

MARIOLA MENDRYCKA, JERZY MIERZEJEWSKI, ANDRZEJ LIDACKI<sup>1</sup>, KRZYSZTOF ŚMIECHOWSKI

WPŁYW WYBRANYCH ŚRODKÓW CHEMICZNYCH STOSOWANYCH  
W GARBARSTWIE NA NIEKTÓRE BAKTERIE WCHODZĄCE W SKŁAD  
OSADU CZYNNEGO

INFLUENCE OF TANNERY CHEMICAL COMPOUNDS ON THE SELECTED  
BACTERIA OF THE ACTIVATED SLUDGE

Politechnika Radomska im. K. Pułaskiego, Zakład Technologii Garbarstwa  
Kierownik: dr inż. J. Piechna

<sup>1</sup> Ośrodek Badań Weterynaryjnych Wojskowego Instytutu Higieny i  
Epidemiologii w Puławach

Kierownik: płk dr hab. M. Bartoszcze

*W pracy prześlędzono wpływ oddziaływania kąpeli do garbowania chromowego i kąpeli do natłuszczania skór na bakteryjną florę ściekową w układzie modelowym. Stwierdzono wpływ wielkości inokulum na przeżywalność wsiewanych bakterii. Badania wykazały, że przeżywalność ta była ograniczona barierą 10, a nawet 15-krotnego rozcieńczenia kąpeli chromowej ściekiem syntetycznym.*

Uczynnianie ścieków garbarskich, podobnie jak i innych ścieków przemysłowych, zachodzi przede wszystkim przez stworzenie warunków fizykochemicznych do namnażania mikroorganizmów, biorących udział w tlenowym rozkładzie związków organicznych.

Ścieki garbarskie, pochodzące z garbowania chromowego, zawierają duże ilości soli chromowych. Dotychczas obecność chromu była szeroko badana pod kątem oddziaływania na aktywność biologiczną orzęsek (pierwotniaków), które stanowią istotną część składową mikroorganizmów ścieków. Są one powszechnie stwierdzane w liczbach rzędu 10<sup>4</sup>/ml w ściekach komunalnych. W mieszaninie biomasy spełniają ważną funkcję pożerania większości bakterii, przez co poprawiają jakość ścieków [4]. Natomiast w małym stopniu badano zachowanie się tej drugiej części składowej biomasy, a mianowicie bakterii, wobec chromu i innych środków chemicznych stosowanych w garbarstwie.

W pracy postanowiono prześlędzić wpływ oddziaływania kąpeli do garbowania chromowego i kąpeli do natłuszczania skór na bakteryjną florę ściekową w układzie modelowym. Uznano przy tym za celowe wyjaśnienie wpływu całych kompozycji kąpielowych jak i ich poszczególnych składników na zachowanie się flory bakteryjnej.

## MATERIAŁY I METODYKA BADAŃ

## Środki do garbowania skór

Do badań użyto handlowych środków stosowanych do garbowania skór bydłych w tzw. kąpielach:

1. Kąpiel do garbowania chromowego (tzw. brzeczek) o składzie: chromal 2%; chlorek sodu 3%; mrówczan sodu 0,5%, H<sub>2</sub>O do 100%.
2. Kąpiel do natuszczania skór o składzie: mieszanina modyfikowanych polikolem 400 kwasów tłuszczowych odwadnianych P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> w ilości 0,5g; mieszanina modyfikowanych polikolem 400 kwasów tłuszczowych odwadnianych azotropowo w ilości 0,5g; mieszaniny te rozcieńczano w 1 l wody.

## Bakterie

Z kolekcji 40 wzorcowych szczepów bakterii ściekowych, otrzymanych z Zakładu Bakteriologii Instytutu Inżynierii Sanitarnej Politechniki Warszawskiej, wybrano do badań 3 reprezentujące następujące gatunki bakterii: *Acinetobacter baumannii*, *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas cepacia*.

## Podłoża bakteryjne i rozcieńczalniki

1. Zwykłe podłoże odżywcze agarowe do przechowywania szczepów.
2. Standardowe podłoże agarowe do oznaczania liczby bakterii (Plate Count Agar – PCA) sporządzane z dehydratyzowanego podłoża firmy BioMerieux wg przepisu producenta.
3. Bulion z wyciągiem mózgowo-sercowym (BHI) sporządzany z dehydratyzowanego podłoża firmy bioMerieux służący do namnażania szczepów bakteryjnych.
4. Zbuforowany płyn fizjologiczny (PBS) do sporządzania zawiesin bakteryjnych oraz ich rozcieńczeń.
5. Ściek syntetyczny wg *Weinbergera* [5] służący do sporządzania rozcieńczeń badanych środków do garbowania, do których wsiewano szczepy bakterii.

Podłoża i rozcieńczalniki, po sporządzeniu i ustaleniu odpowiednich wartości pH, wyjaławiano przez autoklawowanie (121°C, 15 min.).

Szczepy bakteryjne przechowywane na skosach agarowych posiewano do bulionu z wyciągiem mózgowo-sercowym (BHI). Po 24 godzinnej inkubacji w temperaturze 30°C hodowle przesiewano na płytki z podłożem PCA i namnażano przez 48 godzin w temperaturze 30°C w warunkach tlenowych. Następnie pobierano zęą po kilka kolonii i zawieszano w płynie PBS. Probówki z zawiesinami intensywnie wytrząsano w celu uzyskania jednolitego zmętnienia. Przybliżoną liczbę bakterii w 1ml ustalano wstępnie wg skali *McFarlanda* (nr 4 – ok. 1,2. x 10<sup>9</sup> komórek/ml).

Przed przystąpieniem do badań sporządzano dziesięciokrotne rozcieńczenia zawiesin w PBS i wybierano rozcieńczenia o pożądanej liczbie komórek bakterii w 1 ml. Z rozcieńczeń tych dokonywano posiewów ilościowych na podłoże PCA w celu określenia bardziej dokładnej liczby bakterii w 1ml zawiesiny. Po 48 godzinnym namnażaniu w temperaturze 30°C liczono wyrosłe kolonie i obliczano liczbę bakterii w 1ml.

Znając liczbę bakterii w 1ml wysiewano stosowne inokula do roztworów badanych środków rozcieńczanych w ścieku syntetycznym w stosunku 0,1 ml inokulum do 9,9 ml rozcieńczonego środka. Po 48 godzinach inkubacji określano liczbę żywotnych bakterii w badanym roztworze kąpeli do garbowania chromowego przez wysiew kontrolny na podłoże PCA.

Na podstawie uzyskanych wyników wyznaczono minimalne inokulum, przy którym utrzymywano żywotność bakterii po upływie 48 godzin przetrzymywania prób w temperaturze 30°C.

To minimalne inokulum wsiewano do rozcieńczeń kąpeli do garbowania chromowego bliskich granicznemu rozcieńczeniu, w którym była hamowana vegetacja w ustalonym 48 godz. okresie i śledzono zachowanie się ilościowe poszczególnych szczepów na podstawie obliczeń bakterii po upływie 24, 48 i 72 godzin przetrzymywania prób w temperaturze 30°C.

Analogiczne postępowanie przyjęto przy oznaczaniu wpływu kąpeli do natfuszczenia na użyte szczepy bakterii.

Uzyskane wyniki wyrażono w wartościach średnich z trzech doświadczeń.

### WYNIKI

W pierwszej serii doświadczeń ustalono wpływ wielkości inokulum użytych wzorcowych szczepów bakterii na ich zdolność do zachowania żywotności w roztworach kąpeli do garbowania chromowego skór w ścieku syntetycznym w ustalonym 48 godzinnym okresie przetrzymywania w temp 30°C. Uzyskane wyniki badań przedstawiono w tabeli I.

Tabela I. Wpływ wielkości inokulum na zachowanie żywotności użytych szczepów bakterii w rozcieńczeniach kąpeli do garbowania chromowego skór przetrzymywanych w okresie 48 godz. w temp. 30°C

The influence of inoculum size for the maintaining of vitability of used bacterial strains in diluted baths for chrome tanning of skins kept for 48 hours in the temperature 30°C

Bakterie	Liczba bakterii w inokulum	Rozcieńczenia kąpeli do garbowania skór					
		N	1:2	1:5	1:10	1:15	1:20
<i>Acinetobater baumannii</i>	$5,6 \times 10^8$	-	-	+	+	+	+
	$5,6 \times 10^7$	-	-	-	+	+	+
	$5,6 \times 10^6$	-	-	-	-	+	+
	$5,6 \times 10^5$	-	-	-	-	-	-
	$5,6 \times 10^4$	-	-	-	-	-	-
	$5,6 \times 10^3$	-	-	-	-	-	-
<i>Aeromonas hydrophila</i>	$5,6 \times 10^8$	-	-	+	+	+	+
	$5,6 \times 10^7$	-	-	-	+	+	+
	$5,6 \times 10^6$	-	-	-	-	+	+
	$5,6 \times 10^5$	-	-	-	-	+	+
	$5,6 \times 10^4$	-	-	-	-	+	+
	$5,6 \times 10^3$	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas cepacia</i>	$5,6 \times 10^8$	-	+	+	+	+	+
	$5,6 \times 10^7$	-	-	-	-	+	+
	$5,6 \times 10^6$	-	-	-	-	+	+
	$5,6 \times 10^5$	-	-	-	-	+	+
	$5,6 \times 10^4$	-	-	-	-	-	+
	$5,6 \times 10^3$	-	-	-	-	-	-

N – roztwór macierzysty

+ – wzrost bakterii

- - brak wzrostu bakterii

Jak wynika z tabeli I, przy inokulum  $5,6 \times 10^8$  stwierdzono żywotność *Pseudomonas cepacia* już w rozcieńczeniu 1:2 kąpeli do garbowania chromowego skór (brzeczki).

Żywotność pozostałych szczepów: *Acinetobacter baumannii* i *Aeromonas hydrophila* została zachowana począwszy od rozcieńczenia 1:5.

Odwrotne wyniki uzyskano przy inokulum  $5,6 \times 10^7$ . *Acinetobacter baumannii* i *Aeromonas hydrophila* okazały się żywotne począwszy od rozcieńczenia 1:10, a *Pseudomonas cepacia* dopiero od kolejnego rozcieńczenia, tj. 1:15. Przy tym rozcieńczeniu brzezki stwierdzono żywotność wszystkich 3 szczepów bakterii z wysiewu inokulum  $5,6 \times 10^6$ , przy czym szczep *Pseudomonas cepacia* był żywotny jeszcze z inokulum  $5,6 \times 10^5$ , a *Aeromonas hydrophila* nawet z inokulum  $5,6 \times 10^4$ .

Przy inokulum  $5,6 \times 10^3$ , nie stwierdzono żywotności żadnego z 3 szczepów bakterii. Ostatecznie, jako minimalne okazało się inokulum  $5,6 \times 10^6$ , przy którym otrzymano żywotność wszystkich szczepów.

Tabela II przedstawia wyniki badań nad ilościowym zachowaniem się szczepów bakteryjnych w przedziale rozcieńczeń brzezki bliskich granicy przeżywalności, tj. od 1:10 do 1:20 w okresie 72 godz. obserwacji.

Tabela II. Liczby bakterii w rozcieńczeniach brzezki w okresie 72 godz. obserwacji  
Amounts of bacteriae in wort dillutions for 72 hours of observation

Bakterie	Czas obserwacji (w godz.)	Rozcieńczenia brzezki		
		1:10	1:15	1:20
		Liczba bakterii w 1 ml próbki*		
<i>Acinetobacter baumannii</i>	0	$5,6 \times 10^6$	$5,6 \times 10^6$	$5,6 \times 10^6$
	24	–	–	$5,6 \times 10^2$
	48	–	–	$5,6 \times 10^2$
	72	–	–	$5,6 \times 10^2$
<i>Aeromonas hydrophila</i>	0	$5,6 \times 10^6$	$5,6 \times 10^6$	$5,6 \times 10^6$
	24	$5,6 \times 10^2$	$5,6 \times 10^3$	$5,6 \times 10^5$
	48	–	–	$5,6 \times 10^5$
	72	–	–	$5,6 \times 10^5$
<i>Pseudomonas cepacia</i>	0	$5,6 \times 10^6$	$5,6 \times 10^6$	$5,6 \times 10^6$
	24	–	$5,6 \times 10^4$	$5,6 \times 10^7$
	48	–	$5,6 \times 10^6$	$5,6 \times 10^7$
	72	–	$5,6 \times 10^7$	$5,6 \times 10^7$

\* Dane średnie z trzech powtórzeń

Z tabeli II wynika, że *Acinetobacter baumannii* został unieczynniony po 24 godzinach w rozcieńczeniach brzezki 1:10 i 1:15, a w rozcieńczeniu 1:20 liczba bakterii tego szczepu zmniejszała się systematycznie do kilkuset w 1 ml.

Liczby bakterii *Aeromonas hydrophila*, w rozcieńczeniach 1:10 i 1:15, zmniejszały się o 2–3 logarytmy w okresie 24-godzinnej obserwacji, a po upływie 48 godzin posiewy te zostały w pełni unieczynnione. Przy rozcieńczeniu 1:20 pozostało żywotnych kilkaset bakterii do 72 godzin, tj. do końca trwania obserwacji.

W przypadku *Pseudomonas cepacia* brzezka rozcieńczona 1:10 tak samo doprowadzała do unieczynnienia całego inokulum, a przy rozcieńczeniach 1:15 i 1:20 uzyskiwa-

no nawet systematyczny, chociaż nieznaczny, wzrost liczby bakterii świadczący o rozpoczęciu namnażania się tego szczepu.

Przedstawione wyniki badań obrazują zachowanie się wzorcowych szczepów bakterii w modelowym układzie różnych rozcieńczeń brzezki w ścieku syntetycznym. Wprawdzie wiadomo jest, że chrom jest głównym składnikiem tej kąpieli, unieczynnającym bakterie, ale nie wyjaśniony pozostawał wpływ pozostałych składników, tj. chlorku sodu, występującego w niefizjologicznym nadmiarze 3% oraz 0,5% mrówczanu sodu. Wyniki uzyskane w tej części badań przedstawiono w tabeli III.

Tabela III. Wpływ poszczególnych składników brzezki na zachowanie żywotności bakterii ściekowych  
The influence of particular wort ingredients for sewer bacteriae vitality maintenance

Bakterie	Badany składnik	Rozcieńczenia składników brzezki					
		N	1:2	1:5	1:10	1:15	1:20
Liczba bakterii w inokulum							
<i>Acinetobacter baumannii</i>	2% chromal	-	-	-	-	-	-
	3% chlorek sodu	+	+	+	+	+	+
5,6 x 10 <sup>6</sup> /ml	0,5% mrówczan sodu	+	+	+	+	+	+
<i>Aeromonas hydrophila</i>	2% chromal	-	-	-	-	+	+
	3% chlorek sodu	+	+	+	+	+	+
5,6 x 10 <sup>6</sup> /ml	0,5% mrówczan sodu	+	+	+	+	+	+
<i>Pseudomonas cepacia</i>	2% chromal	-	-	-	-	+	+
	3% chlorek sodu	+	+	+	+	+	+
5,6 x 10 <sup>6</sup> /ml	0,5% mrówczan sodu	+	+	+	+	+	+

N - roztwory macierzyste

+ - wzrost bakterii

- - brak wzrostu bakterii

Zebrane w tabeli III wyniki jednoznacznie wskazują, że działanie unieczynnające, w odniesieniu do wszystkich badanych szczepów bakterii, wykazuje jedynie chromal. Dopiero jego rozcieńczenia 1:15 i 1:20 pozwalały na zachowanie żywotności wsianych szczepów bakterii ściekowych. Pozostałe składniki, tj. 3% NaCl i 0,5% mrówczanu sodu nie okazały żadnego wpływu nawet w roztworach macierzystych.

W tabeli IV przedstawiono wyniki badań wpływu rozcieńczeń kąpieli do natłuszczenia skór na zachowanie żywotności bakterii ściekowych wsianych jednakowym inokulum i przetrzymywanych przez okres 48 godzin w temp. 30°C.

Z tabeli IV wynika, że kąpiel natłuszczająca, zarówno w stanie nierozcieńczonym, jak i w rozcieńczeniach od 1:5 do 1:20, pozostawała obojętna wobec testowych

Tabela IV. Żywotność szczepów bakterii w rozcieńczeniach kąpeli natuszczającej w ścieku syntetycznym przetrzymywanym w temp. 30°C przez okres 48 godzin  
 Vitality of bacteriae strains in dillutions of griese bath in synthetic wastes kept in temperature 30°C for 48 hours

Bakterie	Rozcieńczenia				
	N	1:5	1:10	1:15	1:20
Liczba bakterii w inokulum					
<i>Acinetobacter baumannii</i>	+	+	+	+	+
5,6 x 10 <sup>6</sup> /ml					
<i>Aeromonas hydrophila</i>	++	+	+	+	+
5,6 x 10 <sup>6</sup> /ml					
<i>Pseudomonas cepacia</i>	+	+	+	+	+
5,6 x 10 <sup>6</sup> /ml					

N - roztwór macierzysty

- - brak wzrostu bakterii

+ - wzrost bakterii

++ - intensywny wzrost bakterii

szczepów bakterii, a w stanie nierozcieńczonym stwarzała nawet warunki do bardziej intensywnego namnażania (++) dla *Aeromonas hydrophila* i *Pseudomonas cepacia*.

## OMÓWIENIE

W modelowym układzie rozcieńczeń kąpeli do garbowania chromowego skór został wykazany wpływ wielkości inokulum na przeżywalność wsiewanych bakterii. Wyniki te potwierdzają ogólną zasadę mikrobiologiczną, w myśl której im większe inokulum, tym jest większa szansa na vegetację. Jednak badania własne wykazały też, że przeżywalność ta była ograniczona barierą 10, a nawet 15-krotnego rozcieńczenia kąpeli chromowej.

Przeżywalność wsianych szczepów bakterii przebadano też pod względem ilościowego zachowania się ich w okresie 72 godzinnej obserwacji. W odniesieniu do szczepów *Acinetobacter baumannii* i *Aeromonas hydrophila* stwierdzono zmniejszanie się ilościowe jeszcze w rozcieńczeniu 1:20 brzeczki. Zmniejszenie to było szczególnie gwałtowne do 24 godzin, po czym liczba bakterii pozostawała na niezmiennym poziomie.

Bardziej oporny okazał się szczep *Pseudomonas cepacia*, który w rozcieńczeniach rzędu 1:20, 1:15 wykazywał nawet zdolność do namnażania się.

Zjawisko to ma istotne znaczenie, jeśli się zważy vegetację bakterii. Istnieje bowiem kilkugodzinna faza przygotowawcza w podłożu zaszczerpionym określoną dawką bakterii [3]. W tym czasie posiane bakterie adaptują swoje zdolności vegetacyjne do namnażania logarytmicznego. Ważna jest więc ta adaptacja wszystkich szczepów bakterii zawartych w inokulum. W przeprowadzonych badaniach ustalono, że warunki te spełnia inokulum wielkości > 10<sup>6</sup> bakterii w 1 ml wsiane do brzeczki rozcieńczonej 1:20.

Zaobserwowane zjawisko różnej wrażliwości badanych szczepów bakterii ściekowych na środek garbujący może mieć swoje odniesienia w środowisku rzeczywistych ścieków

garbarskich. Zachwianie proporcji między poszczególnymi gatunkami bakterii może w konsekwencji prowadzić do zaburzeń w równowadze mikroflory pierwotniaczej. Zjawisko takie było już opisane w badaniach nad zachowaniem się mikroflory pierwotniaczej ścieków pod wpływem metali ciężkich, w tym i chromu [4].

Brzeczka, oprócz samego chromu, zawiera 3% NaCl i 0,5% mrówczanu sodu. Na podstawie przeprowadzonych analiz można przyjąć, że nie wykazują one żadnego wpływu na żywotność bakterii ściekowych. Jedynym środkiem hamującym pozostaje więc chrom.

W piśmiennictwie znane jest powszechnie działanie chromu nie tylko na bakterie, ale i na pierwotniaki ściekowe. Podobne zresztą jest oddziaływanie innych metali ciężkich, z tym że kolejność ich toksyczności w stosunku do bakterii została określona następująco: Cd, Cu > Pb > Zn > Cr [4]. Względnie niska toksyczność chromu, w porównaniu z innymi metalami, może być przypisywana zmianie wartości z Cr<sup>VI</sup> na mniej toksyczny i rozpuszczalny w wodzie Cr<sup>III</sup>. Proces ten może zachodzić w czasie aktywowanego uzdatniania ścieku. Prócz tego może zachodzić zjawisko nabywania oporności bakterii na chrom. Potwierdzają to badania innych autorów, którzy izolowali bakterie odporne na chromiany. Redukcja chromianu przez bakterie występuje zarówno w warunkach tlenowych jak i beztlenowych, a za oporność bakterii są zwykle odpowiedzialne plazmidy [1].

Należy wspomnieć, że chrom jest z jednej strony toksyczny, a nawet mutagenny, a z drugiej jest pierwiastkiem również niezbędnym do prawidłowego funkcjonowania organizmów wyższych [2] i praktycznie nie wiadomo, czy Cr<sup>III</sup> (występujący w brzeczce garbarskiej w stężeniu od 15 do 25 g/l w przeliczeniu na Cr<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) [6] przy odpowiednim rozcieńczeniu nie okazałby się niezbędny do vegetacji bakterii. To interesujące zagadnienie wykracza jednak poza ramy nakreślonej pracy.

#### WNIOSKI

1. W oparciu o przeprowadzoną analizę bakteriologiczną układu modelowego: brzeczka + wzorcowe szczepy bakterii ściekowych + ściek syntetyczny wykazano nierównomiernie hamujący wpływ chromu na vegetację bakterii.

2. Uzyskane wyniki określają orientacyjne progi rozcieńczeń brzeczki w ścieku syntetycznym, od których bakterie zachowują żywotność. Z dokonanych analiz wynika, że progi te rozpoczynają się od rozcieńczeń 1:15 do 1:20.

3. Wykazano też, że działanie unieczyniające w tej kąpeli wykazuje tylko sam Chromal. Pozostałe składniki tj. 3% chlorek sodowy i 0,5% mrówczan sodu, podobnie jak i cała kąpiel natłuszczająca pozostają obojętne w stosunku do wsiewanych bakterii.

4. Uzyskane wyniki pozwoliły na ustalenie, które kąpiele, i jakie ich składniki, wykazują właściwości unieczyniające w stosunku do wybranych bakterii ściekowych, mogące wpływać na aktywność osadu czynnego w ściekach garbarskich rzeczywistych.

M. Mendrycka, J. Mierzejewski, A. Lidacki, K. Śmiechowski

INFLUENCE OF TANNERY CHEMICAL COMPOUNDS ON THE SELECTED  
BACTERIA OF THE ACTIVATED SLUDGE

Summary

Influence of tannery chemical compounds on the selected bacteria of the activated sludge was investigated. The chromium compounds must be diluted to 1:15–1:20 to lose its activity on the bacteria. Other compounds like: natrium chloratum, natrium formate and greased oils have any influence on the growth of the selected bacteria.

PIŚMIENNICTWO

1. Campos J., Martinez-Pacheco M., Cevantes C.: Hexavalent – Chromium Reduction by a Chromate Resistant *Bacillus sp.* strain. *Antonine van Leeuwenhoek* 1995, 68, 203–208.
2. Cieślak-Golonka M.: Związki chromu w układach o znaczeniu biologicznym. *Wiadomości Chemiczne* 1994, 48, 59–69.
3. Kotelko K., Sedlaczek L., Lachowicz T.M.: *Biologia bakterii*. PWN, Warszawa 1977.
4. Madoni P., Dawoli D., Gorbi G., Vescovi L.: Toxic Effect of Heavy Metals on the Activated Sludge Protozoan Community. *Wat. Res.* 1996, 30, 135–141.
5. Polska Norma. Woda i ścieki. Badania specjalne osadów. Hodowla standardowego osadu czynnego w warunkach laboratoryjnych. PN-87 C-04616/10.
6. Substancje chorobotwórcze w środowisku pracy. (praca zbiorowa) Tom III. Chrom i niektóre związki chromu. IMP Łódź 1987.

Otrzymano: 1999.12.13