stała obumierania bakterii rozkładających cukry	1/d
kdec_Xaa	0,02	stała obumierania bakterii rozkładających aminokwasy	1/d
kdec_Xfa	0,02	stała obumierania bakterii rozkładających kwasy tłuszczowe	1/d
kdec_Xc4	0,02	stała obumierania bakterii rozkładających kwasy C4	1/d
kdec_Xpro	0,02	stała obumierania bakterii rozkładających kwas propionowy	1/d
kdec_Xac	0,02	stała obumierania bakterii rozkładających kwas octowy	1/d
kdec_Xh2	0,02	stała obumierania bakterii rozkładających wodór	1/d

Tabela 9. Stałe dla równań procesów fizykochemicznych.

Współczynnik	Wartość	Opis	Jednostka
Kw	2,08E-14	stała dysocjacji wody	k mole /m ³
Kava	1,38E-05	stała dysocjacji kwasu walerianowego	
Kabu	1,51E-05	stała dysocjacji kwasu masłowego	
Kapro	1,32E-05	stała dysocjacji kwasu propionowego	
Kaac	1,74E-05	stała dysocjacji kwasu octowego	
Kaco2	4,94E-07	stała dysocjacji kwasu węglowego	
Kain	1,11E-09	stała dysocjacji amoniaku	
kA_Bva	1,00E+08	szybkość dysocjacji kwasu walerianowego	
kA_Bbu	1,00E+08	szybkość dysocjacji kwasu masłowego	
kA_Bpro	1,00E+08	szybkość dysocjacji kwasu propionowego	
kA_Bac	1,00E+08	szybkość dysocjacji kwasu octowego	k mole/d
kA_Bco2	1,00E+08	szybkość dysocjacji kwasu węglowego	k mole/d
kA_Bin	1,00E+08	szybkość dysocjacji amoniaku	k mole/d
RT	0,08314*(T+237,15)	stała gazowa pomnożona przez temperaturę	bar m ³ /k mol
Ptot	1,013	ciśnienie całkowite	Bar
Ph2o	0,0557	ciśnienie pary wodnej	Bar
klaH2	200	współczynnik transferu masy wodoru	1/d
klaCH4	200	współczynnik transferu masy metanu	1/d
klaCO2	200	współczynnik transferu masy CO2	1/d
KH_CO2	0,0271	stała Henry'ego dla CO2	mol/(bar m ³)
KH_CH4	0,00116	stała Henry'ego dla metanu	mol/(bar m ³)
KH_H2	7,38E-04	stała Henry'ego dla wodoru	mol/(bar m ³)
Vl_Vg	14	stosunek objętości cieczy do gazu	

Tabela 10. Współczynniki stechiometryczne dla równań procesów biochemicznych.

Współczynnik	Wartość	Opis
$fH2_FA$	0,3	przyrost wodoru z rozkładu kwasów tłuszczowych
fAC_FA	$1,0-fH2_FA$	przyrost kwasu octowego z rozkładu kwasów tłuszczowych
$fCO2_FA$	$C_Sfa-fAC_FA*C_Sac*(1-Yfa)-$	przyrost CO ₂ z rozkładu kwasów tłuszczowych
Yfa	0,06	przyrost biomasy bakterii rozkładających kwasy tłuszczowe
$fH2_VA$	0,15	przyrost wodoru z rozkładu kwasu walerianowego
$fPRO_VA$	0,54	przyrost kwasu propionowego z rozkładu kwasu walerianowego
fAC_VA	$1-fPRO_VA-fH2_VA$	przyrost kwasu octowego z rozkładu kwasu walerianowego
$fCO2_VA$	$C_Sva-(fPRO_VA*C_Spro +$ $fAC_VA*C_Sac)*(1-Yc4) - Yc4*C_XB$	przyrost CO ₂ z rozkładu kwasu walerianowego
$fH2_BU$	0,2	przyrost wodoru z rozkładu kwasu masłowego
fAC_BU	$1-fH2_BU$	przyrost kwasu octowego z rozkładu kwasu masłowego
$fCO2_BU$	$C_Sbu-fAC_BU*C_Sac*(1-Yc4)-$	przyrost CO ₂ z rozkładu kwasu masłowego
$Yc4$	0,06	przyrost biomasy bakterii rozkładających kwasy C ₄
$fH2_PRO$	0,43	przyrost wodoru z rozkładu kwasu propionowego
fAC_PRO	$1-fH2_PRO$	przyrost kwasu octowego z rozkładu kwasu propionowego
$fCO2_PRO$	$C_Spro-fAC_PRO*C_Sac*(1-Ypro)-$	przyrost CO ₂ z rozkładu kwasu propionowego
$Ypro$	0,04	przyrost biomasy bakterii rozkładających kwas propionowy
$fCO2_AC$	$C_Sac-(1-Yac)*C_Sch4-Yac*C_XB$	przyrost CO ₂ z rozkładu kwasu propionowego
Yac	0,05	przyrost biomasy bakterii rozkładających kwas octowy
$fCO2_H2$	$-1*(1-Yh2)*C_Sch4-Yh2*C_XB$	przyrost H ₂ na skutek redukcji CO ₂ do CH ₄
$Yh2$	0,06	przyrost biomasy bakterii redukujących CO ₂

Tabela 11. Współczynniki stechiometryczne dla równań procesów biochemicznych.

Współczynnik	Wartość	Opis
fSI_XC	0,1	zawartość substancji inertnych rozpuszczalnych w substracie stałym
fXI_XC	0,2	zawartość substancji inertnych nierozpuszczalnych w substracie stałym
fCH_XC	0,2	zawartość węglowodanów w substracie stałym
fPR_XC	0,2	zawartość białek w substracie stałym
fLI_XC	0,3	zawartość lipidów w substracie stałym
fCO2_XC	$C_Xc - fSI_XC * C_SI - fCH_XC * C_Xch - fPR_XC * C_Xpr - fLI_XC * C_Xli - fXI_XC * C_XI$	zawartość CO2 w substracie stałym
fSIN_XC	$N_Xc - fSI_XC * N_I - fPR_XC * N_aa - fXI_XC * N_I$	zawartość azotu amonowego w substracie stałym
fFA_Xli	0,95	zawartość kwasów tłuszczowych w lipidach
fCO2_Xli	$C_Xli - fFA_Xli * C_Sfa - (1 - fFA_Xli) * C_Xch$	zawartość CO2 w lipidach
fH2_SU	0,19	przyrost wodoru z rozkładu cukrów
fBU_SU	0,13	przyrost kwasu masłowego z rozkładu cukrów
fPRO_SU	0,27	przyrost kwasu propionowego z rozkładu cukrów
fAC_SU	0,41	przyrost kwasu octowego z rozkładu cukrów
fCO2_SU	$C_Xch - (fBU_SU * C_Sbu + fPRO_SU * C_Spro + fAC_SU * C_Sac) * (1 - Ysu) - Ysu * C_XB$	przyrost CO2 z rozkładu cukrów
Ysu	0,1	przyrost biomasy bakterii rozkładających cukry
fH2_AA	0,06	przyrost wodoru z rozkładu aminokwasów
fVA_AA	0,23	przyrost kwasu walerianowego z rozkładu aminokwasów
fBU_AA	0,26	przyrost kwasu masłowego z rozkładu aminokwasów
fPRO_AA	0,05	przyrost kwasu propionowego z rozkładu aminokwasów
fAC_AA	0,4	przyrost kwasu octowego z rozkładu aminokwasów
fCO2_AA	$C_Xpr - (fVA_AA * C_Sva + fBU_AA * C_Sbu + fPRO_AA * C_Spro + fAC_AA * C_Sac) * (1 - Yaa) - Yaa * C_XB$	przyrost CO2 z rozkładu aminokwasów
Yaa	0,08	przyrost biomasy bakterii rozkładających aminokwasy

Tabela 12. Zawartość węgla i azoty w komponentach.

Współczynnik	Wartość	Opis	Jednostka
C_Xc	0,03	Zawartość węgla w substracie stałym	k mol C/ kg COD
C_SI	0,03	Zawartość węgla w substancjach inertnych rozpuszczalnych	k mol C/ kg COD
C_XI	0,03	Zawartość węgla w substancjach inertnych nierozpuszczalnych	k mol C/ kg COD
C_Xch	0,0313	Zawartość węgla w węglowodanach	k mol C/ kg COD
C_Xpr	0,03	Zawartość węgla w białkach	k mol C/ kg COD
C_Xli	0,022	Zawartość węgla w lipidach	k mol C/ kg COD
C_su	0,313	Zawartość węgla w cukrach prostych	k mol C/ kg COD
C_aa	0,03	Zawartość węgla w aminokwasach	k mol C/ kg COD
C_Sfa	0,0217	Zawartość węgla w kwasach tłuszczowych	k mol C/ kg COD
C_Sva	0,024	Zawartość węgla w kwasie walerianowym	k mol C/ kg COD
C_Sbu	0,025	Zawartość węgla w kwasie masłowym	k mol C/ kg COD
C_Spro	0,0268	Zawartość węgla w kwasie propionowym	k mol C/ kg COD
C_Sac	0,0313	Zawartość węgla w kwasie octowym	k mol C/ kg COD
C_XB	0,0313	Zawartość węgla w biomacie bakteryjnej	k mol C/ kg COD
C_Sch4	0,0156	Zawartość węgla w metanie	k mol C/ kg COD
N_Xc	0,0376/14	Zawartość azotu w substracie stałym	k mol N/ kg COD
N_I	0,06/14	Zawartość azotu w substancjach inertnych	k mol N/ kg COD
N_aa	0,007	Zawartość azotu w aminokwasach	k mol N/ kg COD
N_XB	0,08/14	Zawartość azotu w biomacie bakteryjnej	k mol N/ kg COD

2.3.8. Sposób korzystania z tabeli równań.

Równania stosowane w ADM1 zebrano w systemie tabel (tabele 2-5). Miało to na celu uwidocznienie związków pomiędzy procesami zachodzącymi w środowisku reakcji a poszczególnymi składnikami (komponentami) systemu. Przepływ masy dla każdego z komponentów można w skrócie opisać poniższym równaniem:

$$\text{Akumulacja} = \text{Napływ} - \text{Upływ} + \text{Reakcje}$$

Napływ danego komponentu wynika z jego zawartości w strumieniu substratów dostarczanych do reaktora, analogicznie upływ wynika z szybkości usuwania cieczy z reaktora. Szybkość reakcji wpływającej na dany komponent jest wypadkową procesów zachodzących w reaktorze (hydroliza, wzrost bakterii itp.). Górny wiersz tabel zawierających równania kinetyczne prezentuje listę komponentów, jakie obejmuje model. Kolumna po lewej zawiera spis procesów zachodzących w środowisku reaktora, natomiast ostatnia kolumna po prawej zawiera równania opisujące szybkość zachodzenia danego procesu (ρ_j). Liczby znajdujące się komórkach w środkowej części tabeli są to współczynniki stechiometryczne opisujące jak duży wpływ na dany komponent ma określony proces.

Aby określić ogólny współczynnik reakcji dla danego komponentu, należy zsumować iloczyny współczynników stechiometrycznych i szybkości reakcji dla procesów, które wpływają na dany komponent. Dla stężenia cukrów w podłożu wzór określający całkowity współczynnik reakcji będzie wyglądał następująco:

$$r_{Sch} = 1K_{hyd,ch}X_{ch} + (1 - f_{fa,li})K_{hyd,li}X_{li} - 1k_{m,su} \frac{S_{su}}{K_S + S_{su}} X_{su} I_1 \quad (2.5)$$

$1K_{hyd,su}X_{ch}$ – przyrost ilości cukrów wynikający z hydrolizy węglowodanów

$(1 - f_{fa,li})K_{hyd,li}X_{li}$ – przyrost ilości gliceryny w wyniku hydrolizy lipidów

$-1k_{m,su} \frac{S_{su}}{K_S + S_{su}} X_{su} I_1$ – ubytek cukrów w wyniku pobierania przez bakterie

Przykładowe stałe dla poszczególnych równań można znaleźć w tabelach od 7 do 12. Stałe te przyjęto dla procesu prowadzonego w temperaturze 37 °C.

Do rozwiązania stworzonego układu równań różniczkowych wymagane jest wykorzystanie odpowiedniego programu komputerowego (solwer). Wśród najczęściej używanych programów służących do rozwiązywania takich układów można wymienić: Matlab/Simulink, Extend (firmy Imagine That Inc.) lub darmowe środowisko programowania Octave, użyte w ramach niniejszego projektu. Dodatkowo niektóre programy służące do symulacji i projektowania instalacji oczyszczania

ścieków posiadają również zaimplementowany model ADM1. Przykładem takiego programu jest SIMBA (ifak system GmbH). Program ten pracuje w środowisku Matlab/Simulink.

Ponieważ procesy odpowiedzialne za utrzymanie równowagi kwasowo zasadowej w roztworach wodnych zachodzą bardzo szybko, zachowanie jonów lepiej opisuje zestaw równań algebraicznych niż równań różniczkowych. Do wykonania symulacji, w której wykorzystywane są jednocześnie równania algebraiczne i różniczkowe, wymagany jest program mogący rozwiązać taki układ. Ponieważ solwery takie są mało popularne, autorzy modelu zdecydowali się na wykorzystanie układu równań różniczkowych.

2.4. ZASTOSOWANIE I MODYFIKACJE ADM1

ADM1 może być bardzo przydatnym narzędziem symulowania zjawisk fermentacji metanowej, jednakże w obecnej formie jego zastosowanie jest utrudnione ze względu na brak jednolitej bazy danych dotyczących poszczególnych substratów oraz mnogość podejść badawczych przy optymalizacji procesu. W poniższym rozdziale opisano zagadnienia i problemy związane z zastosowaniem ADM1 w praktyce.

2.4.1. Wyznaczanie stałych dotyczących rozkładu substratów

Modelowanie fermentacji metanowej substratów rolniczych ułatwiłaby znacznie baza parametrów kinetycznych dla procesów dezintegracji i hydrolizy poszczególnych substratów. Hydroliza i dezintegracja są często etapem limitującym szybkość procesu produkcji metanu z odpadów rolnych, dlatego też wyżej wymienione parametry byłyby pomocne przy projektowaniu instalacji przeznaczonych do fermentacji określonych substratów.

Stworzenie bazy stałych rozkładu na podstawie istniejących doniesień literaturowych jest jednak niemożliwe z uwagi na brak ustandaryzowanej metodologii badawczej wyznaczania tych parametrów. Pomimo istnienia wytycznych dotyczących prowadzenia fermentacji w skali mikro (Angelidaki, Alves et al. 2006), na podstawie której określa się stałe kinetyczne dla fermentacji wybranych substratów, podejście do analizy matematycznej danych nie jest jednolite. Poniżej podano kilka rozwiązań prezentowanych w literaturze naukowej:

- parametrem charakterystycznym dla danego substratu jest jedynie stała dezintegracji i tylko ona podlega optymalizacji, natomiast stałe hydrolizy są przyjęte jednakowe dla wszystkich badanych substancji (Wichern, Lübken et al. 2008);
- frakcja wielocukrów jest podzielona na podfrakcje (celuloza, hemiceluloza, skrobia) różniące się stałymi hydrolizy, które są jednak stałe dla wszystkich

substratów, a parametrem charakterystycznym dla danego substratu podlegającego optymalizacji jest stała dezintegracji;

- wielkościami charakterystycznymi dla substratu są zarówno stałe hydrolizy, jak i dezintegracji (Biernacki, Steinigeweg et al. 2012).

Ponadto dane kinetyczne rozkładu danego substratu są wyznaczane dla wybranego działającego w określonych warunkach reaktora i zastosowanie ich do symulacji innego układu może dawać wyniki symulacji o dużych odchyleniach od procesu rzeczywistego.

2.4.2. Modyfikacje i uogólnienia w ADM1

Kolejnym problemem w stosowaniu modelu ADM1 jest znaczna ilość uogólnień. Model ADM1 był pierwotnie przeznaczony do symulacji fermentacji metanowej osadów ściekowych. Ponieważ w systemach takich rzadko spotyka się problemy związane z niedoborem lub nadmiarem siarki, obecnością siarczanów i azotanów oraz obecnością etanolu i kwasu mlekowego, dla uproszczenia obliczeń nie uwzględniono ich w modelu. Problemy te jednak pojawiają się w określonych sytuacjach podczas fermentacji metanowej, dlatego też zastosowanie oryginalnego modelu nie jest możliwe.

2.4.3. Obieg siarki w ADM1

W środowisku beztlenowym dominuje forma siarki na drugim stopniu utlenienia. Podobnie jak azot, siarka wchodzi w skład biocząsteczek jako część aminokwasów (metionina i cysteina), koenzymów, lub też centrów oksydoredukcyjnych enzymów. Ponieważ kłopoty związane z niedoborem siarki lub jej toksycznością zdarzają się rzadziej niż te związane z azotem, model ADM1 nie obejmuje obiegu siarki. Podobnie jak w przypadku azotanów, siarczany obecne w substracie będą ulegały redukcji i prowadziły do powstania siarczków, co może spowodować obniżenie zawartości metanu w powstającym biogazie. Autorzy modelu ADM1 sugerują, żeby wprowadzić odpowiednie równania, jeżeli używany substrat zawiera znaczne ilości siarczanów. Do substratów zawierających znaczne ilości siarki należą: melasa, odpady przemysłu rybnego oraz odpady przemysłu papierniczego (Hulshoff Pol, Lens et al. 1998).

Związkiem toksycznym dla bakterii jest wolna (uprotionowana) postać siarkowodoru. Ponieważ ujemny logarytm stałej dysocjacji dla siarkowodoru pK_a wynosi 7, oznacza to, że w środowisku obojętnym ($pH=7$) połowa dostępnego siarkowodoru jest w formie zjonizowanej, a stosunek stężenia siarkowodoru do jonów HS^- może łatwo ulec zmianie wraz ze zmianą pH . Forma rozpuszczona siarkowodoru pozostaje jednocześnie w równowadze z siarkowodorem w formie gazowej, przez co część tego związku jest usuwana z reaktora wraz z powstającym

biogazem. Dlatego też toksyczność związków siarki dla mikroorganizmów jest w dużej mierze zależna od środowiska. Przyjmuje się, że stężeniem hamującym proces metanogenezy jest 50 mg/l H_2S (Schattauer and Weiland 2005). Obniżenie ilości toksycznych form siarki jest możliwe dzięki dozowaniu do reaktora niewielkich ilości tlenu, przez co siarczki zostają utlenione do siarki elementarnej (Khanal and Huang 2003; van der Zee, Villaverde et al. 2007).

Ponieważ związki siarki tworzą nierozpuszczalne sole z metalami ciężkimi, zbyt wysoki poziom siarki może prowadzić do ograniczenia dostępności mikroelementów dla mikroorganizmów. Z drugiej jednak strony obecność siarki może zapobiegać toksyczności tych metali (Zayed and Winter 2000).

2.4.4. Modyfikacje obiegu azotu

Materia organiczna zawiera w większości azot na -3 stopniu utlenienia. W środowisku beztlenowym większość azotu uwalniana jest z substratu do roztworu w postaci jonów amonowych. Jeżeli jednak w substracie są obecne azotany, w reaktorach beztlenowych są one redukowane najpierw do azotynów (które mogą być toksyczne dla mikroorganizmów), a następnie do formy amonowej. Zjawisko to wiąże się z wykorzystaniem elektronów, które w innym przypadku mogłyby służyć do redukcji ditlenku węgla. Obecność azotanów w pożywce może zatem prowadzić do obniżenia ilości produkowanego metanu. W przypadku używania substratów zawierających znaczne ilości azotanów, w modelu ADM1 należy uwzględnić dodatkowe równania.

Kolejnym zagadnieniem dotyczącym obiegu azotu w reaktorach beztlenowych jest uwalnianie tego pierwiastka z obumarłej biomasy bakteryjnej. W pierwotnej wersji modelu ADM1 biomasa bakteryjna była włączana do strumienia substratu. Model taki wydawał się adekwatny w przypadku, kiedy substratem dla systemu fermentacyjnego był osad aktywny z oczyszczalni ścieków złożony głównie z mikroorganizmów. Jednakże w biogazowniach rolniczych, w których główną część wsadu stanowi materiał roślinny, materię pochodzącą z biomasy bakteryjnej należy wydzielić ze strumienia substratu z uwagi na inne stałe kinetyczne procesów jej rozkładu (dezintegracji i hydrolizy). Odpowiednie równania matematyczne zostały zaproponowane w pracy Wetta i współpracowników (Wett 2006). W modyfikacji modelu zaproponowanej przez Wetta biomasa pochodząca z obumarłych komórek jest dzielona na następujące składniki: azot nieorganiczny (NH_4^+), cukry, lipidy, białko oraz substancje nierozkładalne z uwzględnieniem odpowiednich stałych kinetycznych. Frakcja nierozkładalna zawiera wyższą ilość azotu w porównaniu z analogiczną frakcją powstającą z rozkładu substratów.

Wyżej opisana modyfikacja modelu ADM1 w istotny sposób poprawiła przewidywane ilości azotu nieorganicznego w środowisku fermentacyjnym. Wiąże się to z lepszym prognozowaniem równowagi kwasowo zasadowej w trakcie

fermentacji. Równowaga ta ma wpływ na stałe inhibicji procesu metanogenezy związane z pH, dostępnością azotu nieorganicznego oraz obecnością wolnego amoniaku (Batstone 2002).

2.4.5. Mikroorganizmy w ADM1

Kolejnym ważnym zagadnieniem związanym z praktycznym zastosowaniem ADM1 jest ocena ilości mikroorganizmów należących do poszczególnych grup wyszczególnionych w modelu ADM1. Dostępnych jest jedynie kilka prac, w których podjęto próbę integracji wyników badań populacji mikroorganizmów z ADM1.

W pracy Lübkena i współpracowników użyto techniki hybrydyzacji fluorescencyjnej *in situ* (FISH) do określenia ilości i składu gatunkowego bakterii trafiających do reaktora z gnojowicą oraz rozwoju populacji bakterii w reaktorze (Lubken, Wichern et al. 2007). Do określenia ilości bakterii napływających do reaktora na podstawie obserwacji mikroskopowych przyjęto wzór:

$$X_{\text{bacteria}} = Q_{\text{in}} N_{\text{cells}} f_{\text{bac}} m_{\text{cell}} i_{\text{COD/Xbac}} 10^{-3} \text{ [kgCOD/d]} \quad (2.6)$$

X_{bacteria} - całkowita ilość bakterii, złożona z następujących frakcji X_{su} , X_{aa} , X_{fa} , X_{c4} , X_{pro}

Q_{in} - dzienne obciążenie [kg/d]

N_{cell} - całkowita ilość komórek na jednostkę objętości ($1,47 \times 10^{10}$ kom./ml)

f_{bac} - procentowy udział bakterii

m_{cell} - masa komórki bakteryjnej (14×10^{-11} mg/kom.)

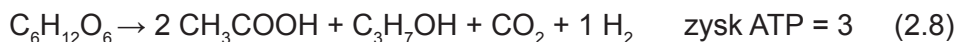
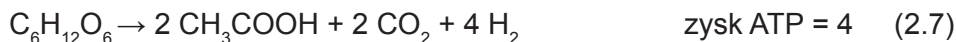
$i_{\text{COD/Xbac}}$ - odpowiednik COD dla biomasy ($1,416 \text{ gCOD/g}_{\text{biomasy}}$)

Analogiczny wzór zastosowano do obliczenia ilości archeonów metanogenych. W wyżej wymienionej pracy badania populacji były jedynie wykorzystywane do określenia ilości bakterii w substracie, natomiast nie podjęto próby modelowania zmian populacji mikroorganizmów w samym reaktorze. Nie przeprowadzono również analizy obecności bakterii syntroficznych odpowiedzialnych za utlenianie lotnych kwasów tłuszczowych, które to bakterie są uwzględnione w modelu ADM1 (X_{fa} , X_{c4} i X_{pro}).

Przeprowadzono również porównanie danych dotyczących populacji bakterii acetoklastycznych uzyskanych podczas rozruchu bioreaktora zasilanego gnojowicą z wynikami symulacji z użyciem modelu ADM (Schoen, Sperl et al. 2009). Trendy obserwowane w danych eksperymentalnych pokrywały się ze zmianami populacji symulowanymi przez model, jednakże nie stworzono algorytmu pozwalającego na bezpośrednią konwersję wyników uzyskanych metodą *real time* PRC do jednostek modelu ADM1.

2.4.6. Zastosowanie ADM1 do modelowania procesu produkcji biowodoru

Spośród dostępnych paliw odnawialnych bardzo atrakcyjny jest wodór, gdyż jego spalanie nie prowadzi do powstawania ditlenku węgla, uznawanego za główny czynnik antropogeny odpowiedzialny za zmiany klimatu. Ponadto wodór może być stosowany w mieszaninie z gazem ziemnym do napędzania pojazdów mechanicznych bez potrzeby wprowadzania znacznych zmian w budowie silników.



Jedną z możliwych dróg pozyskania wodoru jest „ciemna fermentacja” (ang. *dark fermentation* - DF) materii organicznej, w wyniku której powstaje wodór, ditlenek węgla oraz mieszanina zredukowanych związków organicznych. Teoretycznie możliwe jest uzyskanie 4 moli wodoru oraz 2 moli kwasu octowego na skutek fermentacji 1 mola heksoz (cukrów zbudowanych z sześciu atomów węgla) (równanie 2.7). W praktyce stosunek ten jest niższy. Ponieważ tworzenie wodoru w postaci cząsteczkowej możliwe jest najczęściej przy niskim ciśnieniu parcjalnym tego gazu (10^{-4} bara), w obecności wyższych stężeń wodoru mikroorganizmy przenoszą część równoważników redukcyjnych na akceptory organiczne (równania 2.8 i 2.9) (Ka Yu, Cheng et al. 2007). Rozwiązanie takie daje mniejszy zysk w postaci ATP, ale pozwala na zregenerowanie (utlenienie) puli koenzymu NAD^+ . W układach doświadczalnych uzysk wodoru z fermentacji cukrów sięga od 0,85 do 2,5 mola wodoru na mol fermentowanych cukrów (Hawkes, Hussy et al. 2007), choć dla mikroorganizmów termofilnych udaje się uzyskać produkcję wodoru bliską maksymalnej wartości teoretycznej (4 mole H_2 / mol glukozy) (Claassen, van der Spoet et al. 1999).

Ponieważ wodór wytwarzany w procesie fermentacji może być wykorzystywany przez inne mikroorganizmy do pozyskania energii (archeony metanogenne, bakterie redukujące siarkę), dla utrzymania wydajności procesu wymagane jest zahamowanie rozwoju tych bakterii. Można to osiągnąć przez prowadzenie procesu fermentacji w niskim pH. Innym sposobem usunięcia bakterii hydrogenotroficznych jest podgrzanie substratu do temperatury około 100 °C, co powoduje ich śmierć. Bakterie odpowiedzialne za fermentację prowadzącą do powstania wodoru tworzą spory, dzięki czemu mogą przetrwać proces ogrzewania i ponownie namnożyć się w reaktorze (Perera, Ketheesan et al. 2012). Kolejną możliwością zahamowania rozwoju archeonów metanogennych jest dodanie do podłoża specyficznych inhibitorów procesu metanogenezy, np. chloroformu lub siarczanu 2-bromoetanu (Abreu, Alves et al.).

Produkty końcowe ciemnej fermentacji w dalszym ciągu zawierają znaczne ilości energii, dlatego też dla zwiększenia wydajności procesu proponuje się połączenia DF z innym procesem, dzięki któremu możliwe jest odzyskanie pozostałej części energii. Jedną z opcji jest wykorzystanie fermentacji metanowej (Venetsaneas, Antonopoulou et al. 2009). Połączenie DF z fermentacją metanową niesie ze sobą następujące korzyści (Guwy, Dinsdale et al. 2011):

- ilość energii zgromadzonej w gazowych produktach końcowych połączonych procesów jest wyższa w porównaniu z jednostopniową fermentacją metanową;
- możliwa jest optymalizacja warunków fermentacji dla każdego z procesów osobno, co pozwala na zmniejszenie wielkości układu fermentacyjnego.

Ponieważ procesy prowadzące do powstawania wodoru na skutek fermentacji materii organicznej są identyczne z procesami kwasogenezy ujętymi w modelu ADM1, możliwe jest wykorzystanie tego modelu w opisie obu zjawisk.

Jednym z modeli opartych o ADM1 przeznaczonym do opisu procesu DF był model przedstawiony przez Arudchelvama i współpracowników (Arudchelvam, Perinpanayagam et al. 2010). Jego głównym zadaniem było prognozowanie ilości kwasów organicznych powstających w procesie fermentacji gnojowicy bydlęcej. Do opisu zjawiska hydrolizy materii organicznej użyto równań zgodnych z modelem szybkości ograniczonej dostępną powierzchnią. Część modelu opisująca proces tworzenia kwasów organicznych z dostępnych substratów była identyczna z ADM1. Wyniki symulacji były zgodne z obserwacjami dotyczącymi całkowitej ilości powstałych produktów oraz stężeniem kwasu octowego (r^2 powyżej 0,8). Prognozy dotyczące kwasu propionowego i masłowego wykazywały mniejszą dokładność. Przeprowadzenie analizy czułości i optymalizacja modelu przeprowadzona dla substratów modelowych pozwoliły na osiągnięcie wyższej zgodności modelu z wynikami eksperymentalnymi (Gadhamshtetty, Arudchelvam et al. 2010).

W modelu opracowanym przez Peirisa i współpracowników do listy związków powstających w kwasogenezie w pierwotnej wersji ADM1 dodano kwas mlekowy i etanol (Peiris, Rathnasiri et al. 2006). Symulacje przeprowadzone z użyciem tego modelu dobrze korelowały z wynikami eksperymentalnymi pod względem kinetyki produkcji wodoru oraz biomasy. Zgodność modelu z wynikami doświadczeń laboratoryjnych była różna w zależności od testowanych substratów. W celu poprawienia prognoz ilości powstających w czasie fermentacji kwasów organicznych, model ten wymaga dalszych modyfikacji.

Ciekawą modyfikacją modelu ADM1 przeznaczonego do symulacji procesu DF jest wprowadzenie zmiennej stechiometrii przemian cukrów. Rozwiązanie takie zaprezentował Penumathsa (Penumathsa, Premier et al. 2008). Model ADM1 zakłada stały stosunek kwasów uzyskanych w procesie rozkładu cukrów. W przypadku fermentacji, w której następuje akumulacja zredukowanych produktów, stosunek ten ulega zmianie. W przypadku DF ma miejsce akumulacja kwasów organicznych,

więc przyjęcie zmiennej stechiometrii fermentacji powinno polepszyć trafność prognoz uzyskiwanych z wykorzystaniem takiego modelu. W modelu proponowanym przez Penumathsa stosunek pomiędzy produktami rozkładu cukrów uzależniony jest od stężenia niezdysocjowanych kwasów organicznych w podłożu. Do modelu dodatkowo wprowadzono kwas mlekowy jako produkt rozkładu cukrów.

Inną ciekawą modyfikacją modelu ADM1 przeznaczanego do symulacji produkcji wodoru jest wprowadzenie dodatkowych frakcji celulozy i hemicelulozy oraz ich form rozpuszczalnych. Rozwiązanie takie zastosowano w modelu procesu fermentacji gnojowicy bydłowej w połączeniu z sacharozą (Rasika J. Perera and Nirmalakhandan 2011). Hydroliza celulozy i hemicelulozy została oddzielona od hydrolizy frakcji węglowodanów, a produkty hydrolizy stanowią dwa oddzielne komponenty (rozpuszczalne formy celulozy i hemicelulozy – S_c , S_h), których pobieranie przez mikroorganizmy jest procesem konkurencyjnym względem pobierania cukrów. Równanie kinetyczne opisujące proces pobierania tych związków wygląda następująco:

$$\left(\frac{dS_{Su}}{dt}\right) = -k_{m,Su} \frac{(X_{Su})(S_{Su})}{k_{S,su} \left(1 + \frac{S_h}{k_{S,h}} + \frac{S_c}{k_{S,c}}\right) + S_{su}} I_1 R_{ML} \quad (2.10)$$

$K_{m,Su}$ – stała szybkości procesu pobierania cukrów,

X_{Su} – ilość bakterii pobierających cukry (także frakcję rozpuszczalną celulozy i hemicelulozy)

S_{Su} , S_h , S_c - stężenie substratów (odpowiednio cukry, rozpuszczalne formy hemicelulozy i celulozy)

$K_{S,su}$, $K_{S,h}$, $K_{S,c}$ – stałe substratowe odpowiednio dla cukrów

I_1 - stała inhibicji wynikająca z odczynu środowiska i obecności azotu w podłożu

R_{ML} - stosunek objętości gnojowicy do płynu hodowlanego

Zmodyfikowaną wersję modelu ADM1 zastosowano również do opisu fermentacji wyciągu uzyskiwanego z sorgo przez bakterie *Ruminococcus albus*. Model ten zakłada rozkład dostępnych cukrów do kwasu octowego, kwasu mrówkowego, ditlenku węgla, wodoru i etanolu.

W obecnej sytuacji największe nadzieje na stabilną produkcję wodoru z materii organicznej stwarza wykorzystanie hodowli mieszanych mikroorganizmów. Pomimo niższych uzysków wodoru w przeliczeniu (około 2 mole H_2 / mol heksoz) na jednostkę zużytego substratu szybkość procesu fermentacji jest znaczna (do 3,2 l/lh (Zhang, Show et al. 2007)), dodatkowo możliwe jest odzyskanie pozostałej części energii przez połączenie produkcji wodoru z fermentacją metanową (Kongjan, O-Thong et al.).

3. METODY BIOCHEMICZNE W ANALIZIE PROCESU METANOGENEZY

Powstawanie biogazu jest wieloetapowym procesem biologicznym, dla którego stabilności ważna jest równowaga pomiędzy poszczególnymi etapami. Ważnym narzędziem w ocenie stanu poszczególnych etapów okazały się techniki biochemii, mikrobiologii i biologii molekularnej. Dzięki ich zastosowaniu możliwe jest określenie parametrów wstępnych dla modeli matematycznych takich jak ADM1, co ma kluczowe znaczenie dla poprawności otrzymanych rezultatów. Zastosowanie metod biotechnologicznych pozwala ponadto na potwierdzenie poprawności parametrów uzyskanych na drodze optymalizacji modelu metodami matematycznymi. W poniższym rozdziale zaprezentowany zostanie przekrój technik przydatnych w badaniach nad fermentacją metanogeną.

3.1. ANALIZA SKŁADU SUBSTRATU

Jedną z podstawowych informacji niezbędnych przy ocenie możliwości fermentacji określonego substratu jest jego skład. Pozwala on na wstępne oszacowanie ilości możliwego do uzyskania biogazu. Umożliwia także określenie wymaganych suplementów dla prawidłowego przebiegu fermentacji.

Jedną z najbardziej rozpowszechnionych technik badania składu pasz jest analiza Weender (van Soest and Wine 1967), która obejmuje następujące oznaczenia:

- sucha masa (Dry Weight – DW)
- popiół (Ash)
- surowe białko (Row Protein – RP)
- surowy tłuszcz (Row fatt/Lipid – RL)
- surowe włókno (Row Fiber – RF)
- neutralne włókno detergentowe (Neutral Detergent Fiber - NDF)
- kwaśne włókno detergentowe (Acid Detergent Fiber - ADF)
- kwaśna lignina detergentowa (Acid Detergent Lignin - ADL)

Znając te wartości można obliczyć ilości poszczególnych polimerów organicznych: białek, tłuszczu, celulozy, ligniny, hemicelulozy, skrobi. Ponieważ uzyskane dane są wyrażone pośrednio w jednostkach masy (%DW), przed użyciem ich w modelu ADM1 wymagana jest jeszcze konwersja do jednostek COD.

Analiza Weender wydaje się być korzystna z uwagi na niskie koszty wykonania i łatwą dostępność do laboratoriów, które świadczą tego typu usługi.

W dalszej części rozdziału opisana zostanie krótko zasada wykonania poszczególnych oznaczeń oraz sposób przeliczenia uzyskanych wyników do formy przyjętej w modelu ADM1.

3.1.1. Oznaczenie suchej masy

(DW – ang. dry weight)

Do oznaczenia suchej masy wykorzystuje się suszenie badanego materiału w temperaturze 105 °C przez co najmniej 4 godziny. Po wysuszeniu próbka zawiera zarówno substancje obecne w badanym materiale jako zawiesina, jak również związki rozpuszczone. Temperatura ta jest wystarczająca do odparowania wody związanej z większością związków organicznych. Część wody krystalizacyjnej związanej z solami może w dalszym ciągu być obecna w próbce. Utrata części związków organicznych na skutek odparowania w tej temperaturze z reguły jest niewielka. Ponadto stosowana temperatura jest wystarczająca do utraty ditlenku węgla i przejścia kwaśnych węglanów do węglanów. Szczegółowy opis powyższych metod można znaleźć w opracowaniu „Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater 20th Edition”(1998).

3.1.2. Oznaczenie popiołu

(ang. Ash)

W celu oznaczenia popiołu wysuszone wcześniej próbki spala się w temperaturze 600 °C. W temperaturze tej spalaniu ulega większość substancji organicznych, a pozostałość stanowią głównie sole metali zawartych w próbce. Różnica masy między suchą próbką a popiołem nazywana jest lotną frakcją stałą (ang. Volatile Solids – VS) i odzwierciedla ilość substancji organicznych (zarówno rozpuszczonych, jak i w postaci zawiesiny) zawartych w próbce. Możliwe jest również oznaczenie zawartości zawiesin tą metodą po uprzednim zastosowaniu odpowiedniego filtra. Oznaczanie suchej masy i popiołu jest szeroko stosowane w ocenie ścieków oraz pasz (1998).

3.1.3. Oznaczanie białka metodą Kjeldahl

(RP – ang. raw protein)

Stabilna produkcja biogazu wymaga zachowania odpowiednich proporcji pomiędzy ilością węgla i azotu w substracie. W reaktorach metanowych często najważniejszym źródłem azotu jest białko zawarte w substracie, dlatego oznaczenie poziomu białka jest ważne dla odpowiedniego zbilansowania składu pożywki. Do oznaczenia zawartości białka wykorzystuje się często metodę Kjeldahl (1998).

W metodzie Kjeldahl azot będący w trzecim stopniu utlenienia przeprowadzany jest do wolnego amoniaku, który następnie można oznaczyć przez miareczkowanie. Wstępnym etapem oznaczenia jest utlenienie substancji organicznej do CO_2 i wody w obecności stężonego kwasu siarkowego. Do mieszaniny utleniającej dodaje się również siarczan potasu w celu podwyższenia temperatury wrzenia oraz związki miedzi (tlenek lub siarczan) stanowiące katalizator.

Drugim etapem jest oddzielenie uzyskanego amoniaku od mieszaniny utleniającej przez destylację z parą wodną po wstępnym zobojętnieniu roztworu. Proces ten może być zautomatyzowany. Uwolniony amoniak następnie jest wychwytywany przez roztwór słabego kwasu (H_3BO_3) i poddawany miareczkowaniu w odpowiednim pH. Zebrany amoniak można również oznaczać metodą kolorymetryczną z fenolem lub z wykorzystaniem elektrody jonoselektywnej.

Jak już wcześniej wspomniano, metoda ta jest selektywna względem azotu na -3 stopniu utlenienia, tak więc część uzyskanego wyniku będzie stanowił również azot zawarty w kwasach nukleinowych, aminocukrach oraz w formie wolnych jonów amonowych. Metoda ta daje jednak wyniki wystarczająco dokładne dla potrzeb modelowania.

3.1.4. Oznaczanie zawartości lipidów

(RL – ang. raw lipids)

Jedną z najprostszych metod oznaczania zawartości lipidów w materiale biologicznym jest ekstrakcja rozpuszczalnikami organicznymi. Dobre wyniki w analizie zawartości lipidów w materiale organicznym daje ekstrakcja z wykorzystaniem aparatu Soxleta. Przed ekstrakcją materiał poddaje się suszeniu w temperaturze $105\text{ }^{\circ}\text{C}$, dzięki czemu uzyskany wynik stanowi część suchej masy badanej próbki. Następnie próbkę poddaje się ekstrakcji eterem naftowym w aparacie Soxleta przez 3 godziny. Uzyskany ekstrakt poddaje się odparowaniu i ważeniu.

Inną metodą stosowaną w oznaczaniu zawartości lipidów w materiale biologicznym jest ekstrakcja mieszaniną chloroform/metanol (Bligh 1959). W metodzie tej próbka poddawana jest ekstrakcji roztworem chloroform:metanol (1:2). Następnie do mieszaniny dodawana jest dodatkowa porcja chloroformu i wody dzięki czemu następuje rozdzielenie faz. Wyekstrahowane lipidy znajdują się w cięższej fazie organicznej na dnie naczynia. Po zebraniu fazy organicznej rozpuszczalniki są następnie odparowywane, a pozostałość ważona. Problem w stosowaniu tej metody może stanowić sposób oddzielenia fazy organicznej znajdującej się na dnie naczynia bez ponoszenia zbędnych strat.

3.1.5. Oznaczanie włókna surowego

(RF – ang. raw fiber)

W celu oznaczenia włókna surowego należy rozpuścić związki organiczne najpierw w środowisku kwaśnym, a następnie zasadowym (van Soest and Wine 1967). W skład nierozpuszczalnych pozostałości wchodzi: celuloza, hemiceluloza i lignina. Substancje te są składowymi włókna surowego. Oznaczenie wykonywane jest w następujący sposób:

- wstępnie badany materiał jest suszony w temp. 105 °C, a następnie umieszczany w specjalnym worku i ważony,
- następnie próbka jest umieszczana w gorącym (95 °C) roztworze kwasu siarkowego (0,13 M) na 30 min.,
- Po wyjęciu z roztworu kwasu materiał jest przepłukiwany wodą destylowaną,
- następnie próbkę umieszcza się w gorącym (95 °C) roztworze zasadowym (NaOH 0,313 M lub KOH 0,23 M) na 30 min.,
- Po zakończeniu inkubacji w roztworze zasady próbka jest przepłukiwana wodą destylowaną i suszona,
- następnie oznaczane są lotne substancje stałe (VS) w pozostałym materiale.

3.1.6. Oznaczanie obojętnego włókna detergentowego

(NDF – ang. neutral detergent fiber)

Aby oznaczyć obojętne włókno detergentowe, próbkę poddaje się kąpeli w roztworze detergentu o odczynie obojętnym z dodatkiem amylazy (enzym rozkładający skrobię) (van Soest and Wine 1967). W skład włókna nierozpuszczalnego w tych warunkach wchodzi: celuloza, hemiceluloza, lignina i związki związane z ligniną zawierające azot (ang. lignin-N-compounds). Detergentem stosowanym w roztworze płuczącym jest siarczan dodecyłu sodu. Dodatkowo w skład roztworu wchodzi: wersenian sodowy, boran sodu, fosforan sodu oraz 2-etoksyetanol.

Wysuszoną, zważoną próbkę umieszcza się na 60 min. we wrzącym roztworze detergentu, następnie po płukaniu w wodzie destylowanej oznacza się zawartość lotnych substancji stałych.

3.1.7. Oznaczanie kwaśnego włókna detergentowego

(ADF – ang. acid detergent fiber)

W metodzie tej badany materiał poddaje się inkubacji w roztworze detergentu w środowisku kwaśnym (van Soest and Wine 1967). W zastosowanych warunkach nie rozpuszczają się następujące substancje organiczne: celuloza, lignina oraz związki związane z ligniną zawierające azot (ang. lignin-N-compounds).

W skład roztworu detergentu wchodzi: kwas siarkowy (0,5 M) oraz bromek N-cetylo-N,N,N-trimetylo aminy (2%). W celu wykonania analizy wysuszoną,

zważoną próbkę umieszcza się na 60 min. we wrzącym roztworze detergentu, następnie po płukaniu w wodzie destylowanej oznacza się zawartość lotnych substancji stałych.

3.1.8. Oznaczanie kwaśnej ligniny detergentowej

(ADL – *ang. acid detergent lignin*)

W celu oznaczenia ligniny wstępnie badany materiał poddaje się kąpeli w kwaśnym roztworze detergentu (analogicznie do metody ADF) (van Soest and Wine 1967). Następnie celulozę wciąż obecną w próbce usuwa się przez rozpuszczenie w roztworze kwasu siarkowego 72%.

Postępowanie z próbką jest dokładnie takie samo jak w przypadku oznaczania kwaśnego włókna detergentowego, z tym wyjątkiem, że po odmyciu roztworu detergentu wodą destylowaną próbka poddawana jest kąpeli w roztworze kwasu siarkowego o stężeniu 72% przez 3 godziny w temperaturze pokojowej.

3.1.9. Konwersja danych dotyczących składu substratu na potrzeby modelu ADM1

Na podstawie wyników otrzymanych po przeprowadzeniu analizy Weender możliwe jest obliczenie zawartości poszczególnych grup substancji organicznych w substracie (Koch, Lübken et al. 2010). W Tabeli 13 zestawiono stosowane wzory.

Tabela 13. Wzory stosowane do obliczenia zawartości poszczególnych frakcji w substracie.

Związek	% Suchej masy
Białko	$RP/DW \cdot 100$
Lipidy	$RL/DW \cdot 100$
Celuloza	$(ADF-ADL)/DW \cdot 100$
Lignina	$ADL/DW \cdot 100$
Hemiceluloza	$(NDF-ADF)/DW \cdot 100$
Skrobia	$(RF+NfE-NDF)/DW \cdot 100$

Objaśnienie skrótów: DW – sucha masa, RP – białko surowe, RL – lipidy surowe, RF – włókno surowe, NDF - neutralne włókno detergentowe, ADF - kwaśne włókno detergentowe, ADL - kwaśna lignina detergentowa, NfE - ekstrakt wolny od azotu (DW-RL-RP-RF).

Aby dane uzyskane za pomocą wzorów zebranych w Tabeli 13 można było zastosować w modelu ADM1, wymagana jest konwersja jednostek. Wartości otrzymane w wyniku zastosowania powyższych wzorów wyrażone są jako stężenia masowo objętościowe (np. kg/m^3), zatem należy je konwertować do jednostki przedstawiającej chemiczne zapotrzebowanie na tlen. Można tego dokonać przez pomnożenie otrzymanych wartości przez odpowiedni współczynnik. W tabeli 14

zebrano obliczone współczynniki COD dla poszczególnych frakcji substratu. Należy jednak pamiętać, że wartości rzeczywiste mogą odbiegać od prezentowanych poniżej. W szczególnym stopniu może dotyczyć to lipidów i białek. Wynika to przede wszystkim ze zmienności składu tych związków.

Tabela 14. Przybliżone zapotrzebowanie COD poszczególnych grup związków organicznych, obliczone na podstawie wzorów sumarycznych.

Związek	Teoretyczne COD ($\text{kgO}_2/\text{kg}_{\text{TS}}$)
Białko	1,42
Lipidy	2,90
Lignina	1,56
Celuloza, Hemiceluloza, Skrobia	1,19

Ponieważ rozkład lignin w warunkach beztlenowych jest niemożliwy (enzymy rozkładające ligninę wymagają obecności aktywnych form tlenu (Wong 2009)), substancję tę należy zaliczyć do frakcji Xi (nierozpuszczalnych substancji inertnych) w modelu ADM1. Dodatkowo również część celulozy i hemicelulozy jest niedostępna dla mikroorganizmów i również powinna być zaliczona do frakcji Xi. Biodegradowalność celulozy i hemicelulozy dla danego substratu powinna być dobierana indywidualnie w zależności od warunków fermentacji i sposobu przygotowania substratu.

3.2. BADANIE AKTYWNOŚCI ENZYMATYCZNEJ

W reaktorach metanogennych krokiem limitującym szybkość całego procesu jest często hydroliza dostępnych substratów. Proces ten katalizowany jest w znacznym stopniu przez enzymy hydrolityczne wytwarzane przez mikroorganizmy stanowiące część ekosystemu reaktora metanogenne. Ponieważ populacja drobnoustrojów przystosowuje się do podawanego im pożywienia, pomiar aktywności enzymów hydrolitycznych może być przydatny w ocenie możliwości zastosowania innego substratu.

Jako jednostkę określającą aktywność danego enzymu w badanym preparacie przyjmuje się ilość przetworzonego substratu w danej jednostce czasu. Standardowa jednostka aktywności enzymatycznej (U) jest definiowana jako ilość enzymu katalizująca przemianę 1 μmola substratu (lub odpowiednich grup chemicznych, np. wiązań peptydowych) przez czas 1 minuty w warunkach optymalnych dla działania danego enzymu. Pomiaru aktywności enzymatycznej należy zawsze dokonywać w warunkach zapewniających wysycenie cząstek enzymu substratem, ponieważ szybkość reakcji enzymatycznej jest zależna od dostępności substratu. Często dla

potrzeb danej metody pomiarowej definiuje się inne jednostki aktywności będące pochodną jednostki podanej powyżej jednostki.

Do oznaczania aktywności enzymów hydrolitycznych mogą być stosowane ich naturalne substraty (np. kazeina dla proteaz, oliwa z oliwek dla lipaz) lub też związki syntetyzowane chemicznie o podobnych właściwościach co substraty naturalne (azokazeina, palmitynian p-nitrofenolu). Stosowanie substratów syntetycznych często ma na celu uproszczenie procedury pomiarowej.

W poniższym rozdziale zaprezentowano kilka przykładowych metod umożliwiających pomiar aktywności enzymów hydrolitycznych niezbędnych w degradacji materii organicznej.

3.2.1. Oznaczanie aktywności proteaz metodą z kazeiną

W wyniku cięcia kazeiny przez proteazy powstają krótkie peptydy rozpuszczalne w kwasie trichlorooctowym (TCA). Ponieważ peptydy te zawierają aminokwasy aromatyczne (tyrozynę, fenyloalaninę i tryptofan), stężenie tych produktów można zmierzyć przez pomiar absorpcji światła o długości fali 280 nm.

W celu zbadania aktywności proteolitycznej należy postępować zgodnie z następującym protokołem:

1. Do probówki Eppendorf o pojemności 2 ml dodać 0,5 ml 0,5% roztworu kazeiny i 0,2 ml buforu reakcyjnego.
2. Po uprzednim usunięciu komórek przenieść 0,1 ml płynu hodowlanego do mieszaniny reakcyjnej.
3. Reakcję prowadzić przez 30 min w odpowiedniej temperaturze.
4. Zatrzymać reakcję przez dodanie 0,5 ml 10% roztworu TCA.
5. Próbkę odwirować przez 10 min przy przyspieszeniu 15 000 g.
6. W zebranym klarownym płynie zmierzyć absorbancję przy długości fali 280 nm.
7. Od otrzymanego pomiaru odjąć odczyt dla próby ślepej i porównać z krzywą standardową wykreśloną dla tyrozyny.

Próbę ślepą należy przygotować analogicznie jak próby badane, z tym że roztwór TCA trzeba dodać przed inkubacją. Jednostka aktywności definiowana jest tutaj jako ilość enzymu uwalniająca cztery nanomole tyrozyny w ciągu jednej minuty w danych warunkach.

3.2.2. Oznaczanie aktywności proteaz metodą z azokazeiną

W wyniku cięcia azokazeiny przez proteazy powstają krótkie peptydy rozpuszczalne w kwasie trichlorooctowym (TCA). Dzięki wyznakowaniu tych peptydów barwnikiem azowym możliwe jest oznaczenie ich stężenia poprzez pomiar absorpcji światła o długości fali 420 nm.

W celu zbadania aktywności proteolitycznej należy postępować zgodnie z następującym protokołem:

1. Do próbki Eppendorf o pojemności 1,5 ml dodać 0,36 ml 1% roztworu kazeiny w buforze Tris HCl o odpowiednim pH.
2. Po uprzednim usunięciu komórek przenieść 0,09 ml płynu hodowlanego do mieszaniny reakcyjnej.
3. Reakcję prowadzić przez 30 min w odpowiedniej temperaturze.
4. Reakcję zatrzymać przez dodanie 0,45 ml 10% roztworu TCA.
5. Próbkę odwirować przez 10 min przy przyspieszeniu 15 000 g.
6. 0,6 ml klarownego płynu przenieść do nowej próbki Eppendorfa i dodać 0,135 ml roztworu NaOH (2 M).
7. Przeprowadzić pomiar absorbancji w przygotowanych roztworach przy 420 nm, a otrzymany wynik porównać z krzywą standardową przygotowaną dla azokazeiny.

Jednostka aktywności definiowana jest tutaj jako ilość enzymu potrzebna do uwolnienia 1 μg azopeptydów w ciągu jednej minuty w danych warunkach reakcji.

3.2.3. Pomiar aktywności esterazowej z wykorzystaniem palmitynianu p-nitrofenolu.

W niniejszej metodzie jako substrat dla enzymów hydrolizujących tłuszcze wykorzystuje się palmitynian p-nitrofenolu (pNPP). W wyniku reakcji hydrolizy do roztworu zostaje uwalniany p-nitrofenol o żółtym zabarwieniu. Przyrost stężenia barwnego produktu można mierzyć przez zmianę absorbancji światła o długości fali 410 nm (Gupta, Rath i in. 2002).

W celu wykonania pomiaru należy przygotować następujące roztwory:

- bufor Tris HCl 0,5M pH - zależne od wymaganych warunków,
- roztwór Tryton X100 o stężeniu 40 mg/ml,
- roztwór gumy arabskiej o stężeniu 9 mg/ml,
- roztwór pNPP w 2-propanolu o stężeniu 3 mg/ml.

Reakcję należy przygotować w następujący sposób:

- do kuwety spektrofotometrycznej dodać 0,58 ml wody destylowanej oraz po 0,12 ml wcześniej przygotowanych roztworów (roztwór pNPP dodać na samym końcu, aby zapobiec wytrąceniu substratu),
- do mieszaniny reakcyjnej dodać 50 μl płynu hodowlanego oczyszczonego z komórek bakteryjnych,
- prowadzić pomiary absorpcji światła o długości fali 410nm co 5 min przez 30 min,
- obliczyć przyrost absorbancji i na podstawie krzywej standardowej dla p-nitrofenolu obliczyć ilość uwolnionego produktu.

- obliczyć aktywność preparatu przyjmując za jednostkę aktywności ilość enzymu potrzebną do uwolnienia 1 nmola p-nitrofenolu w ciągu jednej minuty. W przypadku zbyt szybkiego wyczerpania substratu (otrzymany wykres przyrostu absorbancji w czasie nie jest linią prostą) powtórzyć oznaczenie z odpowiednim rozcieńczeniem preparatu.

3.2.4. Pomiar aktywności enzymów rozkładających wielocukry

Oznaczanie aktywności enzymów celulolitycznych i amylolitycznych opiera się na pomiarze ilości uwolnionych podczas hydrolizy cukrów redukujących (głównie glukozy i celobiozy). Jako substratu dla enzymów rozkładających celulozę można użyć bibuły filtracyjnej, bawełny lub innej rozdrobnionej celulozy. Dla amylaz najdogodniejszym substratem jest zawiesina skrobi.

Pierwszym etapem oznaczenia jest inkubacja badanego roztworu enzymu z odpowiednio przygotowanym roztworem substratu. W przypadku amylaz można posłużyć się 0,5% roztworem skrobi w buforze octanowym (0,1 M pH=5,0). Próbkę należy mieszać z roztworem substratu w proporcji 1:1 i inkubować w odpowiedniej temperaturze przez 15 min. W przypadku badania aktywności enzymów rozkładających celulozę jako substratu można użyć 5% roztworu celulozy mikrokryształicznej w buforze cytrynianowym (0,05 M, pH=4,8). Podobnie jak w przypadku analizy aktywności amylaz, roztwór enzymu należy mieszać z roztworem substratu w proporcji 1:1. Reakcję należy prowadzić przez 1 godzinę w odpowiedniej temperaturze. Dobór odpowiedniego buforu dla reakcji oraz temperatury jej prowadzenia powinien w jak najwyższym stopniu przypominać warunki naturalne dla badanego enzymu. Reakcję enzymatyczną należy przerwać przez inkubację próby przez 5 min w temp. 95 °C. Po ochłodzeniu należy oznaczyć ilość uwolnionych cukrów wybraną metodą. Jeżeli metoda oznaczenia cukrów jest oparta o pomiar spektrofotometryczny, w razie potrzeby próby należy poddać klarowaniu przez wirowanie lub filtrowanie. Poniżej podano opis dwóch metod często stosowanych do oznaczania ilościowego cukrów redukujących i glukozy.

3.2.5. Oznaczanie cukrów redukujących (metoda Bernfelda)

Cukry redukujące w roztworze wodnym ulegają utlenieniu pod wpływem kwasu 3,5-dinitrosalicylowego (DNS) (Lubken, Wichern et al. 2007). Intensywność zabarwienia powstających związków jest proporcjonalna do ilości utlenionych cukrów. Metoda ta pozwala na oznaczenie stężenia cukru w zakresie od 5 µg do 60 µg w 1 ml. Próby o wyższym stężeniu cukru należy przed wykonaniem oznaczenia dodatkowo rozcieńczyć. Oznaczenie należy wykonać co najmniej w 3 powtórzeniach. Do oznaczenia należy wykonać również próbę ślepą, zawierającą zamiast roztworu badanego wodę destylowaną.

Wykonanie oznaczenia:

1. Do 1 ml roztworu badanego dodać 1 ml odczynnika reakcyjnego.
2. Próby inkubować przez 5 min we wrzącej łaźni wodnej.
3. Po ochłodzeniu dodać 3 ml wody destylowanej.
4. Zmierzyć absorbancję próby przy długości fali 530 nm.
5. Otrzymany wynik odnieść do krzywej standardowej.

Skład odczynnika reakcyjnego:

1g DNS, 20 ml 2 M NaOH, 3g winianu sodowo-potasowego, uzupełnić wodą destylowaną do 100 ml.

3.2.6. Oznaczanie stężenia glukozy metodą enzymatyczną

Glukoza zawarta w próbce badanej ulega utlenieniu do kwasu glukonowego pod wpływem działania oksydazy glukozowej. Reakcja ta jest specyficzna dla glukozy. W jej wyniku powstaje nadtlenek wodoru, który z kolei ulega reakcji z 4-aminoantypiryną i fenolem, tworząc barwny kompleks. Reakcja zachodzi pod wpływem peroksydazy. Powstawanie barwnego produktu można śledzić rejestrując absorbancję przy długości fali 500 nm. Metoda ta pozwala na oznaczenie stężeni glukozy w zakresie od 2,3 µg do 5 mg w 1 ml. W handlu dostępne są komercyjne zestawy analityczne oparte na wyżej opisanej metodzie. Poniżej podano sposób przygotowania próby dla produktu firmy BioSystems (Numer katalogowy COD12503).

Wykonanie pomiaru:

1. Do 1 ml odczynnika reakcyjnego dodać 10 µl badanego roztworu.
2. Próbę wymieszać i pozostawić w temperaturze pokojowej na 10 min.
3. Przeprowadzić pomiar absorbancji próby przy długości fali 500 nm.

Odczyt porównać z krzywą standardową.

3.3. METODY CHROMATOGRAFICZNE W ANALIZIE FERMENTACJI METANOWEJ

Chromatografia jest to fizykochemiczna metoda rozdzielania mieszanin jednorodnych oparta na różnicy oddziaływań składników mieszaniny z fazą ruchomą i stacjonarną układu chromatograficznego (Witkiewicz 2000). Dzięki wykorzystaniu metod chromatograficznych możliwe jest uzyskanie szczegółowych informacji na temat składu zarówno ilościowego, jak i jakościowego związków zawartych w mieszaninie fermentacyjnej oraz powstającego biogazu. Najbardziej popularną techniką chromatograficzną wykorzystywaną w badaniach nad procesem fermentacji metanowej jest chromatografia gazowa, używana do analizy składu samego biogazu oraz lotnych kwasów tłuszczowych powstających w procesie fermentacji.

Analiza VFA możliwa jest również z wykorzystaniem chromatografii cieczowej. W dalszej części rozdziału krótko opisano techniki chromatograficzne wykorzystywane w badaniach procesu fermentacji metanowej.

3.3.1. Badanie składu biogazu

Znajomość zawartości metanu w biogazie pozwala na wydajne sterowanie procesem spalania tego paliwa w silnikach lub instalacjach grzewczych. Skład biogazu dostarcza również informacji na temat wydajności procesu fermentacji oraz decyduje o sposobie uzdatnienia go przed użyciem do celów energetycznych. Przed użyciem biogazu w silnikach wymagane jest usunięcie siarkowodoru, który przyspiesza korozję urządzeń oraz jest przekształcany w procesie spalania do dwutlenku siarki, gazu szkodliwego dla środowiska naturalnego.

Dokładna i szybka analiza składu biogazu może być przeprowadzona przy użyciu chromatografii gazowej. Oznaczenie składu próbki w przypadku wykorzystania detektora termokonduktometrycznego (TCD) zajmuje około 30 min. Detektor typu TCD wykrywa zmiany przewodności cieplnej w strumieniu gazu nośnego wywołane obecnością analitu. Przykładowe zestawy złożeń używanych w rozdziale biogazu przedstawione są w tabeli 15. Ważną zaletą takiego układu analizy gazu jest możliwość automatyzacji pomiaru.

Tabela 15. Układy chromatograficzne stosowane do analizy składu biogazu.

Rodzaj kolumny	Gaz nośny	Detektor	Źródło
CTR1 packed column	He	TCD	Ramirez 2009 (Ramirez, Mottet et al. 2009)
Haye SepQ 60/80	He	TCD	Mechichi 2005 (Mechichi and Sayadi 2005)
Chromosorb 102 column	N ₂	TCD	Li Wrenn 2005 (Li, Wrenn et al. 2005)
Unibeads C		TCD	Imachi 2000 (Imachi, Sekiguchi et al. 2000)

3.3.2. Analiza lotnych kwasów tłuszczowych

W wyniku kwasogenezy będącej częścią procesu fermentacji metanowej z materii organicznej powstaje mieszanina kwasów organicznych (VFA), które w kolejnych etapach są przekształcane do biogazu. Ponieważ VFA stanowią substrat dla konsorcjum bakterii metanogennych i syntoficznych, podniesienie stężenia tych związków powinno skutkować przyspieszeniem reakcji metanogenezy. Z drugiej jednak strony niezdysocjowana forma VFA jest toksyczna dla bakterii, dlatego też przekroczenie pewnego stężenia, szczególnie przy obniżonym pH, prowadzi do zahamowania procesu metanogenezy.

Załamaniu stabilności procesu fermentacji towarzyszy często drastyczne zwiększenie ilości VFA. Wzrost stężenia kwasów w reaktorze zazwyczaj poprzedza wyraźny spadek produkcji biogazu, dlatego śledzenie zmian ilości kwasów

organicznych może być przydatne w procesie monitorowania stabilności procesu fermentacji (Nielsen, Uellendahl et al. 2007). Najbardziej rozpowszechnioną metodą analizy VFA w reaktorach metanogennych jest chromatografia gazowa.

W chromatografii gazowej fazą nośną jest gaz (azot, hel, argon lub wodór), natomiast fazą stacjonarną adsorbent w postaci filmu na ściankach kolumny lub złoża. Wykorzystanie chromatografii gazowej pozwala na oznaczenie VFA w stężeniu powyżej 1 mM bez konieczności zagęszczania próbek. Najczęściej wykorzystywanym rodzajem detektora w analizie próbek pod kątem obecności VFA jest detektor płomieniowo-jonizacyjny (FID). W tabeli 16 przedstawiono przykładowe układy chromatograficzne wykorzystywane w oznaczaniu kwasów organicznych.

Tabela 16. Układy chromatograficzne stosowane w analizie LKT

Kolumna	Gaz nośny	Typ detektora	Źródło
Hayesep R 80/100 Mesh	N ₂	FID	Ramirez 2009 (Ramirez, Mottet et al. 2009)
Nukol column	He	FID	Li Wrenn 2005 (Li, Wrenn et al. 2005)
Unisole F-200 30/60	N ₂	FID	Wang 1999 (Wang, Kuninobu et al. 1999)

Często przed analizą próby poddawane są wstępnej obróbce. Do najczęściej wykonywanych czynności należy usunięcie cząstek stałych przez filtrowanie lub wirowanie oraz zakwaszenie. Usuwanie cząstek stałych ma na celu przedłużenie żywotności chromatografu gazowego, a w szczególności kolumny. Zakwaszenie próbek wykonuje się w celu przeprowadzenia kwasów organicznych do formy niejonizowanej, która jest dogodniejsza do analizy w chromatografii gazowej. Próbkę może być wprowadzana do aparatu w formie roztworu (Wang, Kuninobu et al. 1999). Inną możliwością stosowaną w układach zautomatyzowanych jest wprowadzenie do aparatu próbki gazu zawierającego VFA będące w równowadze z zakwaszonym roztworem wodnym (Kanokwan, Damien John et al. 2007).

Z punktu widzenia przemysłu bardzo interesującym rozwiązaniem jest zastosowanie zautomatyzowanego układu analizy, dzięki czemu możliwe jest prowadzenie testów w trybie półciągłym. Systemy takie były prezentowane zarówno dla systemów laboratoryjnych (Boe, Steyer et al. 2008), jak i przemysłowych (Nielsen, Uellendahl et al. 2007).

Układy takie pozwoliły na dokładne poznanie zmian w stężeniu VFA w przemysłowych instalacjach przeznaczonych do fermentacji metanogennej podczas pracy w stabilnych warunkach, jak również przy zbyt dużym obciążeniu (Nielsen, Uellendahl et al. 2007). Opracowano również automatyczny układ pozwalający na sterowanie procesem karmienia reaktora oparty o śledzenie zmian stężenia kwasu propionowego (Boe, Steyer et al. 2008).

Rozdział VFA możliwy jest również z wykorzystaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej. Najczęściej wykorzystywanymi złożami są w tym przy-

padku jonowymieniacze, a rozdział jest prowadzony w warunkach izokratycznych przez przemywanie kolumny roztworem kwasu. Przykładowe kolumny przeznaczone do rozdziału mieszaniny kwasów to: Aminex® HPX-87H, PolyporeH column, RSpak KC-811 column. Do detekcji kwasów organicznych wykorzystywane są ich właściwości absorpcyjne światła UV przy długości fali 210 nm. Podobnie jak w przypadku chromatografii gazowej próbka często wymaga wstępnego przygotowania przez zakwaszenie i usunięcie cząstek stałych z analizowanego roztworu.

3.4. OKREŚLANIE AKTYWNOŚCI MIKROORGANIZMÓW W ZŁOŻACH METANOGENNYCH

Ważną informacją przy charakterystyce złoża metanogennych jest aktywność względem wybranych substratów (Angelidaki, Alves et al. 2006). Parametry te mogą być określone na podstawie prostych doświadczeń fermentacji okresowej prowadzonej w małej skali. Informacje uzyskane z takich doświadczeń są przydatne w następujących sytuacjach:

- przy doborze odpowiedniego inokulum do rozpoczęcia fermentacji;
- w trakcie planowania postępowania przy rozruchu reaktora;
- przy optymalizacji dawek substratu dla stabilnej fermentacji ciągłej;
- przy rozważaniu możliwości zmiany użytkowanego substratu;
- przy planowaniu postępowania w przypadku zakwaszenia reaktora.

Określenie aktywności złoża metanogennego daje również ważne dane wejściowe dla modeli matematycznych opisujących proces fermentacji metanogennej takich jak ADM1.

Warunki, w jakich będą prowadzone testy, powinny w jak najwyższym stopniu przypominać warunki występujące w reaktorze, z którego pobrano złożo. W szczególności dotyczy to temperatury, ale również pH, ciśnienia i mieszania.

Dla poszczególnych procesów zachodzących podczas fermentacji metanowej przyjęto następujące substraty wzorcowe:

- metanogeneza: kwas octowy (1 g/l), mieszanina $H_2:CO_2$ (4:1) pod ciśnieniem przewyższającym atmosferyczne o 1 atm.,
- acetogeneza: kwas propionowy (0,5 g/l), kwas masłowy (0,5 g/l)
- kwasogeneza: glukoza (1 g/l)
- właściwości hydrolityczne: celuloza (1 g/l), kazeina (1 g/l)

Reakcję z reguły prowadzi się w szklanych butelkach o pojemności około 100 ml, zabezpieczonych przed kontaktem z powietrzem gumowym korkiem. Naczynia powinny być w stanie wytrzymać maksymalne teoretyczne nadciśnienie

powstałe na skutek przekształcenia całości dostarczonego substratu do biogazu. Ilość wprowadzonej biomasy bakteryjnej powinna być na tyle duża, aby przyrost bakterii w trakcie doświadczenia był dla wyników pomijalnie mały. Za optymalną przyjmuje się gęstość wynoszącą 2,5 g VSS/l. Po umieszczeniu w butelkach złoża, makro i mikroelementów oraz substratu, powietrze jest usuwane przez przedmuchanie butelki azotem lub mieszaniną azotu i ditlenku węgla w proporcji 4:1.

Dla prawidłowego wyznaczenia parametrów aktywności powinno się brać pod uwagę jedynie początkową część krzywej produkcji biogazu, kiedy proces jest charakteryzowany przez równania kinetyki zerowego rzędu. W późniejszym etapie na otrzymany wynik mają wpływ takie czynniki jak zmiana środowiska fermentacji na skutek obecności produktów, zmiany adaptacyjne w populacji mikroorganizmów oraz ubytek substratu.

4. ANALIZA SKŁADU POPULACJI MIKROORGANIZMÓW W ŚRODOWISKU BEZTLENOWYM

Fermentacja metanowa jest zjawiskiem wieloetapowym, którego stabilność jest uzależniona od równowagi pomiędzy poszczególnymi etapami przemiany materii organicznej. Zbyt wysoki poziom związków stanowiących produkty pośrednie w procesie konwersji materii organicznej do metanu (szczególnie VFA oraz H_2) prowadzi do zahamowania końcowego etapu w którym powstaje metan. Ponieważ większość procesów zachodzących w trakcie fermentacji jest prowadzona z udziałem mikroorganizmów skład populacji będzie miał zasadnicze znaczenie w określeniu zachowania reaktora w danych warunkach.

Badania populacji mikroorganizmów w instalacjach prowadzących fermentację metanową skupiały się głównie na analizie populacji archeonów metanogennych, ponieważ prowadzą one najważniejszą grupę reakcji syntezy metanu i są bezpośrednio odpowiedzialne za usuwanie części produktów pośrednich których nadmiar prowadzi do załamania procesu. Do ważniejszych grup archeonów należą mikroorganizmy acetoklastyczne oraz te redukujące związki jednowęglowe. W obrębie archeonów acetoklastycznych wyróżnia się dwie grupy *Mathanosarcian* i *Methanoseate*.

Archeony wytwarzające metan na drodze redukcji ditlenku węgla wykorzystują wodór powstający w czasie utleniania kwasów organicznych. Usuwanie wodoru jest niezbędne dla funkcjonowania mikroorganizmów syntroficznych, ponieważ zbyt wysokie stężenie wodoru prowadzi do zahamowania reakcji utleniania VFA. Jedną z hipotez mówiących o przyczynach załamania procesu metanogenezy w biogazowniach mówi o niewystarczającej ilości bakterii hydrogenotroficznych, przez co następuje akumulacja wodoru. Powstający wodór prowadzi do zahamowania procesu utleniania kwasów tłuszczowych i całkowitego załamania fermentacji metanowej. Do bakterii zdolnych do redukcji ditlenku węgla do metanu należy większość znanych archeonów metanogennych wliczając w to klasy: *Methanobacteria*, *Methanococci* oraz *Methanomicrobia*.

Bakterie syntroficzne odpowiedzialne za utlenianie lotnych kwasów tłuszczowych należą do następujących grup: *Syntrophus* i *Syntrophomonas*. Dzięki ich aktywności lotne kwasy tłuszczowe (takie jak masłowy czy propionowy) są utleniane do związków, które następnie mogą zostać włączone w szlam metanoge-

nezy - ditlenku węgla, wodoru i kwasu octowego. Bakterie należące do tej grupy rozmnażają się bardzo wolno z uwagi na mały zysk energetyczny jaki daje reakcja utleniania VFA (McInerney, Bryant et al. 1981).

Mikroorganizmy uczestniczące w hydrolizie i kwasogenezie należą różnych grup taksonomicznych. Ponieważ ich wzrost jest stosunkowo szybki w porównaniu z archeonami metanogennymi i bakteriami syntroficznymi w praktyce bada się jedynie ogólną liczbę bakterii w bioreaktorze przyjmując, że reprezentują one w głównej mierze mikroorganizmy biorące udział w początkowych etapach przemiany materii organicznej.

Badanie populacji mikroorganizmów w reaktorach, w których nastąpiło załamanie procesu produkcji menu może dostarczyć odpowiedzi na pytanie, który z etapów procesu stanowił najwolniejszy element łańcucha i doprowadził do sytuacji kryzysowej.

Na podstawie składu gatunkowego populacji w systemach działających stabilnie z wysoką wydajnością możliwe byłoby dobranie mikroorganizmów do stworzenia szczepionek dla instalacji mających kłopoty z stabilną pracą.

Skład populacji mikroorganizmów biorących udział w fermentacji metanowej stanowi również ważną część danych wejściowych dla modeli matematycznych takich jak ADM1. Równania różniczkowe opisujące poszczególne procesy przemiany materii organicznej zawierają w większości jako jeden z parametrów ilość bakterii zaangażowanych w dany proces. Dlatego też trwają prace nad stworzeniem algorytmu który umożliwiłby integrację wyników uzyskanych metodami biologii z modelami takimi jak ADM1 (Lubken, Wichern et al. 2007).

4.1. METODY HODOWLANE W BADANIU SKŁADU POPULACJI MIKROORGANIZMÓW

4.1.1. Hodowla mikroorganizmów ściśle beztlenowych

Wyizolowanie czystych kultur mikroorganizmów ściśle beztlenowych było możliwe dzięki opracowaniu przez Hungate'a techniki hodowlanej, nazwanej potem jego imieniem. Pierwotnie technika ta była wykorzystywana do izolacji mikroorganizmów celulolitycznych z treści żołądka przeżuwaczy (Hungate 1950). Jednakże w późniejszym czasie została z powodzeniem zastosowana do izolacji czystych kultur archeonów metanogennych.

Podstawowym założeniem tej metody hodowlanej jest prowadzenie wszelkich prac pod strumieniem gazu (azot, ditlenek węgla, wodór) nie zawierającego tlenu. Śladowe ilości tlenu mogą być usunięte przez zastosowanie płuczki z odpowiednim roztworem zredukowanego chromu lub też przez przepuszczenie gazu przez złożo miedziowe w temperaturze 300 °C. Naczynia, w których prowadzono hodowlę, były szczelnie zamykane korkami gumowymi. Dla ułatwienia pracy

wprowadzono w końcu naczynia z zamknięciem typu „serum bottle”, umożliwiające dodatkowe zabezpieczenie przez metalową obejmę (Miller and Wolin 1974). Zastosowanie tej modyfikacji pozwoliło na prowadzenie hodowli mikroorganizmów beztlenowych pod zwiększonym ciśnieniem.

Dzięki technice Hungate’a możliwe było uzyskanie czystych kultur bakterii metanogennych oraz mikroorganizmów utleniających kwasy organiczne, stanowiących ważne ogniwo w beztlenowym łańcuchu przemiany materii (Paynter and Hungate 1968; Boone and Bryant 1980).

4.1.2. Najbardziej prawdopodobna liczba

Dzięki opracowaniu metody hodowli mikroorganizmów ściśle beztlenowych możliwe było również badanie ich liczebności w ekosystemach beztlenowych. Liczbę mikroorganizmów szacowano początkowo dzięki metodzie najbardziej prawdopodobnej liczby (NPL). Metoda NPL charakteryzuje się stosunkowo niskimi wymaganiami sprzętowymi (naczynia hodowlane, inkubatory, urządzenia do sterylizacji), dzięki czemu laboratoria o ograniczonych możliwościach sprzętowych mogą sobie pozwolić na jej wykorzystanie.

Użycie metody NPL do szacowania ilości mikroorganizmów zaproponowano pod koniec lat 40 XX wieku (Cochran 1950), choć podstawy teoretyczne zostały opracowane już w roku 1915. Zasada działania tej metody oparta jest na rachunku prawdopodobieństwa. Metoda NPL w ujęciu mikrobiologicznym pozwala na szacowanie gęstości hodowli mikroorganizmów bez konieczności ich bezpośredniego liczenia (np. pod mikroskopem) i sprowadza się do przygotowania serii rozcieńczeń badanego materiału i wykonania posiewów w odpowiedniej ilości powtórzeń. Metoda NPL opiera się na następujących założeniach:

- rozlokowanie mikroorganizmów w hodowli jest równomierne i losowe,
- pojedyncza komórka jest zdolna do zapoczątkowania nowej hodowli.

W przypadku mikroorganizmów założenia te nie zawsze są spełnione ponieważ w hodowlach często obserwuje się struktury wielokomórkowe, a także nie wszystkie komórki bakteryjne są zdolne do podziału. Dlatego też wyniki uzyskane tą metodą są z reguły zaniżone (Amann, Ludwig et al. 1995). Mikroorganizmy zaangażowane w proces fermentacji metanowej często wykazują tendencję do tworzenia biofilmów oraz granulek o charakterze podobnym do bofilmu (Saiki, Iwabuchi et al. 2002; Chudy, Jabłoński et al. 2011). Utworzenie takich struktur znacznie utrudnia uzyskanie jednorodnej mieszaniny nie powiązanych ze sobą komórek.

Metodą NPL badano liczebność populacji bakterii metanogennych w reaktorach utylizujących maślankę, osadach glebowych pól ryżowych czy instalacji do obróbki ścieków papierniczych (Chartrain and Zeikus 1986; Grosskopf, Janssen et al. 1998). W próbkach gleby pochodzących z pól ryżowych liczebność bakte-

rii metanogennych w przeliczeniu na 1 g próbki wahała się w przedziale od 10^5 do 10^7 (Grosskopf, Janssen et al. 1998). W przypadku reaktorów metanogennych ilość metanogenów była znacznie wyższa. W systemie rozkładającym odpady papiernicze zanotowano odpowiednio 10^{12} bakterii utleniających wodór oraz 10^9 bakterii acetoklastycznych (Stefanie, Werner et al. 1998). Analogicznie w układzie utylizującym serwatkę odnotowano 10^7 bakterii acetoklastycznych i 10^8 bakterii hydrogenotroficznych (Chartrain and Zeikus 1986). Analiza składu gatunkowego mikroorganizmów, które wyhodowano metodą NPL wykazała, że nie są to czyste kultury, lecz mieszanki złożone często z więcej niż dwóch grup mikroorganizmów (Stefanie, Werner et al. 1998). Co ciekawe, w powyższych badaniach liczba bakterii hydrogenotroficznych zawsze przewyższała liczebnie archeony acetoklastyczne, co stoi w sprzeczności z wynikami uzyskanymi dla reaktorów metanogennych metodami biologii molekularnej (Ariesyady, Ito et al. 2007; Lubken, Wichern et al. 2007). Zależność taka może wynikać z nieodpowiedniego przygotowania warunków hodowli przyjętych do testów NPL, które faworyzowały wzrost mikroorganizmów hydrogenotroficznych. W przypadku zastosowania mieszaniny wodoru i ditlenku węgla jako substratów dla archeonów matnogennych dostępność wodoru w hodowli jest około 1000 wyższa niż w przypadku stabilnie działających reaktorów (odpowiednio około 1 bara dla testów hodowlanych i 1 milibara dla reaktorów metanogennych). Dlatego też archeony hydrogenotroficzne będą rosły dużo szybciej w porównaniu z archeonami acetoklastycznymi w warunkach testowych.

Pomimo ograniczonej dokładności, metoda NPL była szeroko stosowana do badania liczebności bakterii w środowiskach beztlenowych do końca XX wieku. W późniejszych badaniach była stopniowo wypierana przez techniki biologii molekularnej (w szczególności real time PCR).

4.1.3. Zliczanie bezpośrednie w mikroskopie fluorescencyjnym

W szlaku metabolicznym prowadzącym do powstania metanu występują koenzymy charakterystyczne dla mikroorganizmów metanogennych. Dwa ze związków biorących udział w procesie powstawania metanu wykazują właściwości fluorescencyjne: koenzymy F_{420} i F_{430} . Ponadto fluorescencja koenzymu F_{420} zależna jest od stanu utlenienia tej cząsteczki. Właściwości tych dwóch koenzymów pozwalają na badanie mikroorganizmów metanogennych z wykorzystaniem mikroskopii oraz spektroskopii fluorescencyjnej.

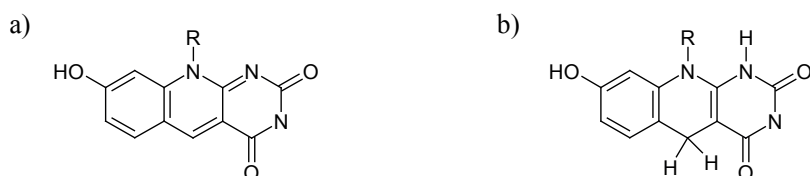
Koenzym F_{420}

Koenzym F_{420} należy do grupy związków ryboflawinowych i w łańcuchu reakcji prowadzących do powstania metanu pełni rolę przenośnika równoważników redukcyjnych (Deppenmeier 2002). Występowanie tego związku jest charakterystyczne dla bakterii metanogennych, choć spotyka się również jego śladowe ilości *Streptomyces griseus*, *actinomyces* oraz kilku archeonów niematanogennych (Peck

1989). W komórkach archeonów występują również analogi tego związku różniące się ilością cząsteczek kwasu glutaminowego w łańcuchu bocznym.

Koenzym F_{420} bierze udział w reakcji przenoszenia elektronów z cząsteczkowego wodoru (lub kwasu mrówkowego) na atom węgla związany z tetrahydro-metanopteryną (H_4MPT) (Deppenmeier 2002). Reakcja powtarza się cyklicznie do momentu zredukowania atomu węgla związanego z H_4MPT do grupy metylowej.

Właściwości fluorescencyjne koenzymu F_{420} wykazuje jedynie jego utleniona forma. Związek ten posiada charakterystyczne maksimum absorpcji światła przy długości fali 420 nm, oraz maksimum fluorescencji przy około 480 nm (w zależności od pH środowiska).

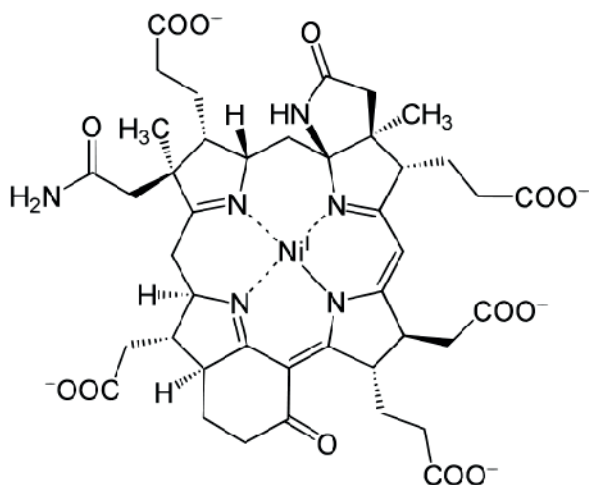


Rysunek 3. Struktura chemiczna koenzymu F_{420} ; a) forma utleniona; b) forma zredukowana. R- łańcuch boczny.

Dzięki temu, że koenzym F_{420} jest cząsteczką charakterystyczną dla szlaku metanogenezy, analiza fluorescencji tej cząsteczki może być wykorzystywana do określenia kondycji populacji mikroorganizmów w reaktorach metanogennych. Peck et al. zaprojektował zestaw sond do śledzenia zmian we fluorescencji koenzymów F_{420} i NAD-H podczas fermentacji pół ciągłej glukozy (Peck and Chynoweth 1990). W trakcie eksperymentu obserwowano spadek fluorescencji wynikający ze zmiany proporcji między formą zredukowaną i utlenianą koenzymu F_{420} , a następnie powrót do stanu wyjściowego. Jednakże doświadczenia te nie okazały się przydatne w przewidywaniu przeciążenia reaktora metanogennego. Podczas zakwaszenia reaktora dozowanie świeżego substratu powodowało zmiany fluorescencji podobne do tych obserwowanych podczas prawidłowego przebiegu fermentacji metanowej.

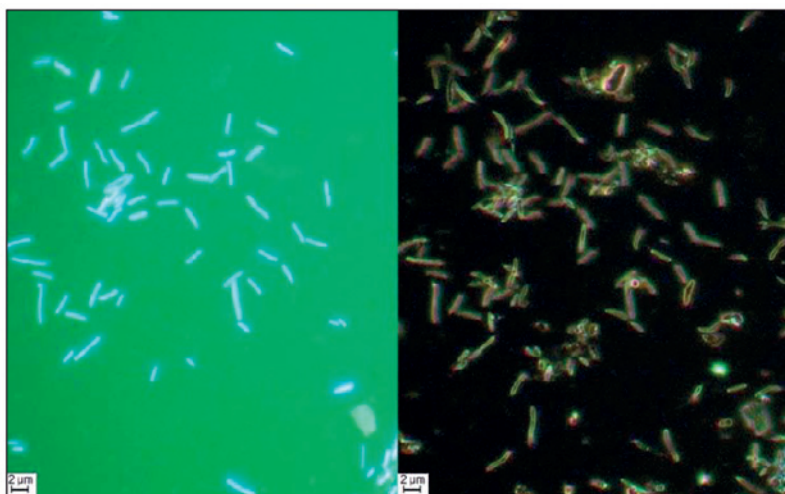
Koenzym F_{430}

Koenzym F_{430} jest to pochodna porfiryny zawierająca w swoim centrum atom niklu. Związek ten stanowi grupę prostetyczną będącą częścią centrum aktywnego enzymu reduktazy metylo-koenzymu M. Białko to jest odpowiedzialne za uwolnienie cząsteczki metanu związanego koenzymem M przy jednoczesnym utworzeniu wiązania disulfidowego między cząsteczkami koenzymu M i koenzymu B (Deppenmeier 2002). Reakcja ta jest wspólna zarówno dla mikroorganizmów wytwarzających metan na drodze redukcji związków jednowęglowych, jak i archeonów dokonujących dekarboksylacji kwasu octowego. Rysunek 4 przedstawia strukturę chemiczną cząsteczki koenzymu F_{430} .



Rysunek 4. Struktura cząsteczki koenzymu F₄₃₀

Dzięki temu, że występowanie opisanych wyżej związków jest charakterystyczne dla archeonów metanogennych, obserwacja autofluorescencji bakterii metanogennych stała się jednym z kryteriów identyfikacji tych mikroorganizmów w reaktorach beztlenowych. Rozwiązanie takie zaproponowano pod koniec lat 70 XX wieku (Mink and Dugan 1977). Rysunek 5 przedstawia mikroorganizmy wchodzących w skład złoża metanogennego.



Rysunek 5. Populacja bakterii z biofilmu powstałego w reaktorze beztlenowym na powierzchni polistyrenowej. Po lewej: zdjęcie przedstawiające autofluorescencję komórek bakteryjnych przy użyciu zestawu filtrów FS05 firmy (Carl Zeiss); po prawej: ten sam obszar obserwowany w technice ciemnego pola.

Do dnia dzisiejszego jest to jedna z technik pozwalających na identyfikację bakterii metanogennych. W Tabeli 17 zebrano wyniki uzyskane tą techniką przez wybranych autorów.

Tabela 17. Ilość bakterii wykazujących autofluorescencję w wybranych środowiskach.

Ilość bakterii metanogennych [kom. x ml ⁻¹]	Procent populacji	Warunki fermentacji	Źródło
1,2 x 10 ⁹	5%	ciągła, 41°C, buraki cukrowe	(Demirel, Ergun et al. 2009)
4,6 x 10 ⁸	16,6%	ciągła, 55 °C, wywar gorzelniany	(Solera, Romero et al. 2001)
1,0 x 10 ⁷ *		półciągła, 37 °C, glukoza	(Chudy, Jabłoński et al. 2011)

*) - wartość podana w ilości komórek na 1 cm² biofilmu.

4.2. BIOLOGIA MOLEKULARNA W ANALIZIE POPULACJI MIKROORGANIZMÓW METANOGENNYCH

Zastosowanie metod hodowlanych, jak również obserwacja mikroskopowa autofluorescencji mikroorganizmów metanogennych daje pewne informacje na temat składu populacji drobnoustrojów w środowisku metanogennym. Należy jednak pamiętać o istotnych ograniczeniach tych metod. Hodowle dają często wynik znacznie zaniżony w porównaniu z obserwacjami mikroskopowymi (nawet o dwa rzędy wielkości), co jest wynikiem selektywności stosowanych podłoży (brak możliwości hodowli większości gatunków mikroorganizmów) oraz występowaniem mikroorganizmów w większych skupiskach lub w formie nie tworzącej koloni na podłożach mikrobiologicznych (Amann, Ludwig et al. 1995). Obserwacja autofluorescencji lepiej odzwierciedla ilość badanych mikroorganizmów, jednakże ogranicza się do odróżnienia archeonów metanogennych od pozostałych, nie dając bardziej szczegółowych informacji o bakteriach należących do innych grup troficznych.

Zastosowanie technik biologii molekularnej pozwala na pokonanie tych wad, choć ich użycie wiąże się również z innymi niedogodnościami. Do najczęściej wykorzystywanych technik w analizie populacji mikroorganizmów w środowisku metanogennym należą: fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ* (ang. FISH - fluorescence *in situ* hybridisation), reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym (ang. *real time* PCR - real time polymerase chain reaction) oraz tworzenie bibliotek genowych. Pierwsza z nich pozwala na oszacowanie ilości wybranych grup mikroorganizmów, natomiast biblioteki genowe dostarczają dokładniejszych informacji o składzie ilościowym i jakościowym populacji mikroorganizmów.

Najczęściej wykorzystywaną cząsteczką docelową przedstawionych technik jest gen 16S rRNA lub sama cząsteczka rRNA. Cząsteczka 16S RNA stanowi część małej podjednostki rybosomu - struktury niezbędnej do syntezy białka we wszystkich znanych mikroorganizmach. Sekwencja kodująca cząsteczkę 16S RNA wchodzi w skład operonu *rrn* (Rysunek 6). W skład tego operonu wchodzi dodatkowo sekwencje 5S RNA, 23S RNA, opcjonalnie tRNA oraz sekwencje usuwane w procesie dojrzewania RNA (Neumann, Gierl et al. 1983). Operon jest transkrybowany jako cząsteczka prekursorowa, po czym następuje jej cięcie na krótsze fragmenty.



Rysunek 6. Schematyczne rozłożenie sekwencji cząsteczek RNA w obrębie operonu *rrn* *Escherichia coli*.

Operon *rrn*, w przeciwieństwie do większości operonów bakteryjnych, może występować w większej ilości kopi (od 1 do około 15) (Krieg, Brenner et al. 2005). Ilość kopii operonu *rrn* może ulegać zmianom między blisko spokrewnionymi szczepami, co może powodować błędy w szacowaniu ilości populacji w oparciu o technikę *real time* PCR, jeżeli jako matrycę wykorzystuje się DNA genomowe mikroorganizmów, a nie materiał po odwrotnej transkrypcji RNA rybosomowego (DNA syntetyzowane na matrycy RNA).

Sekwencja kodująca genu 16S rRNA ma wielkość około 1,5 tysiąca par zasad, co jest ilością wystarczającą do prowadzenia analiz filogenetycznych pomiędzy organizmami. Mimo to analiza sekwencji genu 16S RNA nie może być jedynym kryterium przy oznaczaniu przynależności gatunkowej mikroorganizmów (Amann, Ludwig et al. 1995) ze względu na występowanie bardzo podobnych sekwencji między mikroorganizmami należącymi do różnych gatunków. W cząsteczce tej występują zarówno regiony konserwatywne, jak również fragmenty o znacznej zmienności. Dzięki temu możliwe jest przyrównywanie sekwencji znacznie różniących się od siebie. Występowanie regionów o małej zmienności pozwala również na projektowanie starterów i sond o szerokiej specyficzności. Cecha ta jest szczególnie ważna w przypadku zastosowania techniki tworzenia bibliotek genowych, których kompletność uzależniona jest w znacznym stopniu od selektywności starterów użytych do namnażania materiału genetycznego.

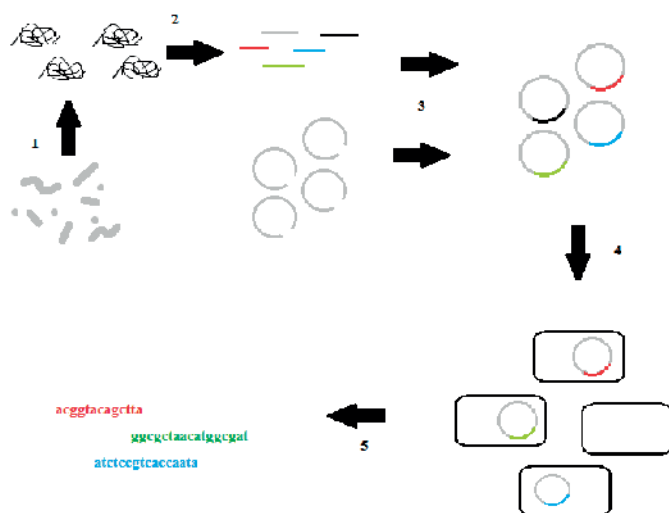
4.2.1. Biblioteki genowe

Tworzenie bibliotek genowych jest dobrą techniką stosowaną w analizie populacji mikroorganizmów, jeżeli dysponuje się znikomą ilością informacji na temat badanego materiału. Dzięki tej technice, w połączeniu z sekwencjonowaniem

uzyskanych klonów, możliwa jest identyfikacja mikroorganizmów składających się na populację do poziomu rodzaju, a czasami również gatunku. Informacji takich nie można uzyskać przy użyciu techniki FISH lub *real time* PCR.

Analiza populacji mikroorganizmów z wykorzystaniem biblioteki genowej często przebiega wedle następującego schematu (schemat na Rysunku 7):

1. **Pobranie i izolacja DNA z próby.** Próbkę pobierana z danego środowiska musi być dla niego reprezentatywna. Do izolacji materiału genetycznego dostępnych jest obecnie na rynku wiele zestawów komercyjnych, których użycie jest stosunkowo proste i szybkie. Należy jednak pamiętać, że DNA nie izoluje się równie dobrze ze wszystkich mikroorganizmów i może zaistnieć potrzeba modyfikacji protokołu dostarczonego przez producenta. Dodatkowo próbki środowiskowe mogą zawierać cząsteczki utrudniające izolację dobrego jakościowo DNA (kwasy humusowe, jony metali ciężkich).
2. **Namnożenie ilości dostępnego materiału w reakcji PCR** z wykorzystaniem starterów o szerokiej specyficzności. Etap ten warunkuje w dużym stopniu kompletność biblioteki genowej. Uzyskane proporcje między ilością klonów należących do różnych gatunków mikroorganizmów mogą ulec zaburzeniu z uwagi na różnice w specyficzności i wydajności starterów DNA w stosunku do sekwencji różnych genów *rrn*.
3. **Połączenie produktów reakcji PCR z wektorami** (cząsteczkami DNA, najczęściej plazmidami, zdolnymi do namnażania w bakteriach). Połączenie cząsteczki DNA z wektorem zapobiega jej degradacji po wprowadzeniu do bakterii i umożliwia jej powielenie.
4. **Transformacja komórek bakteryjnych.** Wprowadzenie materiału genetycznego do komórek bakteryjnych pozwala na rozdzielenie mieszaniny różnych sekwencji uzyskanych na etapie reakcji PCR na pojedyncze kopie. Przyjmuje się, że pojedyncza komórka bakteryjna jest w stanie przyjąć tylko jedną cząsteczkę wektora, dlatego też po wysianiu bakterii w odpowiednim rozcieńczeniu powstałe na płytkach kolonie powinny zawierać powielony materiał genetyczny pochodzący pierwotnie z jednej cząsteczki wektora.
5. **Analiza sekwencji klonów** uzyskanych w trakcie transformacji. Do analizy uzyskanych klonów można wykorzystywać różne techniki. Najwięcej informacji można uzyskać przez przeprowadzenie klonowania, jednakże jest to również najdroższa możliwość. Innymi metodami stosowanymi w analizie fragmentów biblioteki są: analiza długości fragmentów powstałych w wyniku trawienia enzymami restrykcyjnymi, elektroforeza żelowa w gradiencie denaturującym (dostarcza informacji na temat temperatury topnienia fragmentów DNA) czy hybrydyzacja do komplementarnych sond DNA.



Rysunek 7. Schemat postępowania w trakcie analizy populacji mikroorganizmów z wykorzystaniem bibliotek genowych.

Przy budowie biblioteki genowej wykorzystywane są startery reakcji PCR o szerokiej specyficzności. Przykłady takich starterów podane są w tabeli 18. Startery te są komplementarne do fragmentów genu kodującego 16S RNA o małej zmienności, przez co dzięki ich wykorzystaniu możliwe jest powielanie materiału należącego do różnych, nawet bardzo odległych mikroorganizmów.

Tabela 18. Startery o szerokiej specyficzności wykorzystywane w tworzeniu bibliotek genowych

Orga-nizm	Nazwa	Sekwencja	Pozycja (względem genu <i>E. coli</i>)	Źródło
Archae	69Fmod	TGCTCCCCGCCAATTCC	15–32	Klocke 2008 (Klocke, Nettmann et al. 2008)
	ARC934R-mod	YGAYTAAGCCATGCRA GT	915–933	
Archae	A109f	ACKGCTCAGTAACACGT	109–125	Grosskopf 1998 (Grosskopf, Janssen et al. 1998)
	A934b	GTGCTCCCCGCCAATTCCT	915–934	
Bacteria	331F	TCCTACGGGAGGCAGCAGT	331–350	Nadkarni 2002 (Nadkarni, Martin et al. 2002)
	797R	GGACTACCAGGGTATCTA-ATCCTGTT	771–797	

Technikę tworzenia bibliotek genowych zastosowano do analizy populacji mikroorganizmów w reaktorach beztlenowych (Klocke, Nettmann et al. 2008), próbkach gleby pól ryżowych (Grosskopf, Janssen et al. 1998) oraz reaktorach beztlenowych ze złożem immobilizowanym w skali laboratoryjnej (Sawayama, Tsukahara et al. 2006). W przypadku gleby z pól ryżowych dominującą grupą archeonów metanogennych były mikroorganizmy z grupy *Methanosaeta*, co jest wynikiem niskiego stężenia kwasu octowego, niedogodnego dla rozwoju archeobakterii *Methanosarcina*. W reaktorach metanogennych dominującymi grupami mikroorganizmów metanogennych były archeony należące do rzędów *Methanosarcinales* i *Methanomicrobiales*. W przypadku złoża immobilizowanego największą grupę mikroorganizmów metanogennych stanowiły gatunki z rodzaju *Methanosarcina*.

4.2.2. Reakcja łańcuchowa polimerazy

PCR jest obecnie jednym z podstawowych narzędzi wykorzystywanych w biologii molekularnej. Pozwala na szybkie i precyzyjne powielenie wybranego fragmentu materiału genetycznego, który można następnie wykorzystać do określonych celów. W przypadku badania mieszanej populacji mikroorganizmów technikę PCR można wykorzystać do powielenia sekwencji określonych fragmentów DNA, które następnie zostaną wykorzystane do stworzenia biblioteki genowej. Możliwe jest również śledzenie kopii danej sekwencji w materiale wyizolowanym z danego środowiska i na tej podstawie szacowanie ilości mikroorganizmów w badanym materiale. Szczególnie przydatną techniką w tym przypadku jest *real time* PCR.

W trakcie reakcji PCR zachodzą następujące zjawiska:

1. denaturacja termiczna matrycy - w tym etapie następuje rozplecenie struktury drugorzędowej matrycy w celu umożliwienia dostępu sekwencji docelowej oligonukleotodom pełniącym rolę starterów oraz enzymowi polimerazy DNA. Do zerwania wiązań wodorowych wytworzonych pomiędzy zasadami azotowymi wykorzystywana jest wysoka temperatura (90-96 °C).
2. przyłączenie starterów - do działania enzymu polimeryzującego wymagana jest obecność pary krótkich fragmentów DNA komplementarnych do sekwencji docelowej. Sekwencja starterów warunkuje jaki produkt powstanie w reakcji PCR. Temperatura na tym etapie reakcji jest dobierana indywidualnie od używanych starterów i zależy od sekwencji, z jaką mają się one łączyć. Etap ten warunkuje specyficzność reakcji PCR, czyli czy otrzymany produkt jest zgodny z produktem oczekiwanym.
3. polimeryzacja - ostatnim etapem cyklu jest polimeryzacja nowej nici DNA na materiale matrycowym. Polimeryzacja jest prowadzona w temperaturze odpowiedniej dla danego enzymu polimerazy (dla polimerazy Taq jest to temp 72 °C).

Etapy te powtarzane są cyklicznie, co prowadzi do przyrostu produktów reakcji w tempie logarytmicznym. Ponieważ ilość powstających produktów na danym etapie reakcji jest zależna od początkowej ilości matrycy, możliwe jest określenie wejściowej ilości kopii matrycy na podstawie obserwacji szybkości przyrostu ilości produktów. Zależność ta jest wykorzystywana w technice *real time* PCR.

Do śledzenia zmian w ilości produktu w technice *real time* PCR wykorzystywany jest pomiar fluorescencji. Reakcję polimeryzacji prowadzi się w specjalnego rodzaju termocyklerach z wbudowanym fluorymetrem. W zależności od wybranego wariantu przyrost fluorescencji może mieć różne podłoże molekularne.

Najprostszym wariantem techniki *real time* PCR jest metoda wykorzystująca barwnik SYBR Green w procesie detekcji produktów. SYBR Green jest barwnikiem fluorescencyjnym, którego intensywność fluorescencji znacznie wzrasta, jeżeli tworzy kompleks z dwuniciowym DNA. Dzięki temu możliwe jest śledzenie ilości powstających w reakcji PCR produktów. Technika wykorzystująca SYBR Green jest stosunkowo tania (wymaga jedynie dodatkowo barwnika w porównaniu z standardową reakcją PCR), jednakże czułość i specyficzność tej metody jest niższa w porównaniu z systemami wykorzystującymi sondy hybrydizacyjne. Specyficzność produktów reakcji w tym systemie można potwierdzić przez wykonanie krzywej topnienia.

W pozostałych systemach fluorescencja jest wynikiem zastosowania dodatkowej sondy oligonukleotydowej połączonej ze związkiem fluorescencyjnym. Dodatkowa sonda jest komplementarna do fragmentu znajdującego się w środkowej części powstającego produktu, a emisja światła może zajść jedynie jeżeli sonda przyłączy się do sekwencji docelowej. Rozwiązanie takie poprawia pewność wyników uzyskanych metodą *real time* PCR, ponieważ specyficzność otrzymanego sygnału zależy jednocześnie od użytych starterów, jak również od sondy fluorescencyjnej. Poniżej przedstawione są dostępne komercyjnie systemy wykorzystujące dodatkowe sondy:

- TaqMan - do sondy oligonukleotydowej dołączony jest barwnik fluorescencyjny oraz cząsteczka wygaszająca fluorescencję. Po połączeniu z matrycą sonda jest degradowana przez polimerazę, dzięki czemu następuje rozdzielanie cząsteczki fluoryzującej od wygaszacza co umożliwia jej świecenie;
- Molecular beacon - cząsteczka sondy zbudowana jest podobnie do sondy TaqMan, z tym że końce 3' i 5' sondy są do siebie komplementarne, dzięki czemu przy braku matrycy tworzą strukturę „spinki do włosów”, co skutkuje wygaszeniem fluorescencji. Gdy następuje hybrydizacja sondy do sekwencji docelowej w matrycy, znacznik fluorescencyjny jest oddzielany od wygaszacza, co umożliwia fluorescencję;
- HyBeacons - sonda zbudowana jest z oligonukleotydu połączonego ze związkiem fluorescencyjnym, który emituje światło jedynie wtedy, gdy sonda jest połączona z komplementarnym fragmentem matrycy;

- Scorpion - w tym systemie sonda zawierająca cząsteczkę fluorescencyjną i wygaszacz jest połączona z starterem przy pomocy odpowiedniego blokera, w efekcie sonda dołączana jest do powstającego produktu reakcji. Istnieje również modyfikacja tej metody, w której sonda złożona jest z dwóch cząsteczek: jednej zawierającej fluorofor połączonej ze starterem oraz cząsteczki komplementarnej, zawierającej wygaszacz.
- HybProbes - w tej metodzie wykorzystywane są dwie sondy oligonukleotydowe, wyznakowane odpowiednimi barwnikami fluorescencyjnymi. Sondy te hybrydują do sekwencji położonych blisko siebie na matrycy DNA, dzięki czemu możliwe jest przekazanie energii fluorescencji z jednego barwnika na drugi. W metodzie tej śledzi się przyrost fluorescencji barwnika, który uzyskuje energię na skutek rezonansowego transferu energii fluorescencji.

Opracowano również kilka innych rozwiązań, które zasadą działania nie odbiegają znacząco od wyżej opisanych metod.

Obecnie opracowano szereg zestawów starterów i sond hybrydyzacyjnych przeznaczonych do badania sekwencji 16S RNA mikroorganizmów obecnych w środowisku beztlenowym. W Tabeli 19 zebrano ważniejsze zestawy starterów i sond używanych w analizie populacji bakterii metanogennych.

Badania z wykorzystaniem techniki *real time* PCR nad populacją archeonów metanogennych w reaktorach beztlenowych wykazały obecność około 5×10^9 kopii genu gatunków z rodziny *Methanosarcinales*, odpowiedzialnych za produkcję metanu w wyniku cięcia aecotkastycznego (Yu, Kim et al. 2006). Biorąc pod uwagę, że ilość kopii genu *rrn* w genomie mikroorganizmów może wahać się od kilku do kilkunastu, wyniki te są zgodne z obserwacjami uzyskanymi przez innych autorów przez zliczanie ilości bakterii wykazujących właściwości autofluorescencyjne (Solera, Romero et al. 2001; Demirel, Ergun et al. 2009).

Tabela 19. Zestawy starterów wykorzystywane w reakcji PCR w czasie rzeczywistym.

Grupa docelowa	Nazwa	Sekwencja	Technika detekcji	Pozycja (względem genu <i>E. coli</i>)	Źródło
Archaea	ARC787F	ATTAG ATACC CSBGT AGTCC	TaqMan	787– 806	(Yu, Lee et al. 2005)
	ARC1059R	GCCAT GCACC WCCTC T		1044– 1059	
Bacteria	BAC338F	ACTCC TACGG GAGGC AG	TaqMan	338– 354	(Yu, Lee et al. 2005)
	BAC805R	GACTA CCAGG GTATC TAATC C		785– 805	
Methanococcales	MCC495F	TAAGG GCTGG GCAAG T	TaqMan	495– 510	(Yu, Lee et al. 2005)

Grupa docelowa	Nazwa	Sekwencja	Technika detekcji	Pozycja (względem genu <i>E. coli</i>)	Źródło
	MCC832R	CACCT AGTYC GCARA GTTA		813– 832	
Methanobacteriales	MBT857F	CGWAG GGAAG CTGTT AAGT	TaqMan	857– 875	(Yu, Lee et al. 2005)
	MBT1196R	TACCG TCGTC CACTC CTT		1179– 1196	
Methanomicrobiales	MMB282F	ATCGR TACGG GTTGT GGG	TaqMan	282– 299	(Yu, Lee et al. 2005)
	MMB832R	CACCT AACGC RCATH GTTA C		812– 832	
Methanosarcinales	MSL812F	GTAAA CGATR YTCGC TAGGT	TaqMan	812– 831	(Yu, Lee et al. 2005)
	MSL1159R	GGTCC CCACA GWGTA CC		1143– 1159	
Methanosarcinaceae	Msc380F	GAAAC CGYGA TAAGG GGA	TaqMan	380– 397	(Yu, Lee et al. 2005)
	Msc828R	TAGCG ARCAT CGTTT ACG		811– 828	
Methanosaetaceae	Mst702F	TAATC CTYGA RGGAC CACCA	TaqMan	702– 721	(Yu, Lee et al. 2005)
	Mst862R	CCTAC GGCAC CRACM AC		846– 862	
Methanoculleus	298F	GGAGCAAGAGCCCG-GAGT	SYBR Green	298–315	(Franke-Whittle, Goberna et al. 2009)
	586R	CCAAGAGACTTAACA-ACCCA		586–606	
Methanosarcina	240F	CCTATCAGGTAGTAGTGG-GTGTAAAT	SYBR Green	240–264	(Franke-Whittle, Goberna et al. 2009)
	589R	CCCGGAGGACTGACCA-AA		589–606	
Methanothermobacter	410F	CTCTTAACGGGGTG-GCTTTT	SYBR Green	410–440	(Franke-Whittle, Goberna et al. 2009)
	667R	CCCTGGGAGTACCTC-CAGC		667–686	

4.2.3. Fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ*

Ważną metodą analizy populacji mikroorganizmów jest fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ* (ang. fluorescence *in situ* hybridization - FISH). W technice tej możliwe jest rozróżnienie poszczególnych rodzajów mikroorganizmów w obrazie mikroskopowym dzięki wyznakowaniu ich odpowiednimi sondami skierowanymi na cząsteczki 16S RNA, połączonymi z barwnikami fluorescencyjnymi. Przy odpowiednio dobranym zestawie sond możliwe jest określenie udziału w populacji mikroorganizmów z określonych grup troficznych (np. utleniających lotne kwasy tłuszczowe). Przy odpowiednim utrwaleniu preparatów możliwe jest również uzyskanie informacji o rozkładzie przestrzennym bakterii w określonym ekosystemie. Dzięki zastosowaniu tej techniki udało się zobrazować rozkład archeonów metanogennych w przekrojach granulek złoża metanogenego z reaktorów pracujących w oczyszczalniach ścieków (Saiki, Iwabuchi et al. 2002).

Procedura postępowania w przygotowaniu preparatów do metody FISH jest następująca:

- 1) **Utrwalenie próbki.** Materiał biologiczny poddaje się działaniu środków chemicznych, mającemu na celu zachowanie struktury morfologicznej badanej próbki i umożliwienie dostępu sond do cząsteczek docelowych. W utrwalaniu wykorzystuje się dwa rodzaje środków chemicznych: wytrącające (takie jak alkohole etylowy i metylowy) oraz sieciujące (aldehyd mrówkowy i inne aldehydy). Większość bakterii Gram-ujemnych oraz archeonów może z powodzeniem być utrwalana z użyciem 3% roztworu formaldehydu. Jednakże podejście takie nie sprawdza się w przypadku bakterii Gram-dodatnich, dla których znacznie lepszym rozwiązaniem jest użycie 50% alkoholu etylowego. Zbyt długie wystawienie komórek na działanie środków sieciujących może również prowadzić do kłopotów z hybrydyzacją. Bardziej szczegółowe informacje na temat przygotowania preparatów do metody FISH można znaleźć w publikacji autorstwa Rudolfa Amanna (Amann, Ludwig et al. 1995).
4. **Naniesienie komórek na szkiełko mikroskopowe.** W zależności od tego, jakie informacje mają być uzyskane, z preparatu mikroskopowego czynności na tym etapie będą się różnić.
 - Jeżeli doświadczenie ma dostarczyć informacji o budowie przestrzennej populacji mikroorganizmów, najlepszym wyjściem jest przygotowanie skrawków parafinowych badanego materiału. Po usunięciu roztworu utrwalającego preparat jest odwadniany w szeregu alkoholowym i ksylenie, a następnie zatapiany w parafinie. Następnie bloczek parafinowy jest cięty na skrawki, które są nanoszone na szkiełko mikroskopowe. Po usunięciu parafiny przez płukanie w ksylenie i alkoholu etylowym, próbkę można poddać hybrydyzacji.

- Jeżeli celem doświadczenia jest uzyskanie informacji o udziale ilościowym bakterii poszczególnych grup, preparat należy poddać homogenizacji, a następnie po odpowiednim rozcieńczeniu należy przenieść na szkiełko mikroskopowe lub odpowiedni filtr. W zależności od tego jak dużo jest mikroorganizmów w próbce, preparat należy poddać zagęszczeniu (np. woda morska) lub rozcieńczeniu, aby w polu widzenia mikroskopu znajdowało się od 20 do 150 mikroorganizmów.

5. Hybrydyzacja sondy. Hybrydyzację sondy połączonej ze znacznikiem fluorescencyjnym standardowo przeprowadza się w temperaturze 45 °C. Ponieważ temperatura topnienia sond jest zależna zawartości guaniny i cytozyny, aby poprawić specyficzność hybrydyzacji sond dużej zawartości tych zasad, stosuje się w buforze dodatek związków osłabiających siłę wiązań wodorowych takich jak formamid. Podobny efekt można osiągnąć zmieniając temperaturę prowadzenia reakcji, jednakże ze względów technicznych łatwiejszym rozwiązaniem wydają się wykorzystanie formamidu. Proces hybrydyzacji w przypadku mikroorganizmów prowadzi się przez czas około 90 min. Następnie roztwór sondy jest opłukiwany. Przed przystąpieniem do obserwacji preparatu w mikroskopie fluorescencyjnym preparat może być dodatkowo wybarwiony barwnikiem DAPI (4',6-diamidyno-2-fenylindol) w celu wizualizacji całkowitej ilości mikroorganizmów. Często preparaty umieszcza się również w roztworze zawierającym związek hamujący ubytek fluorescencji barwników fluorescencyjnych (np. diaminobenzen).

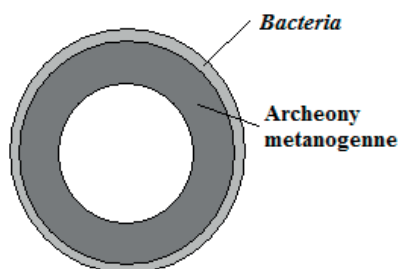
Obecnie opracowano wiele grup sond przystosowanych do znakowania mikroorganizmów należących do ważnych grup troficznych w środowisku beztlenowym. Ważniejsze grupy mikroorganizmów, dla których opracowano sondy to: archeony acetoklastyczne (*Methanosarcinaceae* i *Methanobacteriaceae*), bakterie utleniające kwas propionowy (*Smithella* i *Syntrophobacter*) oraz bakterie utleniające wyższe kwasy organiczne (*Syntrophomonas*). Szersza lista sond przeznaczonych do znakowania mikroorganizmów obecnych w środowisku beztlenowym znajduje się w Tabeli 20.

Tabela 20. Sondy FISH wykorzystywane w badaniach mikroorganizmów beztlenowych (Ariesyady, Ito et al. 2007; Lubken, Wichern et al. 2007)

Specyficzność	Nazwa	Sekwencja	Miejsce wiązania	% formamidu
Sondy o szerokiej specyficzności				
Archae	ARC915	GTGCTCCCCGCCAATTCCT	16S (915–934)	35
Bacteria	Eub338	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	16S (338–355)	-
Bacteria	Eub338 II	GCAGCCACCCGTAGGTGT	16S (338–355)	-
Bacteria	Eub338 III	GCTGCCACCCGTAGGTGT	16S (338–355)	-

Archaeobakterie metanogene				
Methanosarcinales	MSMX860	GGCTCGCTTCACGGCT-TCCCT	16S (860–880)	45
Methanosaetaceae	MX825	TCGCACCGTGGCCGACAC-CTAGC	16S (825–847)	50
Methanosarcina	MS821	CGCCATGCCTGACACC-TAGCGAGC	16S (821–844)	40
Methanobacteriaceae	MB1174	TACCGTCGTCCACTCCTTC-CTC	16S (1175–1196)	45
Bakterie utleniające kwas propionowy				
Syntrophus	SmiSR354	CGCAATATTCCTCACTGC	16S (354–371)	10
Syntrophobacter	Synbac824	GTACCCGCTACACCTAGT	16S (824–841)	10
Bakterie utleniające kwas masłowy				
Syntrophomonas	Synm700	ACTGGTRTTCCTCCTGATT-TCTA	16S (700–722)	30

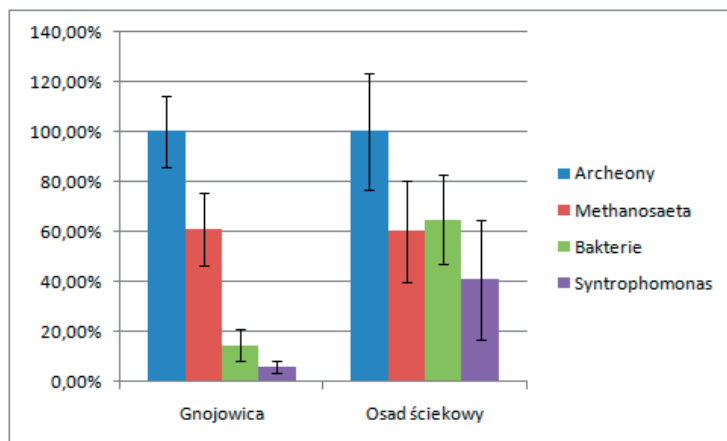
Wykorzystanie techniki FISH pozwoliło na przeanalizowanie struktury granulek osadu metanogenego. Saiki et al. (Saiki, Iwabuchi et al. 2002), dzięki przeprowadzeniu znakowania bakterii w skrawkach przygotowanych z osadu z reaktorów metanogennych w oczyszczalniach ścieków, był w stanie przedstawić model rozłożenia populacji mikroorganizmów w tym ekosystemie. Z jego badań wynika, że archeony metanogene gromadzą się wewnątrz granulek, natomiast bakterie hydrolizujące i fermentujące tworzą wierzchnią warstwę granulki (Rysunek 8).



Rysunek 8. Model rozłożenia mikroorganizmów w granulce złoża metanogenego (Saiki, Iwabuchi et al. 2002)

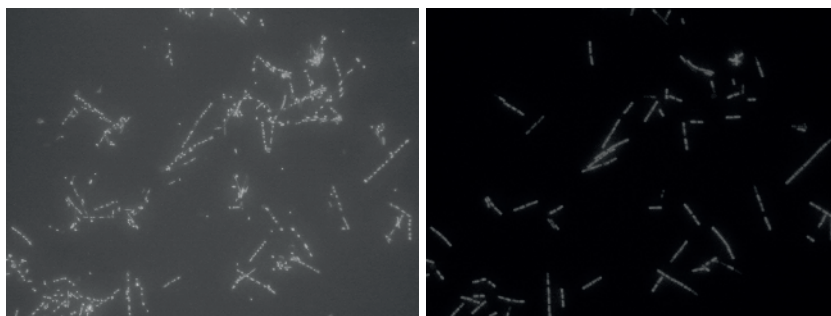
Na podstawie zdjęć mikroskopowych preparatów znakowanych sondami oligonukleotydowymi możliwe jest również wykonanie półilościowego oznaczenia udziału poszczególnych grup mikroorganizmów w populacji ogólnej. Jedną z możliwych metod szacowania jest porównanie pola powierzchni zajmowanego na fotografiach przez bakterie wyznakowane sondami z polem powierzchni zajmowanym przez mikroorganizmy wyznakowane barwnikiem niespecyficznym

gatunkowo (np. DAPI). Metoda ta stała się możliwa do wykonania dzięki zastosowaniu oprogramowania przeznaczonego do automatycznej obróbki obrazu (np. AxioVision firmy Zeiss). Na rysunku 9 przedstawiono przykładowe zastosowanie metody do oszacowania wielkości populacji archeonów wykorzystujących kwas octowy *Methanosaeta* oraz bakterii z rodzaju *Syntrophomonas* w metanogennym złożu pochodzącym z osadów z oczyszczalni ścieków oraz z gnojowicy bydłowej po hodowli wzbogacającej prowadzonej na kwasie masłowym.



Rysunek 9. Skład populacji mikroorganizmów w hodowlach metanogennych uzyskanych z gnojowicy oraz osadu ściekowego. Wartości są przedstawione w odniesieniu do ogólnej ilości archeonów (100%).

W przypadku wykorzystania wyżej opisanej metody ważne jest uzyskanie homogennych preparatów mikroskopowych, w których nie obserwuje się wielonarstwowych skupisk mikroorganizmów (przykład takiego preparatu można znaleźć na rysunku 10).



Rysunek 10. Zdjęcie wykonane mikroskopem fluorescencyjnym zawierające preparat wyznakowany sondami oligonukleotydowymi (strona lewa: mikroorganizmy wyznakowane DAPI; strona prawa: archeony wyznakowane za pomocą sony Arc915).

Bardzo ciekawe wyniki uzyskano w badaniach, w których połączono technikę FISH z metodą mikroradiografii (Ariesyady, Ito et al. 2007). W pracy Ariesyady'ego badano wchłanianie znakowanych izotopowo kwasów organicznych przez mikroorganizmy należące do poszczególnych grup troficznych w środowisku beztlenowym. Badania potwierdziły preferencje pokarmowe bakterii należących do *Smithella*, *Syntrophobacter* (utleniających kwas propionowy) czy *Syntrophomonas* (utleniających kwas masłowy). Zaskakująca była jednak zdolność do metabolizowania wszystkich testowanych związków (glukoza, kwasy: propionowy, masłowy, octowy) przez bakterie należące do grupy *Betaproteobacteria*. Dominującymi archeonami metanogennymi w badanych warunkach były *Methanosaeta*. Znikoma obecność gatunków z rodziny *Methanosarcina* mogła wynikać z niskiego obciążenia reaktora, z którego pochodziły próbki.

Metodę FISH wykorzystuje się również do badania populacji mikroorganizmów biorących udział w procesie DF, mającej na celu uzyskanie wodoru. Sondy wykorzystywane w badaniach DF obejmują oligonukleotydy przeznaczone do znakowania następujących grup mikroorganizmów:

- wszystkich grup bakterii (Tabela 20),
- archeonów – potencjalnych konsumentów wodoru (Tabela 20),
- bakterii produkujących wodór (Tabela 21).

Tabela 21. Sondy FISH wykorzystywane w badaniach mikroorganizmów produkujących wodór (Hung, Lee et al. 2007).

Specyficzność	Nazwa	Sekwencja	Miejsce wiązania	% formamidu
Clostridiacea	Chis150	TTATGCGGTATTAATCTYCCTTT	16S (150–172)	30
LGC	LGC354A	TGGAAGATTCCTACTGC	16S (354–371)	35
	LGC354B	CGGAAGATTCCTACTGC	16S (354–371)	35
	LGC354C	CCGAAGATTCCTACTGC	16S (354–371)	35
HGC	HGC69a	TATAGTTACCACCGCGT	23S (1901–1917)	25

Objaśnienia skrótów w tabeli LGC – bakterie Gram-pozytywne o małej zawartości guaniny i cytozyny w DNA (np. *Sterptococcus sp.*) HGC - bakterie Gram-pozytywne o dużej zawartości guaniny i cytozyny w DNA (np. *Campylobacterium sp.*, *Brevibacterium sp.*)

W reaktorach produkujących wodór, pracujących w temperaturze od 35 do 40 °C, dominującą grupą mikroorganizmów były bakterie z rodzaju *Clostridium* (Hung, Lee et al. 2007; Cheng, Hung et al. 2008; Lee, Song et al. 2009). Stanowiły one od 30 do 95% całości populacji mikroorganizmów. Ważną grupę w układach rozkładających skrobię stanowiły również bakterie z rodzaju *Bifidobacterium* (Cheng, Hung et al. 2008). W reaktorach dokarmianych glukozą drugą z grup

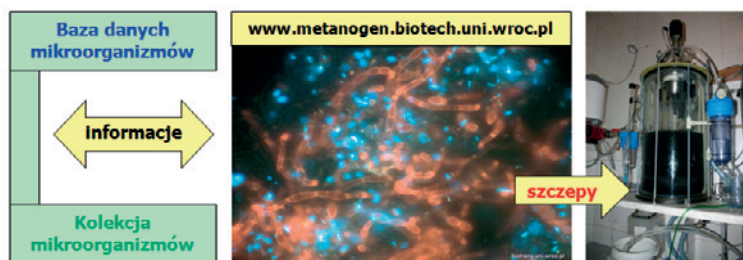
dominujących w reaktorze stanowiły mikroorganizmy z rodzaju *Streptococcus* (Hung, Lee et al. 2007).

Struktura populacji utworzonej podczas hodowli bakterii produkujących wodór w dużym stopniu zależy od sposobu obróbki wstępnej materiału użytego do szczepienia. Obróbka termiczna pozwala na utworzenie różnorodnej populacji, w której obok bakterii z rodzaju *Clostridium* obecne są również bakterie z rodzaju *Streptococcus* i *Klebsiella* (Hung, Lee et al. 2007) lub *Bifidobacterium* (Cheng, Hung et al. 2008). Zastosowanie stężonych kwasów prowadzi do stworzenia populacji dużo mniej zróżnicowanej, złożonej w 95% z bakterii z rodzaju *Clostridium* (Lee, Song et al. 2009).

4.3. INTERAKTYWNE BAZY DANYCH DOTYCZĄCE MIKROORGANIZMÓW METANOGENNYCH.

Jednym z użytecznych narzędzi ułatwiających pracę podczas analizy populacji archeonów metanogennych są bazy danych takie jak: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, <http://www.bacterio.net/~generalinformation.html>). Bazy te zawierają spis mikroorganizmów zgodny z aktualną nomenklaturą, jak również przydatne dane dotyczące biologii molekularnej tychże mikroorganizmów, jednakże brak w nich zestawienia informacji dotyczących wymagań środowiskowych poszczególnych gatunków. Dane takie byłyby pomocne w rozumieniu zależności pokarmowych w środowisku beztlenowym oraz w projektowaniu nowych technologii związanych z procesem metanogenezy.

Nowo powstała baza danych stworzona w ramach realizowanego projektu i umieszczona na serwerze Wydziału Biotechnologii Uniwersytecie Wrocławskim wychodzi naprzeciw tej potrzebie (zwana dalej w skrócie UW-mDB) www.metanogen.biotech.uni.wroc.pl.



Rysunek 11. Schemat wykorzystania baz danych i kolekcji mikroorganizmów do prowadzonych procesów.

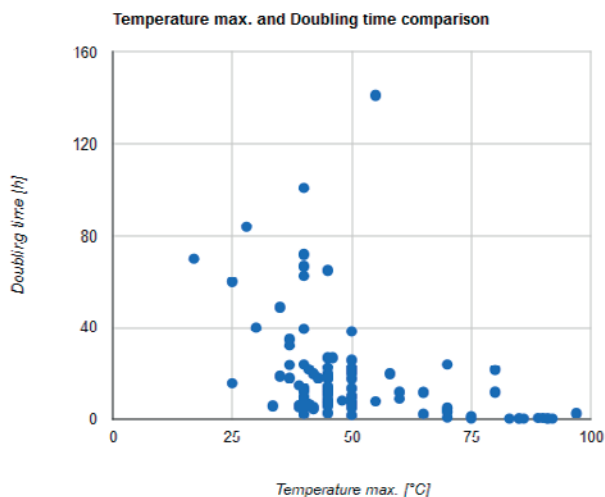
Obecnie baza ta zawiera 144 wpisy dotyczące sklasyfikowanych i wyizolowanych archeonów metanogennych. Baza zawiera podstawowe informacje dotyczące wymagań życiowych mikroorganizmów takie jak: temperatura, zasolenie, odczyn środowiska oraz wymagania pokarmowe. Tabela 22 przedstawia sposób opisu zawarty w tej bazie danych dla przykładowych archeonów.

Sposób, w jaki zorganizowano niniejszą bazę pozwala na łatwe prowadzenie analiz zgromadzonych danych przez automatyczne tworzenie wykresów wybranych cech. Rysunek 12 przedstawia przykład wykresu, jaki można uzyskać przy wykorzystaniu bazy metanogennych archeonów.

Prezentowana platforma stanowi dogodne miejsce do realizacji zadań czysto naukowych takich jak:

- dzielenie się informacjami dotyczącymi nowo wyizolowanych gatunków bakterii metanogennych,
- porównywanie cech wybranych gatunków na potrzeby klasyfikacji nowych mikroorganizmów.

Zgromadzone dane umożliwiają również prowadzenie analiz o charakterze aplikacyjnym, jakim jest selekcja drobnoustrojów na potrzeby procesów technologicznych prowadzonych w określonych warunkach (Rysunek 11).



Rysunek 12. Wykres przedstawiający zależność między maksymalną temperaturą wzrostu a czasem podwojenia dla metanogennych archeonów, wygenerowany przez UWf-MDB

Tabela 22. Przykładowy opis gatunków archeonów metanogennych w bazie Uniwersytetu Wrocławskiego.

	Gatunek	Methanome- thylovorans thermophila	Methanosar- cina horono- bensis	Methanobacte- rium subterra- num	Jednostka
Klasyfikacja taksonomicz- na	Klasa	Methanomi- crobia	Methanomi- crobia	Methanobac- teria	
	Rząd	Methanosarci- nales	Methanosarci- nales	Methanobacte- riales	
	Rodzina	Methanosarci- naceae	Methanosarci- naceae	Methanobacte- riaceae	
	Rodzaj	Methanomethy- lovorans	Methanosarcina	Methanobacte- rium	
Temperatura	T. min.	42	20	3.5	[°C]
	T. max.	58	42	40	
	T. optymalna min.	50	37	20	
	T. optymalna max.	50	37	40	
Odczyn śro- dowiska	pH min.	5	6	6.75	
	pH max.	7.5	7.75	9.2	
	pH optymalny min.	6.6	7	7.8	
	pH optymalny max.	6.6	7.25	8.8	
Zasolenie	NaCl min.	0	0	0	[mol·L ⁻¹]
	NaCl max.	0.3	0.35	1.4	
	NaCl optymal- ne min.	0.1	0.1	0.2	
	NaCl optymal- ne max.	0.1	0.1	1.25	
Wzrost	Szybkość	0.050	0.014	0.32	[h ⁻¹]
	Czas Podwo- jenia	14.21	49.00	2.50	[h]
Wykorzysty- wane sub- straty	H ₂ /CO ₂	-1	-1	1	
	Mrówczan	-1	-1	1	
	Octan	-1	1	-1	
	Metanol	1	1	-1	
	Metylamina	1	-1	nd	
	Dimetylamina	1	1	nd	
	Trimetylamina	1	1	-1	

	Siarczek di- metylu	-1	1	-1	
	CO	-1	nd	nd	
	Etanol	-1	nd	-1	
	1-propanol	-1	-1	-1	
	1-butanol	-1	-1	-1	
	2-propanol	-1	-1	nd	
	2-butanol	-1	nd	nd	
	Cyklopentanol	-1	-1	nd	
	Izobutanol	-1	nd	-1	
	Kwas propi- nowy	-1	nd	nd	
Środowisko izolacji		bioreaktor	Wody gruntowe	Wody gruntowe	
Zawartość GC	GC min.	37.6	41.4	54.4	[%]
	GC max.	37.6	41.4	54.4	
Morfologia	Kształt	Coccoid	Nieregularny cocci	Rod	
	szerokość min.	0.7	1.4	0.1	[μm]
	szerokość max.	1.5	2.9	0.15	
	długość min.	0.7	1.4	0.6	
	długość max.	1.5	2.9	1.2	
Szczepy refe- rencyjne	DSM	DSM 17232	DSM 21571	DSM 11074	
	ATTC	ATCC BAA- 1173		ATCC 700657	
Literatura	Data pierw- szego donie- sienia	2005	2011	1998	
	PMID	16280511	21112985	9731274	
	URL	http://ijs.sgmjournals.org/content/55/6/2465. long	http://ijs.sgmjournals.org/content/61/10/2503. long	http://ijs.sgmjournals.org/content/48/2/357. long	

5. STEROWANIE I MONITORING W INSTALACJACH PRZEZNACZONYCH DO PROWADZENIA FERMENTACJI METANOWEJ.

5.1. BIOREAKTORY FERMENTACJI METANOWEJ.

Złożony proces fermentacji metanowej nie jest łatwy do opisanego przy pomocy wartości matematycznych, dlatego możliwe są błędy wynikające z różnic pomiędzy matematycznym, cyfrowym modelem a procesami biochemicznymi (analogowymi) zachodzącymi podczas procesu technologicznego. W konsekwencji sterowanie procesem i optymalizacja wydajności często są trudne i mało przewidywalne.

Poprawność prognoz uzyskanych przez model matematyczny, symulujący proces fermentacyjny, zależy wprost od dokładności danych wejściowych używanych do jego kalibracji. Dużym ułatwieniem w procesie gromadzenia danych jest możliwość automatycznego odczytu, zbierania i zapisywania wielu pomiarów. Możliwość taką dają bioreaktory laboratoryjne, pozwalające utrzymać różne kontrolowane warunki fermentacji przez wymagany okres przy jednoczesnym zapisie określonych parametrów procesu na dysku komputera, a także graficznego przedstawiania czy analiz porównawczych (np. temperatury, pH, przepływu gazu, składu gazu, populacji mikroorganizmów).

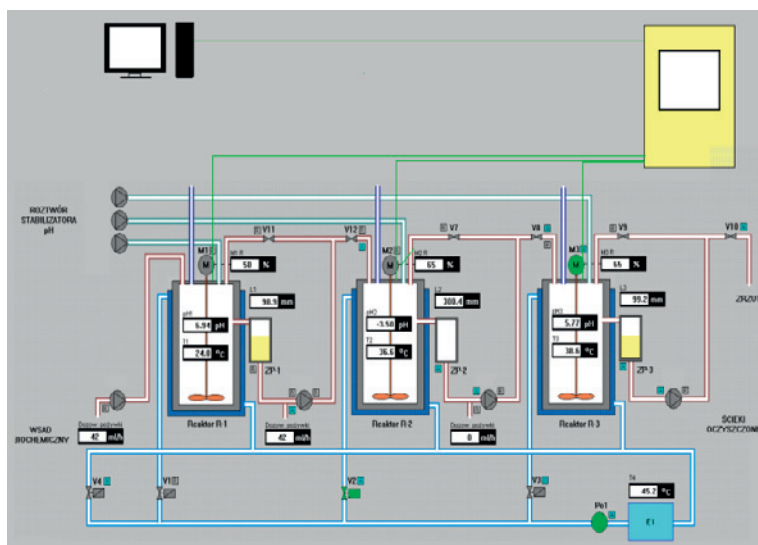
5.2. STANOWISKO LABORATORYJNE PRZEZNACZONE DO BADANIA PROCESU FERMENTACJI METANOWEJ.

Stanowisko przeznaczone do badania procesów fermentacji metanowej zostało zaprojektowane i wytworzone w ramach realizacji projektu kluczowego nr POIG.01.01.02-00-016/08, zatytułowanego „*Modelowe kompleksy agroenergetyczne jako przykład kogeneracji rozproszonej opartej na lokalnych i odnawialnych źródłach energii finansowanej*”.

Stanowisko to charakteryzuje się następującymi cechami:

- Uniwersalność wykorzystywania płynnego surowca,
- Wszechstronność metod i warunków pomiarów niezbędna do szczegółowych badań procesów fermentacyjnych,
- Automatyzacja pomiarów, zapisu, rejestracji i archiwizacji w postaci cyfrowej zmierzonych parametrów fizykochemicznych, obejmująca także analizę jakościowo-ilościową fazy gazowej i ciekłej.

Stanowisko badawcze zbudowano zgodnie z koncepcją przedstawioną na Rysunku 13. Dodatkową zaletą układu jest opcja zdalnego dostępu do zgromadzonych na komputerze danych poprzez ogólną lub dedykowaną sieć komputerową, także bezprzewodową.

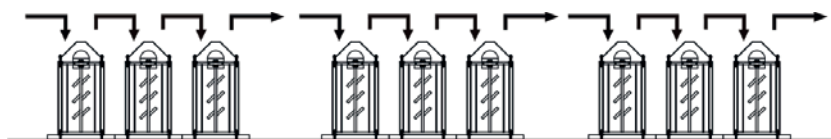


Rysunek 13. Uproszczony schemat stanowiska badawczego

Opisane stanowisko badawcze zbudowano z następujących urządzenia i podzespołów kontrolno-pomiarowych:

- Trzy bioreaktory,
- Zestaw sensorów pomiarowych,
- Panel wejść pomiarowych,
- Sterownik mikroprocesorowy,
- Panel komunikacyjny,
- Analizator i rejestrator danych pomiarowych gazów,
- Zestaw zdalnie sterowanych urządzeń wykonawczych,
- Układ stabilizacji temperatury,
- Układ stabilizacji kwasowości,

- Układ regulacyjny pracy mieszadeł,
- Układ regulacji czasów retencji reaktorów,
- Komputer z oprogramowaniem aplikacyjnym do zbierania, zapisu, przetwarzania danych pomiarowych, wizualizacji procesu sterowania i danych pomiarowych, jak również do archiwizacji zbiorów danych.



Rysunek 14. Schemat możliwych konfiguracji pracy bioreaktorów

Konfiguracja kaskadowa (Rysunek 14, po lewej) umożliwia przepływ substratu przez kolejne fermentory, co pozwala na:

- prowadzenie kolejnych etapów fermentacji w różnych warunkach,
- adaptację (specjalizację) mikroorganizmów (aktywnego osadu) do różnych warunków,
- wydzielenie produkcji wodoru i metanu,
- odzyskiwanie potencjalnie cennych substancji z pożywki pomiędzy etapami trawienia (np. enzymy).

Konfiguracja w trybie reaktorów niezależnych (Rysunek 14, w środku) - każdy z reaktorów pracuje jako odrębna jednostka, co pozwala na:

- badanie w identycznych układach aparaturowych, przy wspólnym gromadzeniu danych,
- porównywanie fermentacji w różnych warunkach,
- badanie fermentacji różnych substratów i ich mieszanin.

Konfiguracja w trybie reaktorów mieszanych (Rysunek 14, po prawej) - w dwóch reaktorach prowadzona jest równolegle fermentacja wstępna, w ostatnim zbiorniku następuje produkcja metanu, co pozwala na:

- jednoczesne prowadzenie fermentacji wstępnej substratów o różnych właściwościach (np. serwatka, materiał roślinny, materiał zwierzęcy),
- regulację strumieni substratów wchodzących do reaktora metanogenego,
- kompensację składu pożywek przez mieszanie różnych substratów.

W prezentowanym zestawie badawczym zastosowano zarówno wiele nowatorskich rozwiązań konstrukcyjnych, jak również w zakresie sterowania przebiegiem procesów zachodzących w reaktorach:

- mieszadła o programowanych trybach pracy,
- magnetyczne połączenie napędów elektrycznych z mieszadłami,
- regulowany czas retencji reaktorów,
- ultradźwiękowy pomiar ilości wytworzonego gazu,

- układ pobierania i uzdatniania próbek gazu do badań analitycznych
- zdalny monitoring i sterowanie.

Zastosowane rozwiązania sprzętowe i programistyczne ułatwiają:

- planowanie badań,
- przygotowanie zasobów do badań,
- wykonanie badań,
- opracowywanie wyników badań.

Sterowanie układami pomiarowymi i wykonawczymi zestawu można prowadzić lokalnie poprzez panel sterownika mikrokomputerowego PLC, wyposażonego w dotykowy monitor oraz zdalnie przez dowolny komputer za pośrednictwem oprogramowania SCAD.

System akwizycji i przetwarzania danych pomiarowych obsługujący omawiane stanowisko badawcze umożliwia:

- kontrolę przebiegu procesów,
- wizualizację stanów punktów pomiarowych,
- wizualizację wysterowania podzespołów wykonawczych,
- sygnalizację stanów krytycznych i awaryjnych,
- wspomaganie działań operatorskich i serwisowych.

Baza danych pomiarowych gromadzi pliki przygotowane do korelacyjnych badań statystycznych oraz modelowania procesowego. Model, który powstaje w wyniku matematycznego odwzorowania procesów, służy do symulacji i dostrajania rzeczywistych procesów technologicznych. Jest również pomocny do przygotowania scenariuszy działań na wypadek zdarzeń niepożądanych, obniżających sprawność (efektywność) procesu lub zagrażających awarią instalacji. Model procesowy może być także wykorzystany do testowania sposobów wysterowania obiektów w obszarach zachowań prawidłowych, krytycznych i awaryjnych. Na modelu można opracowywać instrukcje i procedury działań dla operatorów obiektów i technologii w celach:

- zminimalizowania ryzyka wystąpienia zagrożeń,
- ograniczenia następstw zdarzeń niepożądanych,
- przywracania zdolności procesowych i technologicznych,
- odtworzenia stanu z okresu poprzedzającego zdarzenie kryzysowe,
- monitorowania procesów z zastosowaniem zmiennej skali czasu.

Model procesowy z funkcją symulacji może być też znakomitą wyposażeniem w laboratoriach dydaktycznych.



Rysunek 15. Stanowisko badawcze złożone z trzech reaktorów

Podstawowe parametry techniczne stanowiska badawczego (prezentowanego na rysunku 15):

- Pojemność robocza reaktorów $3 \times 20 \text{ dm}^3$.
- Układ stabilizacji temperatury PID z niezależnym sterowaniem dla każdego reaktora w zakresie $20\text{--}85 \text{ }^\circ\text{C}$.
- Układ stabilizacji kwasowości z niezależnym sterowaniem dla każdego reaktora w trybach: iniekcji, zwrotnego zasilania, „xyz”.
- Układ regulacji pracy mieszadeł $0\text{--}100 \text{ obr/min}$ z dowolnie regulowanymi przerwami.
- Układ regulacji przepływu między reaktorami $0\text{--}80\%$.
- Pompki dozujące $0\text{--}1000 \text{ ccm/godz}$.
- Panel pomiarowy ze sterownikiem mikroprocesorowym PLC (Rysunek 16, 17) obsługuje:
 - 12 kanałów wejść analogowych,
 - 4 kanały wyjść analogowych,
 - 27 kanałów cyfrowych I/O,
- Komputer PC z rozszerzeniem I/O: 2 x RS 232, 2 x RS 486,
- Oprogramowanie systemowe i narzędziowe: Windows, SCAD.



Rysunek 16. Widok panelu dotykowego do PLC



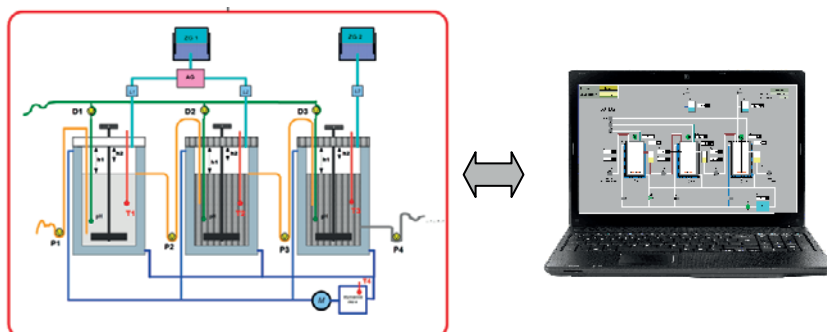
Rysunek 17. Szafa sterująca z sterownikiem PLC

Do bezpośredniego sterowania zastosowano mikroprocesorowy sterownik PLC SIMATIC S7-200, zaprojektowany do komunikowania się i sterowania obiektami. Zintegrowane z nim porty komunikacyjne mogą pracować przy znacznych prędkościach transmisji danych, wynoszących od 1 do 187 kbit/s. Porty komunikacyjne pozwalają na pracę w rozbudowanych strukturach komunikacyjnych (do 126 użytkowników w sieci).

Uczestnikami sieci mogą być programatory, panele operatorskie, komputery oraz inne sterowniki. Standardowo porty komunikacyjne obsługują protokół PPI, mogą też pracować w protokole MPI jako slave. Pozwala to na współpracę z innymi komponentami systemu TIA (Totally Integrated Automation). Zintegrowane porty komunikacyjne mogą również pracować w trybie swobodnym portu (Free Port) (maks. prędkość transmisji 115 kbit/s), co pozwala na opracowanie własnych protokołów komunikacyjnych, wykorzystujących standard ASCII. Dzięki temu moż-

liwa jest komunikacja z modemami, drukarkami, czytnikami kodów paskowych, komputerami PC oraz sterownikami różnych producentów. Biblioteka Modbus RTU zapewnia komunikację także w sieci Modbus.

Dane ze stanowiska badawczego są gromadzone na komputerze przez oprogramowanie SCADA (System Control And Data Acquisition). Rozwiązanie takie pozwala na bezpieczne zarządzanie, monitoring i sterowanie w czasie rzeczywistym, procesy można śledzić na schemacie stanowiska badawczego (Rys. 18) opracowanym w środowisku ASIX. Oprogramowanie ASIX odpowiada w przedstawionym systemie za akwizycję oraz sterowanie nadrzędne.

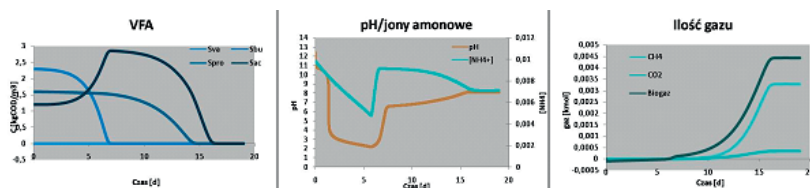


Rysunek 18. Schemat sterowania procesami przy użyciu programu ASIX

Zapis danych historycznych odbywa się przez wirtualny interfejs, stworzony w celu usprawnienia procedur związanych z przetwarzaniem plików pochodzących z różnych aplikacji i baz danych.

W programie SCAD dostępny jest generator raportów o stanach zdefiniowanych jako stany ostrzegawcze lub alarmowe z funkcją akceptacji stanu. Funkcja ta gwarantuje bezpieczny poziom kontroli operatorskiej nad przebiegiem kontrolowanego procesu czy doświadczenia.

Generator wykresów zmiennych (Rysunek 19) umożliwia definiowanie wykresów z maks. 16 parametrami. Wykresy mogą być przewijane wzdłuż osi, z możliwością zastosowania funkcji lupy. Wykresy z danymi historycznymi i bieżącymi mogą być prezentowane jednocześnie - daje to możliwość porównywania przebiegów poszczególnych parametrów.



Rysunek 19. Przykładowy wygląd generatora wykresów

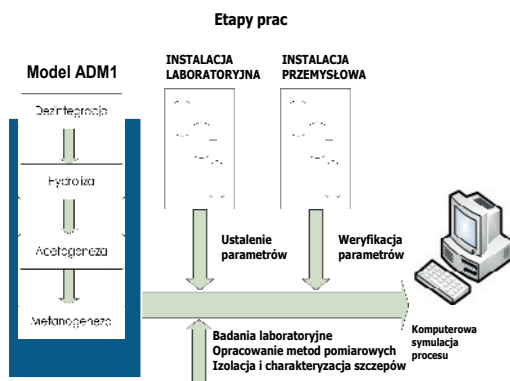
Prezentowane stanowisko zapewnia stałe i w pełni kontrolowane warunki dla doświadczeń fermentacyjnych wraz z archiwizacją danych procesowych. Jest ono dogodnym narzędziem do badania wpływu wielu różnych czynników na przebieg fermentacji metanowej. Prezentowane stanowisko umożliwia prowadzenie doświadczeń o wielu profilach, jak:

1. Badania kinetyki procesów w funkcji:
 - Temperatury,
 - Kwasowości,
 - Zapotrzebowania na tlen,
 - Dawkowania pożywienia,
 - Prędkości i mieszania,
 - Czasów retencji reaktorów.
2. Badanie warunków stabilizacji procesów w funkcji obciążenia poszczególnych lub wszystkich reaktorów,
3. Badania wpływu inhibitorów na wydajność poszczególnych faz procesowych,
4. Badania wpływu makroelementów (jony Mg^{+2} , Ca^{+2} , Fe^{+3} , Fe^{+2} , PO_4^{-3} , Cl^- , K^+ , Na^+ itp.) na wydajność poszczególnych faz procesów;
5. Badania wpływu mikroelementów (jony Mn^{+2} , Co^{+2} , Cr^{+3} , Zn^{+2} , MoO_4^{-3} , VO^{+2} , itp.) na wydajność poszczególnych faz procesów;
6. Bilansowanie mas dla podstawowych składników przemian biochemicznych,
7. Badania korelacyjne wydajności przemian biochemicznych dla zmiennych procesowych,
8. Wyznaczanie charakterystyk zmiennych procesowych dla potrzeb związanych z modelowaniem przebiegów dla poszczególnych faz procesowych,
9. Wyznaczanie krytycznych parametrów dla sterowania przebiegiem procesów,
10. Określanie optymalnych wartości zmiennych procesowych,
11. Określanie bilansów energetycznych dla poszczególnych faz procesu,
12. Określanie wpływu koncentracji dwutlenku węgla (egzogenne) w masie reakcyjnej, na szybkość i wydajność metanogenezy,
13. Izolacja nowych szczepów bakterii (syntroficznych, metanogennych, homo-octanowych itp.).

5.3. SKALOWANIE SYSTEMU STEROWANIA.

Monitoring i sterowanie omawianego modelu jest **kompatybilne z układami przemysłowymi**. Może być z powodzeniem stosowane do sterowania i administrowania instalacjami o skali przemysłowej.

Możliwość przeniesienia (przeskalowania) softwarowego systemu monitorowania i sterowania, opracowanego dla doświadczalnej instalacji fermentacji metanowej, na instalacje przemysłową, jest zgodna z pierwotnym założeniem projektu badawczo-wdrożeniowego, co ilustruje Rysunek 20.



Rysunek 20. Założeniem projektu badawczo-wdrożeniowego

W skład systemu zarządzania i kontroli procesu w instalacjach wytwarzających biogaz wchodzi następujące moduły:

- Moduł raportowania,
- Moduł trendów,
- Moduł alarmów,
- Moduł zdalnego powiadamiania,
- Moduł archiwizacji.

W **module raportowania** pracy obiektów biogazowni zastosowano system Microsoft® SQL Server™ 2008 Reporting Services. Umożliwia on:

- tworzenie raportów na podstawie zdarzeń zarejestrowanych przez system sterowania i monitoringu;
- zarządzanie środowiskiem raportowania;
- dostarczanie użytkownikom potrzebnych raportów w wygodnym dla nich formacie i w przystępny sposób;
- możliwość konfiguracji automatycznego dostarczania raportów drogą elektroniczną.

Moduł trendów umożliwia graficzną prezentację danych zarejestrowanych w zbiorach archiwalnych lub dynamiczne wyświetlanie stanu bieżących danych napływających z obiektów.

Moduł archiwizacji pozwala na zbieranie danych z modułów raportowania, trendów, alertów i alarmów z dowolnie zadanego okresu. Ma to szczególne znaczenie przy analizie przyczyn załamania procesu fermentacji oraz przy zmianach parametrów procesowych takich jak: szybkość dozowania, rodzaj substratu, zmiany temperatury prowadzenia fermentacji.

Moduł alarmów potrafi analizować pracę systemu alarmów, oceniając w dwóch płaszczyznach poprawność wykonanego opomiarowania z punktu widzenia bezpieczeństwa przebiegu procesów oraz analizę alarmów zarejestrowanych w poszczególnych obiektach, a także cenę ich wpływu na stabilność i efektywność wykonywanych procesów. Zarządzanie tymi informacjami realizowane jest przy użyciu:

- tabel zarejestrowanych zdarzeń historycznych;
- wykresów przebiegów wybranych zdarzeń alarmowych;
- analizy dynamicznej, służącej wyliczaniu różnego rodzaju statystyk dotyczących archiwum zdarzeń;
- analizy statycznej, obrazującej strukturę bazy definicji alarmów.

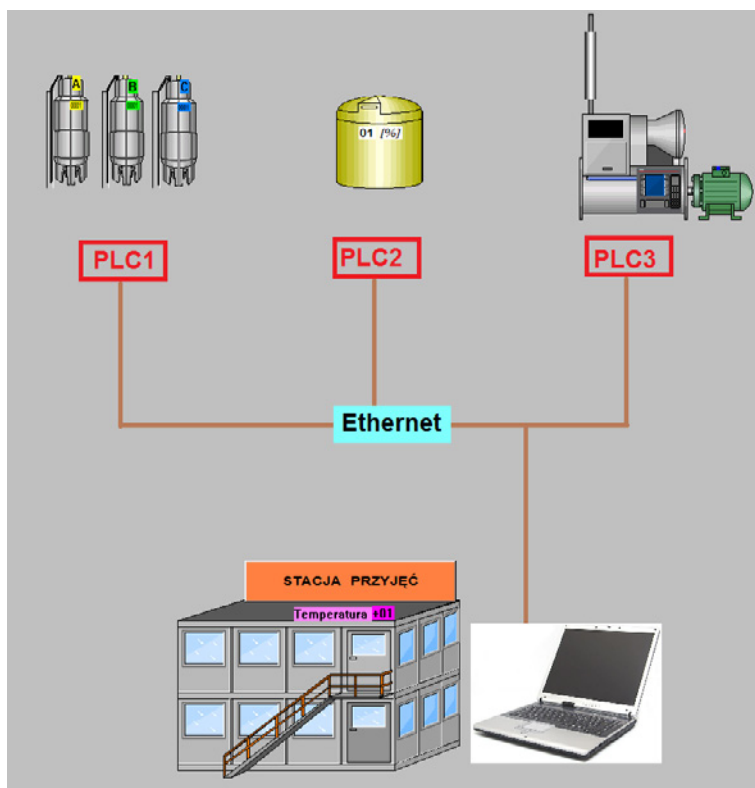
Moduł zdalnego powiadamiania zapewnia automatyczne powiadamianie służby nadzoru o zaistnieniu ważnych zdarzeń. Komunikaty mogą być wysyłane jako poczta elektroniczna (email) lub jako komunikat SMS zarówno poprzez Internet, jak sieć GSM. Sprzężenie systemu wysyłania alertów z mechanizmem generowania alarmów pozwala na automatyczne wysyłanie odpowiednich treści opisujących zaistniałą sytuację i konieczność wykonania określonej procedury postępowania.

5.4. KONCEPCJE ZARZĄDZANIA

Jednym z założeń projektu kluczowego POIG było opracowanie porównawcze koncepcji systemów kontroli i zarządzania instalacjami fermentacyjnymi z wykorzystaniem **topologii sieci komunikacyjnej mieszanej**. Przy zarządzania i kontroli systemów zautomatyzowanych tak w skali laboratoryjnej, jak i przemysłowej, można wyróżnić dwa typy budowy systemu:

1. System scentralizowany charakteryzujący się następującymi cechami:

- pomiary oraz sterowanie wykonywane jest przy użyciu jednego cyfrowego urządzenia sterująco-przetwarzającego (programowalny sterownik PLC lub PC),
- każdy element pomiarowy i wykonawczy jest połączony przewodem elektrycznym z modułem sterującym.
 - Wady tego systemu to:
- nadmiernie rozbudowane okablowanie,
- ograniczenia transmisyjne sygnałów,
- ograniczenie dostępu do zasobów danych pomiarowych.



Rysunek 21. Schemat rozproszonego systemu zarządzania biogazownią

2. System rozproszony (Rysunek 21) charakteryzujący się cechami:

- pomiary i sterowanie wykonywane przez obiektowe programowalne sterowniki **PLC** (krótkie połączenia kablowe),
- funkcje agregacji danych i przetwarzania realizowane w bazach danych na **PC (lokalna lub otwarta sieć komputerowa)**.
 - Do zalet tego systemu należą:
- struktura hierarchiczna sterowania,
- otwarte okablowanie strukturalne,
- możliwość zdalnej obsługi procesu.

Wynika z tego, że **system scentralizowany** jest obciążonym znacznymi wadami, ponieważ opiera się głównie na transmisji kablowej, co ogranicza go do zarządzania biogazownią w obrębie obiektu. Można oczywiście przetwarzać zebrane w ten sposób dane i transmitować drogą komunikacji, np. przez sieć **GSM**, ale jest to - w stosunku do systemu rozproszonego - system przestarzały i kapitałochłonny z uwagi na okablowanie, przyłącza czy ograniczenie możliwości transmisji sygnałów.

Niezależnie od rodzaju systemu zarządzania, scentralizowanego czy rozproszonego, dane z procesu w biogazowni przetwarzane przez sterowniki mogą zostać wykorzystane do:

- lokalnego sterowania z zastosowaniem tekstowych lub graficznych terminali operatorskich;
- realizacji algorytmu sterowania całym kompleksem obiektów (sterownik nadrzędny, system SCADA);
- wizualizacji procesu, archiwizacji, optymalizacji pracy, a także powiadamiania o stanach awaryjnych,
- raportowania o stanach awaryjnych drogą elektroniczną (poprzez pocztę e-mail lub za pośrednictwem telefonii komórkowej).

Zarządzanie monitoringiem i sterowaniem z funkcją klienta webowego i użytkownika mobilnego (za pośrednictwem telefonii GSM) jest we współczesnym świecie rozwiązaniem technologicznym stosowanym coraz częściej, przede wszystkim w przemyśle chemicznym i energetyce. Rozwiązanie to dotyczy nie tylko obiektów modelowych w skali laboratoryjnej, ale również obiektów przemysłowych o pełnych rozmiarach.

W omawianym przypadku przewidziano wprowadzenie tego systemu dla biogazowni utylizującej organiczne odpady i odchody zwierzęce, zarówno na poziomie stanowiska doświadczalnego, jak i dowolnie dużej instalacji przemysłowej.

System wykorzystujący sieci komunikacyjne typu Internet przewodowy czy bezprzewodowy, w tym także systemy telefonii komórkowej, w zdecydowany sposób ułatwia zarządzanie procesami produkcyjnymi, można bowiem w sposób zdalny monitorować oraz kontrolować procesy zachodzące w profesjonalnych instalacjach przemysłowych.

Posiadając odpowiednie uprawnienia (kody dostępu), można ręcznie sterować procesami zachodzącymi w instalacjach biogazowni. Ma to szczególne znaczenie w sytuacjach awaryjnych, gdy potrzebne są natychmiastowe konsultacje ze specjalistami znajdującymi się daleko od miejsca zdarzenia. System taki ma również aspekt dydaktyczny, gdyż można obserwować pracę realnej instalacji podczas zajęć ze studentami danej dziedziny.

Podobny system znalazł zastosowanie w medycynie, gdzie możliwy jest udział w trudnych operacjach specjalistów z odległych krajów. Eksperci mogą je przeprowadzać dzięki specjalistycznym robotom chirurgicznym. Inny przykład to pomoc specjalistów lekarzom interweniującym podczas ratowania ofiar wypadków czy zdalny monitoring pracy serca pacjentów.

Automatyzacja sterowania instalacji przeznaczonych do prowadzenia fermentacji metanowej pozwala na obniżenie kosztów eksploatacji systemu, jak również obniża ryzyko wystąpienia załamania procesu związanego z błędem operatora. Fermentacja ta ma charakter bardzo złożony, wynikający z następczego charakteru

tworzących ją procesów i złożonego systemu warunków prawidłowego jej przebiegu. Nie wszystkie etapy procesowania i sterowania biogazownią mają jednakową wagę i wpływ na szybkość czy wydajność wytwarzania biogazu. Za najbardziej wrażliwe na zmiany warunków fizykochemicznych elementy pracy biogazowni należy uznać:

- dawkowanie substratu,
- kwasowość fermentowanego roztworu,
- czas fermentacji,
- obecność makro i mikroelementów na odpowiednim poziomie,
- zawartość ważnych dla procesu fermentacji substancji organicznych,
- szybkość mieszania.

5.5. WRAŻLIWE ELEMENTY PROCESU FERMENTACJI METANOWEJ W ŚWIELE STEROWANIA BIOGAZOWNIĄ

5.5.1. Dawkowanie substratu

Najprostszym rozwiązaniem umożliwiającym kontrolę dozowania substratu jest uzależnienie dawki od wartości czynnika będącego miarą stabilności procesu. Podejście takie zastosowano w instalacji laboratoryjnej, w której prowadzono fermentację gnojowicy [58]. Dla danego parametru kontrolnego ustalono zakresy wartości, które warunkują reakcję systemu.

Przykładowo: jeżeli stężenie kwasu propionowego jest poniżej 5 mM, to następna dawka substratu jest większa o 20% w porównaniu z poprzednią. Jeżeli stężenie kwasu znajduje się pomiędzy wartościami 5 a 8 mM, system zwiększa dawkę substratu jedynie o 2%, natomiast przekroczenie stężenia o 10 mM spowoduje obniżenie dawki substratu o 50 %.

Możliwe jest zdefiniowanie wielu różnych przedziałów sposobu reakcji systemu na zmianę parametru kontrolnego. Dobranie najodpowiedniejszych parametrów kontrolnych i scenariuszy reakcji systemu sterowania trzeba dostosowywać do konkretnych instalacji i utylizowanych substratów.

Innym rozwiązaniem pozwalającym na wykorzystanie w ocenie stanu procesu fermentacji metanowej więcej niż jednego parametru jest użycie kontrolera opartego na logice rozmytej (ang. fuzzy logic controller - FLC). Rozwiązanie takie użyto w instalacji opracowanej na Uniwersytecie w Hamburgu (Scherer, Lehmann et al. 2009).

Ocenę procesu fermentacji metanowej kiszonki buraka pastewnego oparto na pH, produkcji biogazu w przeliczeniu na ilość dozowanego substratu oraz procentowej zawartości metanu w powstającym biogazie.

Działanie systemu FLC można opisać w następujących etapach:

- zebranie danych wejściowych z czujników,
- przypisanie danych liczbowych uzyskanych z czujników kategorii lingwistycznych,
- ocena stanu systemu na podstawie wyważenia wyników poszczególnych czujników,
- ocena stanu systemu i stopnia odpowiedzi systemu,
- konwersja stopnia odpowiedzi systemu do danych liczbowych odbieranych przez urządzenia na wyjściu (czas pracy, szybkość dozowania pomp).

Wykorzystanie FLC do kontroli dozowania substratu dla fermentacji metabolicznej pozwoliło uzyskać produkcję na poziomie $9 \text{ dcm}^3 / \text{dcm}^3/\text{d}$ przy wydajności $0,55 \text{ dcm}^3/\text{gVS}$ w systemie utylizującym kiszonkę buraków pastewnych pracującym w temperaturze 41°C (Scherer, Lehmann et al. 2009). Podczas fermentacji nie dodawano środków zwiększających siłę buforowania. Ponadto system ten był w stanie odtworzyć pełną sprawność procesu fermentacji w ciągu 16 dni od załamania.

W przypadku fermentacji kiszonki buraków cukrowych produkcja kształtowała się na poziomie $3 \text{ dcm}^3/\text{dcm}^3/\text{d}$ przy wydajności $0,55 \text{ dcm}^3/\text{gVS}$, jednakże do substratu dodawano kwaśny węglan potasu (KHCO_3) w celu zwiększenia siły buforującej (Demirel, Ergun et al. 2009).

5.5.2. Czas fermentacji

Czas fermentacji to jeden z kluczowych czynników wpływających na stabilność i efektywność produkcji biogazu. Zbyt długi lub zbyt krótki prowadzi odpowiednio do zubożenia złoża w substancje organiczne, a więc i do zaburzenia równowag procesowych, co powoduje przyhamowanie produkcji biogazu. Zbyt krótki czas fermentacji powoduje „przekarmienie” złoża, gdy w reaktorze pojawia się przedwcześnie nowa porcja biomasy. W rezultacie przemian biochemicznych stężenia związków takich jak siarkowodór, amoniak, kwasy organiczne przekraczają wartości graniczne, doprowadzając do zahamowania metanogenezy i załamania całego procesu.

Chcąc uzyskać optymalną wydajność produkcji biogazu, należy stopniowo zwiększać dawkowanie substratu w celu adaptacji złoża. Dobranie maksymalnego dawkowania jest przedmiotem prac eksperymentalnych i modelowania dla poszczególnych konstrukcji bioreaktorów, warunków fizykochemicznych procesów fermentacyjnych i wykorzystywanych mieszanin surowców organicznych.

5.5.3. Mieszanie fermentującego roztworu/złoża

Szybkość i sposób mieszania wpływa na efektywność procesu. Zbyt duża szybkość mieszania fermentującej cieczy prowadzi do znacznego skrócenia czasu

fermentacji, w rezultacie czego gwałtownie spada wydajność produkcji metanu. Dodatkowo szybkie mieszanie ujednolica warunki w całym reaktorze, co jest niekorzystne zarówno dla etapu kwasogenezy, octanogenezy, jak i metanogenezy, które to etapy różnią się środowiskiem gwarantującym optymalne wydajności procesów. Często więc ostatnio projektuje się jednokomorowe biogazownie z osobnym reaktorem degradacyjnym i hydrolitycznym w taki sposób, aby wolnoobrotowe mieszadła pracowały w układzie kątowym lub wręcz prawie horyzontalnym.

Optymalna szybkość mieszania, podobnie jak optymalne wartości **pH** czy temperatury fermentującego wsadu dla danego zestawu szczepów bakterii powinny być wyznaczone eksperymentalnie dla danej instalacji.

5.5.4. Zwartość substancji organicznych

Już w poprzednim punkcie podkreślono rolę stężenia surowców organicznych, zwracając uwagę na konieczność nieprzekroczenia krytycznego stężenia. Należy jednak pamiętać, że zbyt małe stężenia substancji organicznej w reakcyjnej masie prowadzi do znacznego spadku efektywności procesu fermentacyjnego w wymiarze ekonomicznym. W związku z tym należy dla danego surowca lub mieszaniny surowców organicznych i dla danych warunków fermentacji (w tym dla określonych szczepów bakteryjnych) dobrać maksymalne stężenia tychże substancji organicznych w złożu reakcyjnym.

Proces fermentacji metanowej może być hamowany zarówno przez substancje dostarczane z zewnątrz wraz z surowcem organicznym, jak i substancje (produkty) tworzące się podczas procesu.

Przy ocenie wartości granicznych stężeń substancji toksycznych dla procesów fermentacyjnych należy wziąć pod uwagę zdolność adaptacyjną mikroorganizmów do warunków środowiska w którym się rozwijają, co pozwala im na przystosowanie się do określonych stężeń substancji toksycznych.

Niżej podano przykłady granicznych stężeń dla kilku substancji obecnych w komorach fermentacyjnych w sposób naturalny, biorących udział w fermentacji beztlenowej, powyżej których substancje te powodują toksyczne zakłócenia tych procesów.

Kwasy tłuszczowe; $\geq 2000 \text{ mg/dcm}^3$

Kwas masłowy; $>> 10\,000 \text{ mg/dcm}^3$

Kwas octowy; $>> 10\,000 \text{ mg/dcm}^3$

Kwas propionowy $\geq 6000 \text{ mg/dcm}^3$

5.5.5. Zawartość związków azotu

Obieg azotu w różnych stanach walencyjnych, modyfikacja tego obiegu oraz stężenie azotu jest niezwykle ważnym elementem w modelu **ADM1 / 2.2.6** oraz **2.3.2b** /.

Wynika to z faktu, że związki azotu pojawiające się w komorach fermentacyjnych (amoniak, azotany (**III**, **IV**), kation amonowy itp.) mogą mieć przy pewnych stężeniach niekorzystny wpływ na proces beztlenowej fermentacji.

Dotyczy to głównie grupy azotanowej i amonowej.

Np. wpływ grupy NH_4^+ na omawiane procesy fermentacji beztlenowej przedstawia się następująco:

Tabela 23. Wpływ stężenia jonów amonowych na przebieg fermentacji metanowej.

Stężenie NH_4^+ [mg/dcm ³]	Wpływ
50 - 200	stymulujący
200 - 1000	bez wpływu
1500 - 3000	hamujący przy podwyższonym pH
>3000	toksyczny

5.5.6. Zawartość makro i mikroelementów

Obecność, proporcje, a przede wszystkim poziom stężeń składników mineralnych: makroelementów (wapń, azot, fosfor, siarka, potas, sód, magnez, żelazo,) i mikroelementów (nikiel, kobalt, molibden, selen, wolfram oraz cynk, miedź i mangan dla bakterii octanowych) mają znaczący wpływ na efektywność generowania biogazu, bowiem ich zbyt niski poziom może prowadzić do przyhamowywania rozwoju poszczególnych grup mikroorganizmów, nadmiar natomiast może być toksyczny.

Ostatnio dużą karierę robią dodawane sztucznie do fermentującego złoza w biogazowni mikrododatki (często mikroelementy), których obecność wpływa na efektywność poszczególnych etapów fermentacji. Wykazano, że ich rola jest widocznie znacząca, jednak same mechanizmy ich działania wymagają szczególnych badań.

W tabeli 24 przedstawiono wpływ stężenia kationów metali stanowiących makroelementy w świecie organizmów żywych na procesy fermentacyjne:

Tabela 24. Wpływ jonów metali na przebieg fermentacji.

mg/dcm ³	Działanie		
	stymulujące	średnio niebezpieczne	toksyczne
Ca^{+2}	100–200 mg/dcm ³	2500-4000 mg/dcm ³	8000 mg/dcm ³
Mg^{+2}	75-150 mg/dcm ³	1000-1500 mg/dcm ³	3000 mg/dcm ³

K ⁺	200-400 mg/dcm ³	2500-4500 mg/dcm ³	12 000 mg/dcm ³
Na ⁺	100-200 mg/dcm ³	3500-5500 mg/dcm ³	8000 mg/dcm ³

5.6. PODSUMOWANIE I UWAGI KOŃCOWE

W ramach realizowanego projektu powstało stanowisko laboratoryjne do badania procesów fermentacji metanowej. Stanowisko zbudowano na podstawie opracowanego scentralizowanego i rozproszonego systemu zarządzania i kontroli biogazowni z wykorzystaniem topologii sieci komunikacyjnej mieszanej. Sterowanie stanowiskiem zostało zaprojektowane i wykonane tak, aby było w pełni skalowalne do przemysłowych biogazowni. Monitoring i sterowanie pozwala na zdalny dostęp:

<http://www.biotrans.uni.wroc.pl/pl/metanogeneza,13.htm>

Takie rozwiązanie pozwala na pracę w chmurze, umożliwiając współpracę zespołów w różnych lokalizacjach.

Zaimplementowano i zoptymalizowano również matematyczny model symulacyjny kinetyki fermentacji metanowej w oparciu o model strukturalny ADM1 do badania wpływu składu surowca na efektywność biodegradacji. Model ten wprowadzono do programu komputerowego umożliwiającego zautomatyzowanie modelowania procesu. Po opracowaniu metod, w wyniku przeprowadzonych badań na powstałym stanowisku badawczym, uzyskano szereg danych eksperymentalnych takich jak :

- aktywności enzymatycznych w badanym materiale,
- charakterystyka szczepów i skład populacji w procesie produkcji biogazu,
- parametry fizyczne, chemiczne i biochemiczne oraz wydajność produkcji biogazu na różnych substratach.

Dane zebrane o organizmach metanogennych posłużyły do utworzenia bazy danych:

<http://metanogen.biotech.uni.wroc.pl/>

Po wprowadzaniu danych do modelu opracowano wirtualny model biogazowni utylizującej różne substraty. Pozwala on na wizualizację przebiegu procesów technologicznych fermentacji beztlenowej biogazowni i opracowywanie układów alarmowych, bezpieczeństwa i samokontroli.

Uzyskane rezultaty umożliwiają współpracę z przemysłem w zakresie optymalizacji pracy biogazowni, doboru składu surowca, modernizacji sterowania, szkolenia operatorów biogazowni czy projektowania nowych instalacji.

Dodatkowo wyniki badań pozwoliły na opracowanie nowych koncepcji budowy biogazowni, które są przedmiotem zgłoszenia patentowego.

LITERATURA

1. (1998). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater 20th Edition. Washington DC, American Public Health Association.
2. Abreu, A. A., J. I. Alves, et al. "Strategies to suppress hydrogen-consuming microorganisms affect macro and micro scale structure and microbiology of granular sludge." *Biotechnology and Bioengineering* 108(8): 1766-1775.
3. Amann, R. I., W. Ludwig, et al. (1995). "Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation." *Microbiol Rev* 59(1): 143-69.
4. Angelidaki, I., M. Alves, et al. (2006). *Anaerobic Biodegradation, Activity and Inhibition*. Lyngby.
5. Ariesyady, H. D., T. Ito, et al. (2007). "Functional bacterial and archaeal community structures of major trophic groups in a full-scale anaerobic sludge digester." *Water Research* 41(7): 1554-1568.
6. Arudchelvam, Y., M. Perinpanayagam, et al. (2010). "Predicting VFA formation by dark fermentation of particulate substrates." *Bioresource Technology* 101(19): 7492-7499.
7. Batstone, D. J., Keller, J., Angelidaki, I., Kalyuzhnyi, S.V., Pavlostathis, S.G., Rozzi, A., Sanders, W.T.M., Siegrist, H., Vavilin, V.A. (2002). "Anaerobic digestion model no.1." Scientific and Technical Report 9, International Water Association (IWA), London.
8. Biernacki, P., S. Steinigeweg, et al. (2012). „Application of Anaerobic Digestion Model No.1 for describing anaerobic digestion of grass, maize, green weed silage, and industrial glycerine." *Bioresource Technology*.
9. Biernacki, P., S. Steinigeweg, et al. (2013). „Application of Anaerobic Digestion Model No. 1 for describing anaerobic digestion
10. of grass, maize, green weed silage, and industrial glycerine." *Bioresource Technology* 127: 188-194.
11. Bligh, E. R., Dyer, W.J. (1959). „A rapid method for total lipid extraction and purification." *Can.J.Biochem.Physiol.* 37: 911-917.
12. Boe, K., J. P. Steyer, et al. (2008). „Monitoring and control of the biogas process based on propionate concentration using online VFA measurement." *Water Science and Technology* 57(5): 661-6.

13. Boone, D. R. and M. P. Bryant (1980). „Propionate-Degrading Bacterium, *Syntrophobacter wolinii* sp. nov. gen. nov., from Methanogenic Ecosystems.” *Appl. Environ. Microbiol.* 40(3): 626-632.
14. Carrère, H., C. Dumas, et al. (2010). „Pretreatment methods to improve sludge anaerobic degradability: A review.” *Journal of Hazardous Materials* 183(1-3): 1-15.
15. Chartrain, M. and J. G. Zeikus (1986). „Microbial Ecophysiology of Whey Biomethanation: Characterization of Bacterial Trophic Populations and Prevalent Species in Continuous Culture.” *Appl. Environ. Microbiol.* 51(1): 188-196.
16. Cheng, C.-H., C.-H. Hung, et al. (2008). „Microbial community structure of a starch-feeding fermentative hydrogen production reactor operated under different incubation conditions.” *International Journal of Hydrogen Energy* 33(19): 5242-5249.
17. Chudy, D., S. Jabłoński, et al. (2011). „Określenie dynamiki formowania biofilmu przez mikroorganizmy złoża metanogennej techniką mikroskopii fluorescencyjnej i ciemnego pola z wykorzystaniem komputerowej analizy obrazu.” *Acta Scientiarum Polonorum: Biotechnologia* 10(4): 17-28.
18. Claassen, P. A. M., H. van der Spoet, et al. (1999). Hydrogen production from biomass by extherophilic bacteria. Third European Motor Biofuels Forum. Brussels, Belgium.
19. Cochran, W. G. (1950). “Estimation of Bacterial Densities by Means of the “Most Probable Number”.” *Biometrics* 6(2): 105-116.
20. Demirel, B., S. Ergun, et al. (2009). “Performance and behaviour of the microbial community of an anaerobic biogas digester using sugar beet silage as mono-substrate.” *Biosystems Engineering* 102(4): 444-452.
21. Deppenmeier, U. (2002). “Redox-driven proton translocation in methanogenic Archaea.” *Cell Mol Life Sci* 59(9): 1513-33.
22. Donoso-Bravo, A., J. Mailier, et al. (2011). “Model selection, identification and validation in anaerobic digestion: A review.” *Water Research* 45(17): 5347-5364.
23. Eastman, J. A. and J. F. Ferguson (1981). “Solubilization of particulate organic carbon during the acid phase of anaerobic digestion.” *Journal Water Pollution Control Federation* 53: 352-366.
24. Franke-Whittle, I. H., M. Goberna, et al. (2009). “Design and testing of real-time PCR primers for the quantification of *Methanoculleus*, *Methanosarcina*, *Methanothermobacter*, and a group of uncultured methanogens.” *Can J Microbiol* 55(5): 611-6.
25. Gadhamshetty, V., Y. Arudchelvam, et al. (2010). “Modeling dark fermentation for biohydrogen production: ADM1-based model vs. Gompertz model.” *International Journal of Hydrogen Energy* 35(2): 479-490.

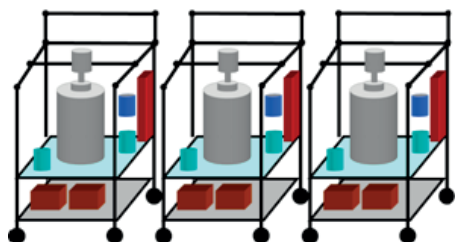
26. Gannoun, H., E. Khelifi, et al. (2008). "Ecological clarification of cheese whey prior to anaerobic digestion in upflow anaerobic filter." *Bioresource Technology* 99(14): 6105-6111.
27. Garcia, J.-L., B. K. C. Patel, et al. (2000). "Taxonomic, Phylogenetic, and Ecological Diversity of Methanogenic Archaea." *Anaerobe* 6(4): 205-226.
28. Gossett, J. M. and R. L. Belser (1982). "Anaerobic digestion of waste activated sludge." *J. Environ. Eng. ASCE* 108: 1101-1120.
29. Grosskopf, R., P. H. Janssen, et al. (1998). "Diversity and structure of the methanogenic community in anoxic rice paddy soil microcosms as examined by cultivation and direct 16S rRNA gene sequence retrieval." *Applied and Environmental Microbiology* 64(3): 960-9.
30. Gupta, N., P. Rathi, et al. (2002). "Simplified para-nitrophenyl palmitate assay for lipases and esterases." *Analytical biochemistry* 311: 98-99.
31. Guwy, A. J., R. M. Dinsdale, et al. (2011). "Fermentative biohydrogen production systems integration." *Bioresource Technology* 102(18): 8534-8542.
32. Hawkes, F. R., I. Hussy, et al. (2007). "Continuous dark fermentative hydrogen production by mesophilic microflora: Principles and progress." *International Journal of Hydrogen Energy* 32(2): 172-184.
33. Hulshoff Pol, L., P. L. Lens, et al. (1998). "Anaerobic treatment of sulphate-rich wastewaters." *Biodegradation* 9(3-4): 213-224.
34. Hung, C.-H., K.-S. Lee, et al. (2007). "Quantitative analysis of a high-rate hydrogen-producing microbial community in anaerobic agitated granular sludge bed bioreactors using glucose as substrate." *Applied Microbiology and Biotechnology* 75(3): 693-701.
35. Hungate, R. E. (1950). "The anaerobic mesophilic cellulolytic bacteria." *Bacteriol Rev* 14(1): 1-49.
36. Imachi, H., Y. Sekiguchi, et al. (2000). "Cultivation and In Situ Detection of a Thermophilic Bacterium Capable of Oxidizing Propionate in Syntrophic Association with Hydrogenotrophic Methanogens in a Thermophilic Methanogenic Granular Sludge." *Applied And Environmental Microbiology* 66(8): 3608-3615.
37. Ka Yu, Cheng, et al. (2007). *Limitations of Bio-Hydrogen Production by Anaerobic Fermentation Process: An Overview*, American Institute of Physics.
38. Kanokwan, B., B. Damien John, et al. (2007). "An innovative online VFA monitoring system for the anerobic process, based on headspace gas chromatography." *Biotechnology and Bioengineering* 96(4): 712-721.
39. Kelly, R. M. and J. W. Deming (1988). "Extremely Thermophilic Archaeobacteria: Biological and Engineering Considerations." *Biotechnology Progress* 4(2): 47-62.

40. Khanal, S. K. and J.-C. Huang (2003). "ORP-based oxygenation for sulfide control in anaerobic treatment of high-sulfate wastewater." *Water Research* 37(9): 2053-2062.
41. Klocke, M., E. Nettmann, et al. (2008). "Characterization of the methanogenic Archaea within two-phase biogas reactor systems operated with plant biomass." *Syst Appl Microbiol* 31(3): 190-205.
42. Koch, K., M. Lübken, et al. (2010). "Biogas from grass silage - Measurements and modeling with ADM1." *Bioresource Technology* 101(21): 8158-8165.
43. Kongjan, P., S. O-Thong, et al. "Performance and microbial community analysis of two-stage process with extreme thermophilic hydrogen and thermophilic methane production from hydrolysate in UASB reactors." *Bioresource Technology* 102(5): 4028-4035.
44. Krasowska, A. and M. Łukaszewicz (2007). "Izolacja, identyfikacja oraz aktywność proteolityczna i lipolityczna mikroorganizmów arktycznych." *Acta Scientiarum Polonorum: Biotechnologia* 10(3-12).
45. Krieg, N. R., D. J. Brenner, et al. (2005). *Identification of Procaryotes*
46. *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology*, Springer US: 33-38.
47. Lauwers, J., L. Appels, et al. (2013). "Mathematical modelling of anaerobic digestion of biomass and waste: Power and limitations." *Progress in Energy and Combustion Science* 39(4): 383-402.
48. Lee, M.-J., J.-H. Song, et al. (2009). "Effects of acid pre-treatment on bio-hydrogen production and microbial communities during dark fermentation." *Bioresource Technology* 100(3): 1491-1493.
49. Li, Z., B. A. Wrenn, et al. (2005). "Effect of iron on the sensitivity of hydrogen, acetate, and butyrate metabolism to inhibition by long-chain fatty acids in vegetable-oil-enriched freshwater sediments." *Water Research* 39(13): 3109-3119.
50. Liwarska-Bizukojc, E. and R. Biernacki (2010). "Identification of the most sensitive parameters in the activated sludge model implemented in BioWin software." *Bioresource Technology* 101(19): 7278-7285.
51. Ljung, L. (1987). *System identification: theory for the user*. Englewood Cliffs, Prentice-Hall.
52. Lübken, M., M. Wichern, et al. (2007). "Modelling the energy balance of an anaerobic digester fed with cattle manure and renewable energy crops." *Water Research* 41(18): 4085-4096.
53. McInerney, M. J., M. P. Bryant, et al. (1981). "Syntrophomonas wolfei gen. nov. sp. nov., an Anaerobic, Syntrophic, Fatty Acid-Oxidizing Bacterium." *Applied and Environmental Microbiology* 41(4): 1029-1039.
54. Mechichi, T. and S. Sayadi (2005). "Evaluating process imbalance of anaerobic digestion of olive mill wastewaters." *Process Biochemistry* 40(1): 139-145.

55. Miller, T. L. and M. J. Wolin (1974). "A serum bottle modification of the Hungate technique for cultivating obligate anaerobes." *Appl Microbiol* 27(5): 985-7.
56. Miller, T. L. and M. J. Wolin (2001). "Inhibition of Growth of Methane-Producing Bacteria of the Ruminant Forestomach by Hydroxymethylglutaryl- α -L-CoA Reductase Inhibitors." *Journal of Dairy Science* 84(6): 1445-1448.
57. Mink, R. W. and P. R. Dugan (1977). "Tentative Identification of Methanogenic Bacteria by Fluorescence Microscopy." *Appl. Environ. Microbiol.* 33(3): 713-717.
58. Munson, M. A., D. B. Nedwell, et al. (1997). "Phylogenetic diversity of Archaea in sediment samples from a coastal salt marsh." *Applied and Environmental Microbiology* 63(12): 4729-33.
59. Nadkarni, M. A., F. E. Martin, et al. (2002). "Determination of bacterial load by real-time PCR using a broad-range (universal) probe and primers set." *Microbiology* 148(Pt 1): 257-66.
60. Neumann, H., A. Gierl, et al. (1983). "Organization of the genes for ribosomal RNA in archaebacteria." *Molecular and General Genetics MGG* 192(1): 66-72.
61. Nielsen, H. B., H. Uellendahl, et al. (2007). "Regulation and optimization of the biogas process: Propionate as a key parameter." *Biomass and Bioenergy* 31(820-830).
62. Paynter, M. J. B. and R. E. Hungate (1968). "Characterization of *Methanobacterium mobilis* sp. n., isolated from bovine rumen." *J. Bacteriol.* 1943.
63. Peck, M. W. (1989). "Changes in concentrations of coenzyme F420 analogs during batch growth of *Methanosarcina barkeri* and *Methanosarcina mazei*." *Appl. Environ. Microbiol.* 55(4): 940-945.
64. Peck, M. W. and D. P. Chynoweth (1990). "On-line monitoring of the methanogenic fermentation by measurement of culture fluorescence." *Biotechnology Letters* 12(1): 17-22.
65. Peiris, B. R., P. G. Rathnasiri, et al. (2006). "ADM1 simulations of hydrogen production." *Water Science and Technology* 53(8): 129-137.
66. Penumathsa, B. K. V., G. C. Premier, et al. (2008). "ADM1 can be applied to continuous bio-hydrogen production using a variable stoichiometry approach." *Water Research* 42(16): 4379-4385.
67. Perera, K. R. J., B. Ketheesan, et al. (2012). "Fermentative biohydrogen production II: Net energy gain from organic wastes." *International Journal of Hydrogen Energy* 37(1): 167-178.
68. Ramirez, I., A. Mottet, et al. (2009). "Modified ADM1 disintegration/hydrolysis structures for modeling batch thermophilic anaerobic digestion of thermally pre-treated waste activated sludge." *Water Research* 43(14): 3479-3492.

69. Rasika J. Perera, K. and N. Nirmalakhandan (2011). "Modeling fermentative hydrogen production from sucrose supplemented with dairy manure." *International Journal of Hydrogen Energy* 36(3): 2102-2110.
70. Saiki, Y., C. Iwabuchi, et al. (2002). "Microbial analyses by fluorescence in situ hybridization of well-settled granular sludge in brewery wastewater treatment plants." *J Biosci Bioeng* 93(6): 601-6.
71. Sanders, W. T., M. Geerink, et al. (2000). "Anaerobic hydrolysis kinetics of particulate substrates" *Water Science and Technology* 41(3): 17-24.
72. Sawayama, S., K. Tsukahara, et al. (2006). "Phylogenetic description of immobilized methanogenic community using real-time PCR in a fixed-bed anaerobic digester." *Bioresour Technol* 97(1): 69-76.
73. Schattauer, A. and P. Weiland (2005). *Biogaz produkcja i wykorzystanie Fachagentur für Nachwachsende Rohstoffe e.V.*
74. Scherer, P., K. Lehmann, et al. (2009). "Application of a fuzzy logic control system for continuous anaerobic digestion of low buffered, acidic energy crops as mono-substrate." *Biotechnology and Bioengineering* 102(3): 736-748.
75. Schlegel, H. G. (2000). *Mikrobiologia ogólna*. Warszawa, Wydawnictwo naukowe PWN.
76. Schoen, M. A., D. Sperl, et al. (2009). "Population dynamics at digester overload conditions." *Bioresour Technol* 100(23): 5648-5655.
77. Sekiguchi, Y., Y. Kamagata, et al. (1999). "Fluorescence In Situ Hybridization Using 16S rRNA-Targeted Oligonucleotides Reveals Localization of Methanogens and Selected Uncultured Bacteria in Mesophilic and Thermophilic Sludge Granules." *Applied and Environmental Microbiology* 65(3): 1280-1288.
78. Solera, R., L. I. Romero, et al. (2001). "Analysis of the methane production in thermophilic anaerobic reactors: use of autofluorescence microscopy." *Biotechnology Letters* 23(22): 1889-1892.
79. Stefanie, J. W. H. O. E., J. C. V. Werner, et al. (1998). "Characterization of the sulfate-reducing and syntrophic population in granular sludge from a full-scale anaerobic reactor treating papermill wastewater." *FEMS Microbiology Ecology* 27(2): 185-194.
80. van der Zee, F. P., S. Villaverde, et al. (2007). "Sulfide removal by moderate oxygenation of anaerobic sludge environments." *Bioresour Technol* 98(3): 518-524.
81. van Soest, P. J. and R. H. Wine (1967). "Use of detergents in the analysis of fibrous feeds IV. Determination of plant cell-wall constituents." *Journal of Association of Official Analytical Chemists* 50(1): 50-59.

82. Vavilin, V. A., B. Fernandez, et al. (2008). "Hydrolysis kinetics in anaerobic degradation of particulate organic material: an overview." *Waste Manag* 28(6): 939-51.
83. Vavilin, V. A., S. V. Rytov, et al. (1996). "A description of hydrolysis kinetics in anaerobic degradation of particulate organic matter." *Bioresource Technology* 56(2&3): 229-237.
84. Venetsaneas, N., G. Antonopoulou, et al. (2009). "Using cheese whey for hydrogen and methane generation in a two-stage continuous process with alternative pH controlling approaches." *Bioresour Technol* 100(15): 3713-7.
85. Wang, Q., M. Kuninobu, et al. (1999). "Degradation of volatile fatty acids in highly efficient anaerobic digestion." *Biomass and Bioenergy* 16(6): 407-416.
86. Wett, W. E., A.; Ogurek, M. (2006). "Description of nitrogen incorporation and release in ADM1." *Water Science & Technology* 54(4): 67-76.
87. Wichern, M., M. Lübken, et al. (2008). "Investigations and mathematical simulation on decentralized anaerobic treatment of agricultural substrate from livestock farming." *Water Science & Technology* 58(1): 67-72.
88. Witkiewicz, Z. (2000). *Podstawy chromatografii*. Warszawa, Wydawnictwo Naukowo-Techniczne.
89. Wong, D. W. (2009). „Structure and action mechanism of ligninolytic enzymes.” *Appl Biochem Biotechnol* 157(2): 174-209.
90. Yu, Y., J. Kim, et al. (2006). „Use of real-time PCR for group-specific quantification of acetoclastic methanogens in anaerobic processes: population dynamics and community structures.” *Biotechnol Bioeng* 93(3): 424-33.
91. Yu, Y., C. Lee, et al. (2005). „Group-specific primer and probe sets to detect methanogenic communities using quantitative real-time polymerase chain reaction.” *Biotechnology and Bioengineering* 89(6): 670-679.
92. Zayed, G. and J. Winter (2000). „Inhibition of methane production from whey by heavy metals--protective effect of sulfide.” *Applied and Environmental Microbiology* 53(6): 726-31.
93. Zhang, Z.-P., K.-Y. Show, et al. (2007). „Rapid formation of hydrogen-producing granules in an anaerobic continuous stirred tank reactor induced by acid incubation.” *Biotechnology and Bioengineering* 96(6): 1040-1050.



Zadanie 2.2.

Monitoring i sterowanie procesem technologicznym biogazowni utylizującej organiczne odpady rolnicze, hodowlane i przemysłowe oraz odchody.

Optymalizacja sterowania w instalacjach produkujących biogaz pozwala na zwiększenie wydajności produkcji, zmniejszenie kosztów związanych obsługą biogazowni oraz przyspieszenia reakcji na sytuacje awaryjne. Ważnym narzędziem wykorzystywanym podczas projektowania instalacji oraz planowania procedur postępowania są modele matematyczne.

W realizowanej pracy stworzono model komputerowy oparty na założeniach opracowanych w ADM1 (Anaerobic Digestion Model No.1), dedykowanego do procesu fermentacji metanowej w instalacjach rolniczych. Model zaimplementowano w środowisku Octave, umożliwiającym jego dystrybucję i dalszy rozwój opracowanej aplikacji.

W celu zasilania modelu niezbędnymi danymi wejściowymi opracowano metody pomiarowe i wykonano szereg oznaczeń dla wybranych parametrów. W szczególności skupiono się na aktywnościach enzymatycznych, określeniu składu substratu, jak również wyznaczeniu indywidualnych danych kinetycznych niezbędnych do prowadzenia symulacji odzwierciedlających parametry uzyskiwane w pracach eksperymentalnych.

W ramach prowadzonych badań izolowano i charakteryzowano szczepy mogące służyć jako szczepionki. Przygotowano bazę danych metanogenów <http://metanogen.biotech.uni.wroc.pl/>. Opracowano metody charakterystyki aktywności metabolicznej szczepów. Uzyskane wyniki umożliwiły opracowanie udoskonalonego algorytmu rozruchu biogazowni lub adaptacji do nowych substratów. W ramach realizacji projektu stworzono również system scentralizowanego i rozproszonego systemu zarządzania i kontroli biogazowni z wykorzystaniem topologii sieci komunikacyjnej mieszanej opartej na sterownikach PLC. W połączeniu z oprogramowaniem SCAD oraz ASIX system służy do zbierania i wizualizacji danych procesowych dotyczących fermentacji metanowej, które następnie wykorzystano do kalibracji modelu symulującego fermentację metanową.

Prezentowane stanowisko laboratoryjne wraz z metodologią badawczą oraz modelem matematycznym stanowią komplet narzędzi przydatnych w procesie planowania strategii operacyjnej dla biogazowni.

ISBN: 978-83-63503-29-1

Egzemplarz bezpłatny

PROJEKT WSPÓLFINANSOWANY PRZEZ UNIĘ EUROPEJSKĄ ZE ŚRODKÓW EUROPEJSKIEGO FUNDUSZU ROZWOJU REGIONALNEGO



INNOWACYJNA GOSPODARKA
NARODOWA STRATEGIA SPÓJNOŚCI

UNIA EUROPEJSKA
EUROPEJSKI FUNDUSZ
ROZWOJU REGIONALNEGO

