ZESZYTY NAUKOWE POLITECHNIKI ŚLĄSKIEJ

Nr 20 Inżynieria Sanitarna z. 1 1960

M. ZDYBIEWSKA

BADANIA NAD MIKROFLORĄ WYSTĘPUJĄCĄ W ŚCIEKACH PIWOWARSKICH*)

Wstęp

Ścieki piwowarskie należą do ścieków przemysłowych mało dotąd poznanych. Badania nad ich składem utrudnia zmienność ich składu chemicznego i mikrobiologicznego, uzależniona od jakości użytkowanej wody, sposobów produkcji, surowców itp. Ścieki te mogą mieć różny skład chemiczny nie tylko w poszczególnych zakładach produkcyjnych, ale i w różnych porach dnia w tym samym zakładzie.

Dla uzyskania próbek wykazujących przeciętny skład ścieków piwowarskich, należałoby pobierać średnie próby dobowe. Wpływa to ujemnie na świeżość pobranych prób i komplikuje badania mikrobiologiczne.

Ilość ścieków wytwarzanych przez browary jest znaczna (Sierp, 1953, Kucharski i Koziorowski, 1954) i wynosi od 20 do 30 razy więcej od ilości produkowanego piwa. Część z nich stanowi woda względnie czysta, użyta do chłodzenia brzeczki lub piwa. Natomiast wody silnie zanieczyszczone zawierają wody myjni i ze słodowni, resztki brzeczki i piwa, wody z przemywania drożdży i drożdże odpadkowe (Wittmann, 1952), a ponadto ścieki bytowo-gospodarcze.

Ścieki piwowarskie zawierają przeważnie zanieczyszczenia typu organicznego. Wśród nich jest wiele substancji węglowodanowych łatwo ulegających fermentacji. Odczyn tych ścieków ma tendencję do obniżania się z pH około 6,5 do pH około 4,8, a następnie do powolnego podwyższania się przez odkwaszanie ścieków pod wpływem innych populacji bakteryjnych. Zakwaszone ścieki wywierają niekorzystny wpływ na naturalny odbiornik, gdyż bezpośrednie ich wpuszczenie w stanie nieoczyszczonym, może zachwiać w nim ustaloną równowagę biochemiczną. Również wpuszcze-

*) Skrót pracy kandydackiej

nie ich do kanalizacji miejskiej wymaga mieszania ze ściekami miejskimi w określonym stosunku (Sierp, loc. cit.), gdyż mogą one zakłócać procesy biologiczne zachodzące w oczyszczalni i powodować korozję przewodów kanalizacyjnych.

Celem niniejszej pracy było zbadanie mikroflory występującej w ściekach piwowarskich świeżych i w czasie ich samoczynnego zakwaszania i odkwaszania się. Próbowano również badać zależność zespołu mikroflory od składu chemicznego ścieków, w szczególności od ich wartości pH, kwasowości i zawartości w nich tlenu.

Część doświadczalna

Badania nad mikroflorą ścieków piwowarskich przeprowadzano w latach 1953-1956. Próbki ścieków w Tyskich Zakładach Piwowarsko-Słodowniczych - Zakład Nr 2 - pobierano ze ścieków zbiorczych browaru oraz ze ścieków słodowni. Różniły się one składem chemicznym, mikrobiologicznym i szybkością procesów zakwaszania i odkwaszania.

Próbki pobierano z kanalizacyjnych studzienek kontrolnych, a mianowicie:

1) z kolektora zbiorczego odprowadzającego mieszaninę ścieków z produkcji, z mycia aparatury, pomieszczeń i ze słodowni oraz ścieków bytowo-gospodarczych. Z tego punktu pobrano do badań ogółem dziewięć próbek.

2) z kolektora odprowadzającego ścieki słodowni. Próbki tych ścieków pobrano dwukrotnie.

Do analizy chemicznej pobierano około 10 litrów ścieków oraz osobne próbki odpowiednio zabezpieczone dla oznaczenia zawartości w nich tlenu, siarkowodoru i azotanów. Próbki przeznaczone do analizy mikrobiologicznej pobierano przy pomocy batymetru (po dwie próbki) do wyjałowionych szklanych naczyń z doszlifowanym korkiem, o pojemności 50 ml.

Ścieki przed pobraniem próbek przepuszczano przez studzienkę szybszym strumieniem przez 15 minut, odpowiednio regulując zasuwę.

Ze względu na istniejący układ kolektorów, nie dało się oddzielić ścieków bytowo-gospodarczych i trzeba je było badać łącznie ze ściekami produkcyjnymi.

Badania mikrobiologiczne, a także fizyko-chemiczne ścieków wykonywano po upływie 3-4 godzin. Po wysianiu próbek na pożywki, część pobranych ścieków przechowywano w temperaturze około 18°, we flaszkach zatkanych watą dla stwierdzenia samorzutnego zakwaszania i odkwaszania się ścieków.

W przechowywanych próbach oznaczano co drugi dzień pH i kwasowość dla stwierdzenia zachodzącego w nich zakwaszenia i odkwaszenia. Ponadto dla trzech prób ścieków przeprowadzono skrócone analizy fizyko-chemiczne według Struszyńskiego (1950) i "Standart Methods for Examination of Water and Sewage" (1946). Wyniki tych oznaczeń zestawiono w tabeli 1.

W badaniach mikrobiologicznych oznaczano liczebność drobnoustrojów w 1 ml ścieków. W tym celu rozcieńczano badane próbki w granicach 10^{-1} do 10^{-6}, przy użyciu fizjologicznego roztworu soli i wysiewano je w dwóch powtórzeniach na następujące pożywki:

1. bulion mięsno-peptonowy z żelatyną (Przesmycki, 1953)
2. bulion mięsno-peptonowy z agarem (Przesmycki, 1953)
3. agar bulionowo-brzeczkowy (Smyk, 1954)
4. agar brzeczkowy (brzeczka 9° Ball, sporządzona wg Bułhakowa 1952)
5. bulion płynny - po 10 ml w probówkach (jako pożywka kontrolna, Przesmycki, 1953).

Agar mięsno-peptonowy stosowano tylko w początkowym okresie badań, ponieważ ścieki piwowarskie są podłożem węglowodanowo-białkowym, gdyż może do nich przejść około 9-10% brzeczki browaru (Wojcieszak, 1952). Później używano agaru bulionowo-brzeczkowego, jako podłoża bardziej zbliżonego swym składem do ścieków.

Posiewy na agarze bulionowo-brzeczkowym i na bulionie płynnym inkubowano przez 24 godziny w temperaturze 37° (± 1°), a posiewy na agarze brzeczkowym i żelatynie z bulionem przez 48 godzin w temperaturze 20° (± 1°). Wyniki badań ilościowych zebrano w tabeli 2.

Przeprowadzono również oznaczenie niektórych cech bakterii wyodrębnionych ze ścieków. W szczególności opisywano wygląd, wielkość i kształt kolonii po 48 godzinach wzrostu. Wpływ temperatury oznaczano, prowadząc hodowle równolegle w temperaturach 20° i 37° (± 1°) przez 48 godzin. Kultury wykazujące słaby wzrost przy 37° próbowano hodować w temperaturze 55° (Morrison i Tanner, 1924, wg Miszustina).

Tabela 1

Niektóre cechy fizyko-chemiczne ścieków piwowarskich
Zakładu Nr 2 w Tychach

Lp.	Oznaczenie i jednostki / Rodzaj próby			Ścieki ogólne browaru bez słodowni	Ścieki słodowni	Ścieki słodowni
1	pH			7,4	6,6	6,7
2	Kwasowość w ml		1 N NaOH/l	0,54	0,86	0,43
3	Siarczki	mg/l	H_2S	brak	brak	brak
4	Chlorki	mg/l	Cl'	ślady	12,91	7,10
5	Azot amoniakalny	mg/l	N_{NH_3}	ślady	brak	ślady
6	Azot azotynowy	mg/l	N_{NO_2}	brak	brak	ślady
7	Azot azotanowy	mg/l	N_{NO_3}	ślady	ok.0,3	ok.0,3
8	Azot ogólny	mg/l	N_2	8,1	4,1	3,4
9	Tlen	mg/l	O_2	4,67	4,74	7,41
10	Utlenialność	mg/l	O_2	71,2	71,0	14,4
11	BZT_5	mg/l	O_2	441,0	480,0	132,0
12	Sucha pozostałość	mg/l		401,2	294,0	186,6
13	Pozostałość po prażeniu	mg/l		204,2	189,0	124,4
14	Zagniwalność	(dni)		brak w ciągu 10 dni	od 8-13 dni	brak w ciągu 16 dni

Tabela 2

Ilość oraz grupy drobnoustrojów w ściekach Zakładów Piwowarsko-Słodowniczych w Tychach

Lp.	Data pobrania próbki	Rodzaj próbki	Liczba drobnoustrojów w 1 ml ścieków				Ilość wyodrębnionych różnych szczepów		
			Agar bulionowo-brzeczkowy 24 godz. t=37°	Żelatyna bulionowa 48 godz. t=20°	Agar brzeczkowy 48 godz. t=20°	Agar bulionowo-brzeczkowy (beztlenowce) 24 godz. t=37°	bakterie	drożdżaki	pleśniaki
1	18.V. 1953 r.	Ścieki ogólne browaru	261.000	3.800.000	271.000	-	10	1	5
2	2.VII. 1953 r.	Ścieki ogólne browaru	1.600.000	-	1.300.000	-	6	3	3
3	20.VIII 1953 r.	Ścieki ogólne browaru	2.700.000	-	1.200.000	-	7	4	2
4	21.IX 1953 r.	Ścieki ogólne browaru	280.000	-	67.000	-	7	3	3
5	18.XI 1953 r.	Ścieki ogólne browaru	140.000	13.300.000	640.000	-	nie identyfikowano		
6	18.I 1954 r.	Ścieki ogolne browaru	28.000	52.000	526.000	-	5	4	2
7	17.II 1954 r.	Ścieki ogólne - bez ścieków słodowni	440.000	85.000	83.000	-	12	3	2
8	30.III 1954 r.	Ścieki ogólne - z przewagą ścieków słodowni	43.000	176.000	178.000	6.000	20	3	2
9	18.VIII 1954 r.	Ścieki ogólne browaru	32.000	440.000	178.000	49.000	14	3	1
10	8.X. 1954 r.	Ścieki słodowni	57.000	91.000	19.000	42.000	22	0	0
11	25.II 1955 r.	Ścieki słodowni	12.000	13.000	800	2.400	21	0	2

W badaniach mikroskopowych określano kształty, wymiary i ruchliwość komórek w kropli wiszącej oraz barwienie wg Grama. Zdolność wytwarzania przetrwalników badano w 7-dniowych hodowlach na skośnym agarze Gorodkowej (Jörgensen, 1948), barwiąc preparaty metodą Moellera lub zielenią malachitową i fuksyną.

Spośród cech fizjologicznych i biochemicznych wyodrębnionych bakterii, badano następujące: sposób wzrostu na bulionie (zmętnienie, zawiesina drobna lub kłaczkowata, kożuszek, jego wygląd itp.), zdolność peptonizacji i kwaszenia mleka z lakmusem, intensywność wzrostu i wygląd kolonii na ziemniaku oraz zdolność do wzrostu na podłożu mineralnym (agar Czapeka).

Właściwości proteolityczne oznaczano na żelatynie kłutej, obserwując stopień jej rozpuszczenia i typ wzrostu.

Zdolność do hydrolizowania skrobi badano na pożywce: skrobia rozpuszczalna 10,0 g; $NaNO_3$ - 2,0 g; K_2HPO_4 - 1,0 g; KCl - 0,5 g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ - 0,5 g; $FeSO \cdot 7H_2O$ - 0,01 g; woda destylowana - 1000 ml.

Zdolność do fermentowania glukozy, fruktozy, maltozy, laktozy i sacharozy określano w 1% roztworach cukrów w wodzie peptonowej, z dodatkiem błękitu bromotymolowego jako wskaźnika.

Uzdolnienia bakterii do redukowania azotanów określano na pożywce płynnej z modyfikacji Beijerincka, tj. z 2% dodatkiem mannitu zamiast soli kwasów organicznych (Omeljański, 1940); po 48 godzinnej hodowli dodawano odczynnik jodowo-cynkowo-skrobiowy.

Procesy gnilne określano przez oznaczanie indolu w 48 godzinnej hodowli na bulionie ("Manual of Methods for pure culture study of Bacteria") i siarkowodoru (reakcja z octanem ołowiu).

Zakwaszanie lub alkalizowanie podłoża przez badane bakterie określano na pożywce z błękitem bromotymolowym (Olšanský, 1954).

Ścieki piwowarskie wykazywały niewielką zawartość, lub zupełny brak tlenu (z wyjątkiem ścieków słodowni), i dlatego przeprowadzano również badania nad obecnością bakterii beztlenowych. Do oznaczania w ściekach ilości bakterii beztlenowych, najbardziej przydatny okazał się anaerostat (Meisel, 1951). Uzyskana w nim próżnia była rzędu 20 mm Hg. Zastosowano tu pożywki i warunki hodowli analogicznie jak przy oznaczaniu bakterii tlenowych, jednak przy użyciu anaerostatu. Wyniki hodowli na agarze bulionowo-brzeczkowym przedstawia tabela 2.

Na podstawie oznaczonych cech morfologicznych, fizjologicznych i biochemicznych, wyodrębnionych ze ścieków, przeprowadzono identyfikację części wyodrębnionych szczepów bakterii, posługując się kluczem Krasilnikowa, a częściowo również i Bergey'a (1948). Tabela 3 przedstawia wykaz oznaczonych gatunków bakterii.

Obecność bakterii z grupy pałeczki okrężnicy, ma w browarze znaczenie nie tylko sanitarne (Hompesch, 1947), ale i technologiczne, gdyż bakterie te wywołują kwaśną fermentację brzeczki.

Miano coli w ściekach oznaczono wg Przesmyckiego (1953). Wynosiło ono dla ścieków słodowni 10^{-1} a dla ścieków zbiorczych browaru 10^{-4} do 10^{-5}. Dokładne badania wykazały obecność w ściekach słodowni bakterii z grupy Coli typu jelitowego, a w ściekach ogólnych - typu jelitowego, pośredniego i ziemnego.

Dla oznaczenia rodzajów lub gatunków drożdży występujących w ściekach hodowano ich makro-kolonie oraz badano zdolności proteolityczne na brzeczce z żelatyną. W preparatach mikroskopowych oznaczano wielkość i kształt komórek oraz sposób pączkowania.

Zarodnikowanie drożdży badano w hodowlach na agarze Gorodkowej, jako na podłożu głodowym. Preparaty barwiono metodą Moellera.

Zdolność fermentacyjną drożdży badano na 1% roztworach glukozy, fruktozy, maltozy, laktozy, sacharozy, rafinozy i galaktozy na wodzie drożdżowej, z dodatkiem czerwieni obojętnej jako wskaźnika.

Wykorzystanie przez drożdże etanolu jako jedynego źródła węgla badano na płynnej pożywce wg Smitha (1942). Wynik uważano za pozytywny, jeśli przyrost wynosił po 48 godzinach 100% lub więcej komórek (liczenie w komorze Thoma) przy hodowli w 25°.

Przyswajanie przez drożdże węglowodanów i związków azotowych badano metodą auksanograficzną Beijerincka (Smith, 1942), stosując glukozę, maltozę, sacharozę, laktozę, galaktozę, rafinozę i skrobię rozpuszczalną oraz siarczan amonowy, azotan potasowy, pepton, mocznik asparaginę i tryptofan.

W analogiczny sposób badano drożdże produkcyjne Zakładów (oznaczone symbolami A_{1X}, P_V, VB_1) aby porównać, które z drożdży wyodrębnionych ze ścieków pochodzą z produkcji.

Na podstawie oznaczonych cech morfologicznych, fizjologicznych i biochemicznych wyodrębnionych ze ścieków drożdży, przeprowadzono ich identyfikację według Loddera i Van Rija (1952), Jörgensena (1948) i Niethammer (1947).

Badano również pleśniaki wyrosłe na agarze brzeczkowym. Cechy morfologiczne określano w preparatach mikroskopowych, biorąc pod uwagę przede wszystkim wygląd, budowę i wielkość makrokolonii, strzępków grzybni, konidii, sterigm itp. Dla określenia cech fizjologicznych i biochemicznych badano zachowanie się wyodrębnionych pleśni na brzeczce płynnej (zmętnienie, kożuch itp.), na brzeczce z agarem, na mleku z lakmusem (szczególnie ze względu na rodzaj Oospora) oraz na żelatynie brzeczkowej (ew. zdolności proteolityczne). Hodowle prowadzono w temperaturze 25° przez 4-7 dni. Ponadto rodzaje Penicillium i Aspergillus hodowano również na agarze Czapeka.

Na podstawie zebranych cech, przeprowadzono przybliżone oznaczenie gatunków według Niethammer (1947), Delitsch-Lempke (1943), Glaubitza (1932), Smitha (1942). Rapera i Thoma (1949), Thoma i Rapera (1945) i Raiłło (1950).

W wyniku przeprowadzonych badań wyodrębniono ze ścieków 87 szczepów bakterii, 9 szczepów drożdży i 15 szczepów pleśni. Wśród nich określono systematyczną przynależność 48 gatunków bakterii, 9 gatunków drożdży i 15 gatunków pleśni (tab.3).

Ponieważ wyodrębnione bakterie (tabela 3) są na ogół pospolite w przyrodzie, dla stwierdzenia czy ścieki są dla nich odpowiednim środowiskiem, przeprowadzono specjalne próby hodowlane z zespołem bakterii wyodrębnionych ze świeżych ścieków słodowni oraz z zespołem bakterii wyodrębnionych z tych ścieków, ale przechowywanych przez 14 dni w laboratorium.

Ścieki mające służyć jako pożywka, przesączano i wyjaławiano przez tyndalizację. Tak przygotowane płynne podłoże, zaszczepiano wyodrębnionymi ze ścieków szczepami i hodowano w temperaturze 37° (± 1°) przez 24 godziny, ze względu na domieszkę ścieków sanitarnych. W tych samych warunkach przechowywano jałowe próby kontrolne. Już po 24 godzinach hodowli na płynnych podłożach występowało zmętnienie wywołane rozwojem bakterii. Wielkość tego zmętnienia mierzono nefelometrycznie fotometrem Pulfricha. Zmętnienie względne określano w stosunku do wody destylowanej oraz przeliczano w stosunku do ścieków jałowych. Ponadto obliczano zmętnienie bezwzględne

w porównaniu z wzorcem aparatu. Dodatkowo mierzono potencjometrycznie pH w poszczególnych hodowlach przy zastosowaniu elektrod: kalomelowej i chindydronowej, z dokładnością do 0,1 pH.

Wzrost drobnoustrojów na ściekach zestalonych przez dodatek 2% agaru sprawdzano po 48 godzinach hodowli w temperaturze 37° dla uzyskania wyraźniejszych różnic wzrostu. Wyniki tych doświadczeń zestawiono w tabeli 4.

W celu stwierdzenia wpływu wody produkcyjnej na mikroflorę ścieków, wykonano jednorazowo skróconą analizę chemiczną i mikrobiologiczną tej wody. W wyniku tej analizy stwierdzono: na agarze bulionowo-brzeczkowym wyrosło 80 kolonii z 1 ml wody; na żelatynie 280 kolonii w 1 ml wody; na podłożu z błękitem bromo-tymolowym wyrosło 50 kolonii z których 40 wykazywało słabe zdolności ukwaszające (hodowla 72 godzinna); występowania beztlenowców nie stwierdzono; na agarze brzeczkowym było 10 kolonii w 1 ml; miano coli wynosiło powyżej 50.

Jak widać z uzyskanych wyników, woda ta posiadała podwyższoną w stosunku do wymagań stawianych wodzie dla browarnictwa, ilość bakterii szczególnie rosnących na pożywce z żelatyną. Jednak miano coli powyżej 50 oraz niska utlenialność nie dyskwalifikowały jej pod względem sanitarnym.

Z badanej wody wyodrębniono (z agaru bulionowo-brzeczkowego) i zidentyfikowano 4 rodzaje bakterii, a mianowicie z rodzaju Bacillus 5 gatunków, z rodzaju Lactobacterium 1 gatunek, z rodzaju Micrococcus 3 gatunki i jeden z rodzaju Sarcina.

Omówienie wyników

Przedstawione badania wykazały, że ścieki piwowarskie w Browarze Nr 2 w Tychach są środowiskiem bogatym w drobnoustroje, zarówno pod względem ilościowym jak i jakościowym (tabela 2 i 3). Wpływa na to zarówno ich pochodzenie (typ produkcji i surowców), jak też i skład chemiczny (tabela 1), gdyż jak wiadomo w procesie produkcyjnym część przerabianych surowców przechodzi do ścieków.

Przeprowadzona mikrobiologiczna analiza jakościowa i ilościowa daje niepełną charakterystykę występujących drobnoustrojów, gdyż na zastosowanych podłożach wyhodowano tylko część drobnoustrojów znajdujących się w bada-

Tabela 3

Wykaz wyodrębnionych drobnoustrojów
(oznaczonych w przybliżeniu)

Lp.	a) Bakterie
1.	Bacillus adhaerens
2.	Bacillus agglomeratus
3.	Bacillus amarus
4.	Bacillus centrosporus
5.	Bacillus circulans
6,	Bacillus coprogenes
7.	Bacillus danicus
8.	Bacillus disciformis
9.	Bacillus filaris
10.	Bacillus limbatus
11.	Bacillus mediosporus (?)
12.	Bacillus mesentericus
13.	Bacillus mucosus
14.	Bacillus mycoides
15.	Bacillus morulans (?)
16.	Bacillus natans
17.	Bacillus nitroxus
18.	Bacillus palustris
19.	Bacillus rusticus
20.	Bacillus solidus
21.	Bacillus subcuticularis (?)
22.	Bacillus subtilis
23.	Bacterium agile
24.	Bacterium album
25.	Bacterium candicans
26.	Bacterium nitrificans
27.	Bacterium liquefaciens
28.	Bacterium zopfii
29.	Chromobacterium aurantiacum
30.	Pseudobacterium cocciformis
31.	Pseudobacterium furcosum (?)
32.	Pseudobacterium intestinalis
33.	Pseudobacterium niosii (?)
34.	Pseudomonas aurantiaca
35.	Pseudomonas gracilis
36,	Pseudomonas liquida
37.	Pseudomonas sinuosa
38.	Mycobacterium globiforme (?)
39.	Lactobacterium breve
40.	Lactobacterium pastorianum
41.	Lactobacterium plantarum
42.	Micrococcus anaerobius
43.	Micrococcus aquatilis
44.	Micrococcus candidus
45.	Micrococcus roseus
46.	Micrococcus viticulosus
47.	Sarcina lutea
48.	Sarcina nivea
	b) Drożdżaki
1.	Candida mycoderma
2.	Hansenula anomala
3.	Pichia membranaefaciens
4.	Saccharomyces carlsbergensis
5.	Saccharomyces cerevisiae
6.	Saccharomyces cerevisiae var,ellipseideus
7.	Saccharomyces steinerii
8.	Rhodotorula mucilaginosa
9.	Rhodotorula rubra
	c) Pleśnie
1.	Alternaria nucis
2.	Aspergillus flavus
3.	Aspergillus glaucus
4.	Aspergillus niger
5.	Cladosporium suaveolens
6.	Fusarium aquaeductum
7.	Mucor globosus
8.	Mucor plumbeus
9.	Mucor stolonifer
10.	Oospora amycelica
11.	Oospora lactis
12.	Oospora minor
13.	Penicillium casei
14.	Penicillium glauco-griseum
15.	Penicillium spinulosum

Tabela 4

Rozwój niektórych bakterii na podłożu składającym się z badanych ścieków oznaczony na podstawie zmętnienia podłoża

Lp.	Gatunek (w przybliżeniu)	pH	Wzrost na ściekach z agarem	Zmętnienie hodowli drobnoustrojów po 24 godzinach		
				Względne (w porównaniu z H_2O destyl.)	Wielokrotność zmętnienia względem ścieków jałowych	Bezwzględne (w porównaniu z wzorcem)
	A) Drobnoustroje wyodrębnione ze świeżych ścieków słodowni					
	Podłoże kontrolne	7,4	-	11,2	1,00	0,0013
1.	Bacillus agglomeratus	7,4	+	20,0	1,79	0,0023
2.	Bacillus centrosporus	7,2	++	259,0	23,1o	0,0296
3.	Bacillus circulans	7,4	+	70,0	6,25	0,0080
4.	Bacillus disciformis	7,1	+++	2.440,0	218,00	0,2784
5.	Bacillus filaris	7,5	++	606,0	54,10	0,0754
6.	Bacillus limbatus	7,3	+	74,7	6,67	0,0085
7.	Bacillus mesentericus	7,2	++	219,8	19,62	0,0251
8.	Bacillus mycoides	7,5	+	119,0	10,62	0,0136
9.	Bacillus natans	7,4	+	87,3	6,90	0,0100
10.	Bacillus nitroxus	7,2	+++	591,0	52,70	0,0675
11.	Bacillus rusticus	7,6	+	21,5	1,92	0,0025
12.	Bacillus subcuticularis	7,8	+++	488,0	43,70	0,0558
13.	Bacterium album	7,7	++	34,5	3,08	0,0039
14.	Bacterium nitrificans	7,3	++	417,0	37,20	0,0476
15.	Chromobacterium aurantiacum	7,4	++	81,3	7,25	0,0093
16.	Pseudobacterium furcosum	7,6	++	27,0	2,41	0,0031
17.	Pseudomonas gracilis	7,5	+++	700,0	62,50	0,0800
18.	Sarcina lutea	7,5	++	800,0	71,40	0,0914
19.	Sarcina nivea	7,1	++	26,3	2,35	0,0030
20.	Kultura Nr 67	7,3	++	56,2	5,02	0,0064
21.	Kultura Nr 69	7,3	++	132,4	11,81	0,0151
	B) Drobnoustroje wyodrębnione ze ścieków słodowni przechowywanych przez 14 dni w laboratorium					
	Podłoże kontrolne	7,2	-	31,0	1,00	0,0035
1.	Bacillus adhaerens	7,4	++	71,5	2,30	0,0082
2.	Bacillus filaris	7,5	++	74,0	2,39	0,0085
3.	Bacillus mesentericus	7,4	+	65,0	2,10	0,0074
4.	Bacillus nitroxus	7,4	+++	73,5	2,37	0,0084
5.	Bacillus rusticus	7,4	++	54,5	1,76	0,0063
6.	Bacterium album	7,5	+++	68,0	2,19	0,0078
7.	Bacterium coli	7,7	+++	125,8	4,05	0,0144
8.	Bacterium liquefaciens	7,7	+++	125,0	4,03	0,0143
9.	Bacterium nitrificans	7,7	+++	174,0	5,62	0,0199
10.	Bacterium zopfii	7,6	+	32,0	1,03	0,0037
11.	Chromobacterium aurantiacum	7,6	++	149,0	4,80	0,0171
12.	Lactobacterium pastorianum	7,5	++	35,5	1,14	0,0041
13.	Micrococcus aquatilis	7,2	++	178,6	5,75	0,0204
14.	Pseudobacterium furcosum	7,4	++	88,0	2,84	0,0078
15.	Pseudomonas liquida	7,3	+++	123,0	3,97	0,0141
16.	Kultura Nr 3	7,7	+++	125,8	4,05	0,0144
17.	Kultura Nr 77	7,5	+++	98,0	3,15	0,0112

U w a g a: Do badań nefelometrycznych używano światła zielonego o długości fali 5.300 Å, w temperaturze 20°

+++ - wzrost bujny
++ - wzrost dobry
+ - wzrost umiarkowany
- - brak wzrostu

nych ściekach. Wyodrębnianie jednak z każdej próbki od 11 do 25 charakterystycznych kultur, dawało duże prawdopodobieństwo wyodrębnienia większości wyhodowanych w tych warunkach gatunków drobnoustrojów, tymbardziej że wiele z nich powtarzało się w niektórych analizach kilkakrotnie.

Również zakres stosowanych przy badaniach ilościowych temperatur tj. 20° i 37° (w badaniach jakościowych również 25° i 55°) miał znaczny wpływ na jakość i ilość wyhodowanych kolonii, gdyż temperatury te nie stanowiły optimum dla poszczególnych drobnoustrojów. Jak wykazał Stoch (1936) na agarze bulionowym w temperaturze 37° wyrasta około dwa razy mniej kolonii niż na tej samej pożywce w temperaturze pokojowej, a 3,9 razy mniej niż na żelatynie. Jak więc z tego wynika, zestawione w tabeli 2 wyniki badań ilościowych należy traktować jako wyniki przybliżone.

W rezultacie ze świeżych i przechowywanych próbek ścieków wyodrębniono łącznie 111 gatunków drobnoustrojów, z których, posługując się opisanymi w części doświadczalnej metodami, zidentyfikowano 72 (tabela 3).

Różnorodność tej mikroflory spowodowana jest ogromną zmiennością badanego środowiska, gdyż próbki ścieków, mimo że pobierane w tych samych punktach, lecz w pewnych odstępach czasu, mogły dotyczyć różnych etapów produkcji.

Wyodrębnione szczepy bakterii występowały w badanych ściekach w trzech formach: jako laseczki albo pałeczki lub ziarniaki. Wśród nich stwierdzono znaczną ilość, bo 40 gatunków laseczek przetrwalnikujących. Taki układ form bakteryjnych był prawdopodobnie spowodowany między innymi zmiennymi warunkami bytowania w ściekach np. zmianą stężenia składników odżywczych, zmianą zawartości tlenu, kwasowości, wystąpieniem substancji trujących jak H_2S itp. (tabela 1). Stąd prawdopodobnym wydaje się występowanie bakterii przetrwalnikujących, które mogą przetrwać niekorzystne warunki (np. wysoką temperaturę warzelni). Również wśród pałeczek istnieje pewna różnorodność, gdyż stwierdzono obecność 6 rodzajów, a mianowicie: Bacterium, Chromobacterium, Pseudobacterium, Pseudomonas, Lactobacterium, Mycobacterium. Natomiast ziarniaki wystąpiły w 2 rodzajach: Micrococcus i Sarcina.

Wyodrębnione bakterie mogą pochodzić z gleby, wody, powietrza, z surowców roślinnych, skąd właśnie mogą dostawać się do browaru, a następnie do ścieków. Ważną rolę w układzie mikroflory ścieków piwowarskich odgrywa

jęczmień jako surowiec i słód jako półprodukt. Wskazuje na to także Smyk (1954) na podstawie badań mikroflory słodu, wody i powietrza. Prócz tego część bakterii znalezionych w ściekach pochodziło ze ścieków bytowo-gospodarczych.

Druga pod względem ilości gatunków grupą drobnoustrojów wyodrębnionych z badanych ścieków, były pleśnie (tabela 3). Prawdopodobnie pochodziły one głównie z jęczmienia lub słodu, a także z powietrza i wody, skąd dostawały się do ścieków browaru. Stosunkowo małą ilość gatunków pleśni znaleziono w badanych próbkach. Być może, że przyczyną tego było dodawanie do wody moczącej CaO w ilości 40-50 g na hl wody moczącej i podczas mycia jęczmienia przed jego słodowaniem. Wg Windischa (Lindner 1950) takie stężenie powstałego ługu zabija zarodniki pleśni i przetrwalniki bakterii lub uniemożliwia ich rozwój. W omawianej pracy nie przebadano tego bliżej.

Pleśnie występujące w badanych ściekach były reprezentowane głównie przez następujące rodzaje: Oospora, Penicillium, Aspergillus, Mucor, sporadycznie przez Alternaria, Cladosporium i Fusarium.

Trzecią grupą wyodrębnionych drobnoustrojów były drożdże, których wyosobniono 9 gatunków. Drożdże te porównywano z wyhodowanymi czystymi kulturami drożdży używanych w produkcji. Stwierdzono, że wyodrębnione ze ścieków drożdże oznaczone jako Saccharomyces Carlsbergensis miały cechy bardzo zbliżone do drożdży produkcyjnych oznaczonych w Zakładzie jako A_{1X}. Drożdże Saccharomyces steinerii miały cechy zbliżone do drożdży produkcyjnych P_V. Wreszcie drożdże wyodrębnione ze ścieków i określone jako Saccharomyces cerevisiae miały cechy zbliżone do drożdży produkcyjnych VB_I. Różnice cech były tu niewielkie i na tej podstawie można sądzić, że wyodrębnione ze ścieków drożdże z rodzaju Saccharomyces pochodziły z produkcji. Inne wyodrębnione drożdże są rozpowszechnione w przyrodzie jak np. Rhodotorula, Pichia i Mycoderma, które znane są powszechnie jako szkodliwe w browarze drożdże kożuchujące (Lindner, 1930, Schnegg, 1922). Drożdże znajdowały się prawie wyłącznie w ściekach ogólnych browaru. W ściekach słodowni tylko jeden raz stwierdzono Candida mycoderma.

W występowaniu poszczególnych gatunków drobnoustrojów w badanych dwóch rodzajach ścieków można zauważyć też pewne różnice. Tak więc 56 gatunków drobnoustrojów wystę-

powało wyłącznie w ściekach ogólnych, 17 tylko w ściekach słodowni, zaś 38 gatunków - zarówno w ściekach ogólnych jak i w ściekach słodowni.

Grupa drobnoustrojów występująca tylko w ściekach ogólnych była stosunkowo duża. Różnorodność ta jest prawdopodobnie spowodowana tym, że ścieki ogólne są mieszaniną zużytych wód wszystkich działów browaru oraz ścieków bytowo-gospodarczych. Ilość gatunków występujących tylko w ściekach słodowni tj. 16 gatunków bakterii i 1 pleśń z rodzaju Penicillium jest stosunkowo mała.

Grupę pośrednią stanowią drobnoustroje występujące w obu rodzajach ścieków.

Osobną grupą bakterii są beztlenowce ew. względne tlenowce, których występowanie było prawdopodobne przy stosunkowo niewielkich ilościach tlenu w ściekach (tabela 1). Stwierdzono obecność tej grupy w ilości ok. 17% w stosunku do ogólnej ilości bakterii. Bakterie te - przeważnie względne tlenowce - występowały głównie (ok. 70%) w ściekach ogólnych browaru. Prawdopodobnie obecność ich może być związana z domieszką ścieków bytowo-gospodarczych, gdyż wiele z nich - jak podaje Krasilnikow - wyodrębniono po raz pierwszy z gnijących materiałów. Ścieki słodowni nie zawierały prawie wcale beztlenowców, zapewne wskutek większej zawartości tlenu. W grupie drobnoustrojów wspólnych dla obu rodzajów ścieków, beztlenowce stanowiły ok. 12%.

Spośród 10 wyodrębnionych z wody produkcyjnej gatunków bakterii, 9 gatunków znajdowało się również w ściekach. Można przypuszczać, że drobnoustroje występujące w wodzie jak i w ściekach pochodzą właśnie z wody produkcyjnej i wraz z nią dostają się do ścieków. Wykazują to w swoich badaniach Gainey (1947), oraz Prescott (1946), którzy stwierdzili, że wiele z wyodrębnionych tu rodzajów a nawet gatunków bakterii, stanowi stałą mikroflorę wody jak np. rodzaje Micrococcus i Sarcina.

Ścieki piwowarskie stanowią dobrą pożywkę dla drobnoustrojów, czego dowodzi duża ich różnorodność w tych ściekach. Dla stwierdzenia zdolności wykorzystywania substancji odżywczych ścieków przez drobnoustroje, przeprowadzono specjalne próby hodowlane, zakładając że uzyskane zmętnienie podłoża podczas hodowli było do pewnego stopnia wskaźnikiem zdolności ich rozwoju.

Jak wykazuje tab. 4 bakterie mają różną zdolność do rozwoju w badanych ściekach. W przeprowadzonych dwóch

seriach doświadczeń, przebadano w ten sposób 38 gatunków bakterii wyodrębnionych ze ścieków świeżych i przechowywanych (tab. 4A i B). Z liczby tej 13 gatunków bakterii występowało tylko w ściekach świeżych, 9 tylko w przechowywanych, a po 8 w obu rodzajach ścieków. Niektóre z gatunków bakterii np. Bacillus disciformis (tabela 4 poz.4) wywoływały bardzo silne, bo aż 218-krotne zwiększenie zmętnienia podłoża w porównaniu ze ściekami jałowymi. Inne kultury wykazywały słabszy rozwój, co świadczyłoby o mniejszej ich zdolności wykorzystania substancji odżywczych z tych ścieków. Ponadto kultury bakterii wyodrębnione i hodowane na ściekach przechowywanych przez 14 dni, nie wykazywały już tak bujnego wzrostu jak hodowane na ściekach świeżych, co łatwo zauważyć, porównując wyniki dla tych samych szczepów zebrane w tablicy 4A i B np. dla Bacillus filaris, Bacillus mesentericus, Bacillus nitrosus i innych. Z zestawionych liczb wynika, że rozwój bakterii w ściekach przechowywanych jest znacznie słabszy niż rozwój tych samych bakterii w ściekach świeżych, co niewątpliwie spowodowane jest częściowym wyczerpaniem się substancji odżywczych, tlenu i ew. mineralizacją ścieków zachodzącą przy ich przechowywaniu.

Bakterie hodowane na podłożu ze ścieków słodowni, a a wyizolowane z tychże ścieków występowały (z małymi wyjątkami) w obu rodzajach ścieków piwowarskich. Możnaby więc na tej podstawie twierdzić, że w ściekach tych stanowią one mikroflorę nieprzypadkową, a swoistą.

Przedstawione badania dotyczą składu mikroflory wyodrębnionej ze świeżych ścieków piwowarskich, jak i mikroflory występującej w czasie ich samoczynnego zakwaszania i odkwaszania się. Wydaje się celowe, by w dalszych pracach przebadać możliwość zastosowania wyodrębnionych kultur do biologicznego oczyszczania takich ścieków.

Wnioski

1. W skład mikroflory wyodrębnionej z badanych ścieków piwowarskich wchodzą głównie bakterie, niewielką ilość pleśni i drożdże występujące prawie wyłącznie w ściekach ogólnych browaru.

2. Spośród 111 gatunków drognoustrojów wyodrębnionych z badanych ścieków, 38 występowało zarówno w ściekach ogólnych browaru, jak i w ściekach słodowni, 56 tylko

w ściekach ogólnych browaru, a 17 tylko w ściekach słodowni.

3. Wśród wyodrębnionych i zbadanych szczepów bakterii stwierdzono 40 gatunków laseczek, 35 gatunków pałeczek i 12 gatunków ziarniaków.

4. Beztlenowce lub względne tlenowce stanowiły ok. 17% wszystkich wyodrębnionych bakterii. Z tego 70% przypadało na ścieki ogólne browaru. W ściekach słodowni występowanie beztlenowców było o wiele rzadsze.

5. Badane ścieki słodowni stanowiły dobrą pożywkę dla większości wyodrębnionych z nich kultur bakterii.

Literatura

1. BERGEY'S Manual of Determinative Bacteriology, 1948, Baltimore.
2. BUŁHAKOW N., 1952: Techno-chimiczeskij kontrol i uczet piwowarennowo proizwodstwa. Moskva.
3. GAINEY P.L., 1947: An introduction to the Microbiology of Water and Sewage, Minneapolis.
4. GLAUBITZ M., 1932: Atlas der Gärungsorganismen. Berlin.
5. HOMPESCH H., 1947: Zur Hygiene der Herstellung von Bier und Bierersatzgetränken. Zeitschrift für Hygiene. S.635-646.
6. JÖRGENSEN A., 1948.: Microorganisms and Fermentation. London.
7. KRASILNIKOW N.A., 1948: Opredielitiel bakterij i aktinomycetow. Moskwa - Leningrad.
8. KUCHARSKI J. I KOZIOROWSKI B., 1954: Oczyszczanie ścieków przemysłowych. Warszawa, str.255.
9. DELITSCH H., 1943: Systematik der Schimmelpilze. Kiel. Ergebnisse der theoretischen u.angewandten Mikrobiologie. Bd.I.
10. LINDNER P., 1930: Mikroskopische und biologische Betriebskontrolle in den Gärungsgewerben. Berlin.

11. LINDNER C.J., 1950: Technologia browarnictwa. Warszawa

12. LODDER J. and N.J.W.KREGER VAN RIJ, 1952: The yeasts a taxonomic study. Amsterdam.

13. MANUAL of Methods for pure culture study of Bacteria, 1951. Genewa

14. MEISEL H., 1951: Mikrobiologia lekarska. Zeszyt VII. Warszawa

15. MORRISON L.E. and TANNER F.W., 1922: Studies on thermophilic bacteria, 1. Aerobic thermophilic bacteria from water.
Jour.of Bact.7, 343 (ref.Miszustin A. 1954: Drobnoustroje termofilne w przyrodzie i praktyce. Warszawa.)

16. NIETHAMMER A., 1947: Technische Mycologie-Hefen und Schimmelpilze. Stuttgart.

17. OLŠANSKÝ C., 1954: Kazein - II cast mikrobiologicka. Průmysl potravin. str.401.

18. OMELJANSKIJ W.L., 1940: Prakticzeskoje rukowodstwo po mikrobiołogii. Moskwa - Leningrad.

19. PRESCOTT S.C., WINSLOW CH.E.A., MC CRADY, 1946: Water Bacteriology. New York.

20. PRZESMYCKI F., 1953: Zarys bakteriologii praktycznej.

21. RAIŁŁO A.I., 1950: Griby roda Fusarium. Moskwa.

22. RAPER K.B. and CH.THOM., 1949: A manual of the Penicillia. Baltimore.

23. SCHNEGG H., 1922: Das mikroskopische Praktikum des Brauers. II Teil. Stuttgart.

24. SIERP F., 1953: Die gewerblichen und industriellen Abwässer. Berlin (Göttingen), Heidelberg S.128.

25. SMITH G. and H.RAISTRICK, 1942: An Introduction to Industrial-Mycology. London.

26. SMYK B., 1954: Studia nad mikroflorą słodów. Roczniki Nauk Rolniczych. Tom 69-A-3, str.409.

27. STANDARD Methods for the Examination of Water and Sewage. New York 1946.

28. STOCH W., 1936: O zależności wyników badania bakteriologicznego ilościowego wody od rodzaju użytych do posiewu pożywek i ciepłoty hodowania. Kraków.

29. STRUSZYŃSKI M., 1950: Analiza ilościowa i techniczna. Tom III. Warszawa.

30. THOM CH. and K.B.RAPER, 1945: A manual of the Aspergilli. Baltimore.

31. WITTMAN J., 1952: Abwasserbeseitigung in einer modernen Brauerei. Brauwelt, Heft 9, S.188.

32. WOJCIESZAK P., 1952: Wody ściekowe w przemyśle fermentacyjnym i owocowo-warzywnym. Przemysł Rolny i Spożywczy 6, 471.

Streszczenie

Praca miała na celu wyodrębnienie i zbadanie mikroflory występującej w ściekach piwowarskich świeżych, a także w poszczególnych stadiach zakwaszania i odkwaszania tych ścieków.

Badania nad mikroflorą ścieków piwowarskich wykazały, że jest ona obfita i bardzo różnorodna.

Spośród 111 gatunków drobnoustrojów wyodrębnionych w sumie z badanych ścieków, 38 występowało w ściekach ogólnych browaru, jak i w ściekach słodowni, 56 tylko w ściekach ogólnych browaru i 18 tylko w ściekach słodowni.

Stwierdzono przy tym, że w skład mikroflory wyodrębnionej z badanych ścieków wchodzą głównie bakterie (wyizolowano 87 gatunków), w znacznie mniejszej ilości pleśnie (15 gatunków) i drożdże (9 gatunków). 40 szczepów wyizolowanych bakterii stanowiły laseczki, 35 szczepów różnego rodzaju pałeczki i 12 ziarniaki w różnych zgrupowaniach.

Bakterie beztlenowce lub względne tlenowce stanowiły około 17% ogólnej ilości wyodrębnionych bakterii. Z tego 70% przypadało na ścieki ogólne browaru.

Przy hodowli kultur bakteryjnych na podłożu z badanych ścieków, uzyskano różny stopień rozwoju.