ZESZYTY NAUKOWE POLITECHNIKI ŚLĄSKIEJ 1966
Seria: INŻYNIERIA SANITARNA z. 9 Nr kol. 159

HELENA PETRYCKA

ROZKŁAD NIEKTÓRYCH AMINOKWASÓW WYSTĘPUJĄCYCH W ŚCIEKACH GARBARSKICH PRZEZ BAKTERIE WYDZIELONE Z TEGO ŚRODOWISKA[x)]

Rozkład złożonych substancji białkowych znajdujących się w różnych wodach odpadowych do wolnych aminokwasów odbywa się przy współudziale mieszanych populacji bakteryjnych. Rozkład ten jest wielostopniowy i przebiega z pośrednim tworzeniem polipeptydów niskodrobinowych.

Prace związane z występowaniem wolnych i związanych aminokwasów w ściekach są jeszcze w literaturze nieliczne [1, 2, 3, 4]. Dotyczą one głównie oznaczania aminokwasów w ściekach bytowych i odpływach z różnych urządzeń oczyszczających te ścieki. Można natomiast stwierdzić zupełny brak podobnych opracowań składu aminokwasowego ścieków przemysłowych, zwłaszcza bogatych w substancje białkowe. Przyczyną tego stanu był prawdopodobnie brak prostych metod oznaczania aminokwasów w tych środowiskach. Wprowadzenie chromatografii bibułowej do oznaczania aminokwasów w hydrolizatach białkowych stworzyło podstawę do wykorzystywania tej metody do oznaczania aminokwasów również w ściekach. Stwierdzają to prace SASTRY i współpracowników [3], SUBRAHMANYAMa i współpracowników [5], EFFENBERGERa i JURSIKa [1] oraz JURSIKa [2], którzy oznaczali wolne i związane aminokwasy w ściekach metodą chromatografii bibułowej.

Wolne aminokwasy, powstałe z hydrolizy białek przy biologicznym oczyszczaniu ścieków są stopniowo zużywane przez drobnoustroje biorące udział w tym procesie. Służą one jako źródło energii oraz węgla i azotu do syntezy nowej masy

---

x) Część pracy doktorskiej wykonanej pod kierunkiem doc. dr inż. K. Kluczyckiego, kierownika Katedry Biologii Sanitarnej Politechniki Śląskiej.

komórkowej. Właściwy metabolizm aminokwasów przebiega wewnątrz komórek. Produkty rozkładu aminokwasów są różne, zależnie od warunków w jakich przebiegają procesy rozkładu i od enzymów, które katalizują ten rozkład [6, 7, 8]. Niewiele jest również prac omawiających rozkład poszczególnych aminokwasów przez saprofityczne bakterie tlenowe. Badania te dotyczą głównie bakterii chorobotwórczych przewodu pokarmowego [9, 10, 11]. Wśród prac nad metabolizmem aminokwasowym saprofitów na uwagę zasługują doświadczenia ŻVIRBLIANSKIEJ [12], która badała stopień wykorzystania aminokwasów przez bakterie z rodzaju Achromobacter, Flavobacterium i Bacillus wyhodowane ze słodu. Analizy chromatograficzne przeprowadzone po okresie hodowlanym wykazywały różny stopień wykorzystania aminokwasów przez poszczególne szczepy. Ogólne zużycie aminokwasów wahało się w granicach 20 do 50% zależnie od szczepu bakterii. DISLER [13] przeprowadził doświadczenia z Bacillus mesentericus badając jego wzrost na podłożu mineralnym z dodatkiem aminokwasów jako źródła azotu i węgla. Badanie chromatograficzne wykonane po okresie hodowlanym wykazało, że Bacillus mesentericus może wykorzystywać kwas glutaminowy, kwas asparaginowy, prolinę i alaninę jako źródło azotu i węgla.

Zadaniem niniejszej pracy było zbadanie zdolności wykorzystywania niektórych aminokwasów występujących w ściekach garbarskich przez niektóre bakterie wydzielone z tych środowisk. Charakterystykę rodzajową tych bakterii podaje PETRYCKA [14]. Znajomość tlenowego rozkładu związków organicznych, które stanowią główne zanieczyszczenie ścieków garbarskich przez drobnoustroje wyizolowane z tego środowiska, może ułatwić opracowanie procesów biologicznego oczyszczania tych ścieków.

W czasie wykonywania tej pracy należało rozwiązać niektóre zagadnienia metodyczne. Dotyczyły one przystosowania chromatografii bibułowej do oznaczania aminokwasów w ściekach garbarskich oraz odpowiedniego preparowania ścieków do chromatograficznej identyfikacji tych związków.

Część doświadczalna

Metodyka badań

Metodyka chromatografii bibułowej stosowana do oznaczania aminokwasów w ściekach garbarskich

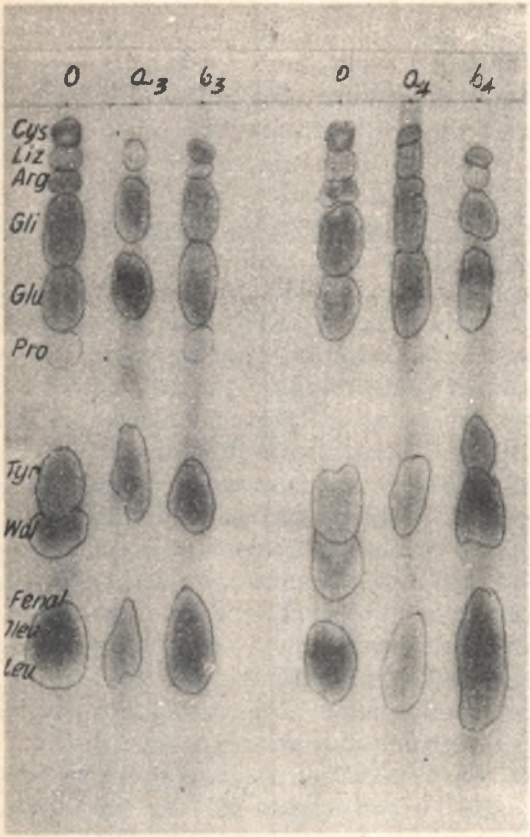
Do jakościowego oznaczania aminokwasów w ściekach z moczenia i wapnienia skór zastosowano metodę chromatografii bibułowej. Wybrano technikę jednokierunkowego spływu. Analizę chromatograficzną przeprowadzono na bibule Whatman nr 1 w paskach o szerokości 9 do 15 cm. Nanoszono dawki od 0,010 do 0,025 ml badanej próby. Do rozmywania chromatograficznego używano mieszaninę n-butanolu, kwasu octowego i wody (w stosunku objętościowym 4:1:5). Dodatkowo stosowano też układ fenol-woda (1:1) z domieszką 0,3% amoniaku do rozmywania chromatogramów sporządzonych z hydrolizatów kwasowych ścieków garbarskich. Czas rozwijania chromatogramu zależał od mieszaniny rozmywającej i wahał się od 18 do 20 godzin. Rozwinięte chromatogramy suszono w temperaturze pokojowej. Rozdzielone plamy aminokwasów wywoływano przez zanurzenie w 0,2% alkoholowym roztworze ninhydryny [15] i suszono w temperaturze pokojowej przez okres 12 do 18 godzin w pomieszczeniu zaciemnionym.

Jakościową identyfikację rozdzielonych aminokwasów prowadzono przez pomiar Rf plamy i przez bezpośrednie porównanie z położeniem plam aminokwasów chromatogramu wzorcowego.

Przykład rozdziału aminokwasów wywołany za pomocą mieszaniny n-butanol-kwas octowy-woda ilustruje rysunek 1. Typowy rozdział chromatograficzny aminokwasów uzyskany przez rozmycie roztworem fenolu podaje rysunek 2.

Zagęszczanie prób i oddzielanie soli ze ścieków z moczenia i wapnienia skór dla oznaczania wolnych aminokwasów

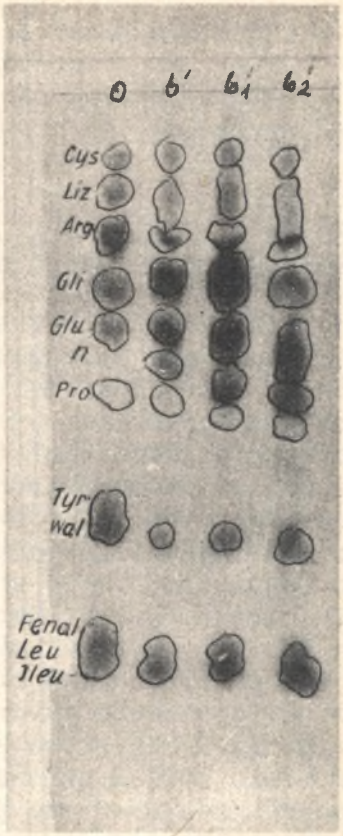
Bezpośrednie stwierdzenie obecności wolnych aminokwasów i polipeptydów w objętości 10 ml ścieków z moczenia i wapnienia skór próbą ninhydrynową [15, 16], dawało wyniki pozytywne. Natomiast bezpośrednie jakościowe oznaczenie ami-



Rys. 1. Analiza chromatograficzna wolno występujących aminokwasów

a_3, a_4 - w dwu różnych próbkach ścieków z moczenia skór, b_3, b_4 - w dwu różnych próbkach ścieków z wapnienia skór 0 - chromatogram wzorcowy

Chromatogram rozwijano roztworem n-butanolu kwasu octowego i wody (4:1:5)



Rys. 2. Typowy rozdział chromatograficzny aminokwasów w hydrolizacie kwasowym ścieków z wapnienia skór:

0 - chromatogram wzorcowy, b', b'_1, b'_2 - chromatogramy trzech różnych prób ścieków z wapienia skór, n - niezidentyfikowany aminokwas

nokwasów w tych ściekach metodą chromatograficzną nie powiodło się. Występują one w stężeniach niewystarczających do wykrycia przy pomocy tej techniki analitycznej.

Część aminokwasów była związana w postaci układów polipeptydowych. Wstępne próby odsolenia i zagęszczenia ścieków z moczenia i wapnienia skór metodą elektrodializy nie dały spodziewanych rezultatów: długotrwała elektrodializa nie dawała wystarczającego zagęszczenia aminokwasów. Do oznaczania wolnych aminokwasów jak i aminokwasów związanych w układach polipeptydowych wybrano więc metodę zagęszczania ścieków przez odparowanie [5]. Proces zagęszczania ścieków garbarskich dla oznaczenia wolnych aminokwasów polegał na odparowaniu 100 ml badanych ścieków do sucha na łaźni wodnej w kontrolowanej temperaturze 55°-60°C. Zagęszczone substancje oddzielano od soli nieorganicznych metodą ekstrakcji acetanowej [2]. Osad zalewano 10 ml acetonu zakwaszonego 1% HCl na okres 2 godzin. Ekstrakt acetonowy zlewano do probówek i wirowano. W celu dokładnego wyekstrahowania aminokwasów z osadu, zabieg ten powtarzano trzykrotnie. Otrzymany ekstrakt odparowywano w temperaturze około 40°C na łaźni wodnej do sucha. Cienką warstewkę otrzymanej suchej substancji rozpuszczano w 1 ml wody destylowanej i używano do chromatografii bibułowej.

Zagęszczenie i hydrolizowanie ścieków do oznaczania związanych aminokwasów

Część aminokwasów obecnych w ściekach z moczenia i wapnienia skór była związana w układach polipeptydowych. Aby oznaczyć te aminokwasy należało ścieki zagęścić i poddać hydrolizie kwasowej. Ścieki w ilości 500 ml zagęszczano do objętości 10 ml przez odparowanie w szklanym jenajskim aparacie próżniowym w temperaturze 60°C. Tak zagęszczone ścieki przelewano ilościowo do parowniczki i odparowywano do sucha [1]. Z kolei odważano 250 mg otrzymanego osadu i poddawano hydrolizie kwasowej. Osad ten zalewano 20-krotną objętością mieszaniny 20% HCl i 50% HCOOH po czym ogrzewano do wrzenia przez 24 godziny pod chłodnicą zwrotną. Hydrolizat sączono przez bibułę filtracyjną i zagęszczano do objętości 5 ml, a następnie odparowywano w eksykatorze próżniowym nad stałym KOH do sucha. Zabieg ten powtarzano trzykrotnie w celu usunięcia chlorowodoru. Po u-

sunięciu HCl osad miał barwę ciemnobrunatną. Rozpuszczano z kolei ten osad w 10 ml wody destylowanej i odbarwiano węglem aktywnym z dodatkiem chloroformu [17]. Po odbarwieniu sączono, zaś filtrat odparowywano do sucha. Otrzymany osad odsalano metodą ekstrakcji acetonowej [2], stosując poprzednio opisany zabieg. Ekstrakt acetonowy odparowywano do sucha, zaś cały osad rozpuszczano w 2 ml wody destylowanej i używano do chromatografii bibułowej.

Metodyka badania rozkładu aminokwasów przez kultury bakteryjne

Rozkład aminokwasów przez badane drobnoustroje stwierdzano na ciekłych podłożach mineralnych sporządzonych według ŻUKOWA [11] LEDERBERGa [18] i DISLERa [13]. Do tych podłoży dodawano aminokwasy wykryte jakościowo metodą chromatograficzną w ściekach z moczenia i wapnienia skór w stężeniach po 0,01% w roztworach wodnych wyjałowionych przez ultrafiltrację na filtrach Seitza.

Pożywka ŻUKOWa [11] miała skład: $(NH_4)_3PO_4$ - 1,0 g; K_2HPO_4 - 1,0 g; Na_2SO_4 - 0,2 g; $MgSO_4$ - 0,1 g; NaCl - 5,0g; glukoza - 5,0 g; woda destylowana - 1000 ml. Odczyn miał pH 7,2. Pożywkę rozlewano do probówek w ilościach po 5 ml i sterylizowano jednorazowo w temperaturze 120°C przez 15 minut. Następnie dodawano jałowo po 0,01% każdego z aminokwasów według receptury PELCZARa [19]. Zastosowaną symbolikę znakowania pożywek zależną od składu aminokwasowego podaje tablica I.

Skład pożywki według LEDERBERGa [18] był następujący: K_2HPO_4 - 0,7 g, KH_2PO_4 - 0,2 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ - 0,01 g, $(NH_4)_2SO_4$ - 0,1 g, cytrynian sodu - 0,05 g, glukoza - 0,2 g, woda destylowana - 1000 ml. Odczyn środowiska wynosił pH 7,2. Pożywki rozlewano do probówek po 5 ml, zaś do kolbek Erlenmayera po 20 ml. Sterylizowano jednorazowo w autoklawie w temperaturze 120°C przez 15 minut. Następnie dodawano jałowe aminokwasy po 0,01% według receptury LEDERBERGa [18]. Zastosowaną symbolikę znakowania pożywek zależną od składu aminokwasowego podaje tablica II.

Pożywka według DISLERa [13] miała skład: KH_2PO_4 - 1,0 g, $MgSO_4$ - 0,05 g, $NaCO_3$ - 0,2 g, $FeSO_4$ - w śladach, woda de-

Tablica I

Pożywka ŻUKOWa [11] z aminokwasami dodawanymi według PELCZARa [19]

Symbol pożywki	Skład aminokwasów	Aminokwasy usuwane ze składu pożywki
1/1	Cystyna, lizyna, glicyna, arginina, kwas glutaminowy, walina, tyrozyna, fenyloalanina, leucyna, izoleucyna	
1/2	"	- Cystyna
1/3	"	- Lizyna
1/4	"	- Arginina
1/5	"	- Glicyna
1/6	"	- Kwas glutaminowy
1/7	"	- Tyrozyna
1/8	"	- Walina
1/9	"	- Fenyloalanina
1/10	"	- Leucyna, izoleucyna

Tablica II

Pożywka według LEDERBERGa [18]

Symbol pożywki	Dodawane aminokwasy
2/1	Cystyna, lizyna, arginina
2/2	Leucyna, izoleucyna, walina
2/3	Tyrozyna, fenyloalanina
2/4	Kwas glutaminowy
2/5	Glicyna
2/6	Cystyna, lizyna, arginina, leucyna, izoleucyna, tyrozyna, fenyloalanina, kwas glutaminowy, glicyna, walina

stylowana 100 ml. Odczyn odpowiadał pH 7,2. Pożywkę rozlewano do probówek po 5 ml, zaś do kolbek po 20 ml. Sterylizowano jednorazowo w autoklawie o temperaturze 120°C przez 15 minut, po czym dodawano jałowo aminokwasy analogicznie jak do pożywki LEDERBERGa [18] z tym jednak, że ilości aminokwasów były dziesięciokrotnie większe i wynosiły 0,1%.

Szczepy bakteryjne wybrane do badań [14] hodowano na bulionie agarowym w skosach przez 24 godziny w temperaturze 27 + 1°C, po czym hodowlę zmywano z podłoża roztworem soli fizjologicznej i wirowano przez 15 minut przy 3 tysiącach obrotów na minutę. Ciecz nadosadową dekantowano jałowo, a komórki zawarte w osadzie zalewano ponownie sterylizowanym roztworem soli fizjologicznej. Dla dokładnego przemycia komórek zabieg przemywania i wirowania powtarzano trzykrotnie. Z przemytego osadu sporządzano zawiesinę bakteryjną o gęstości $2,0.10^6$ komórek w 1 ml roztworu soli fizjologicznej.

Rozkład aminokwasów w hodowlach bakteryjnych badano w warunkach hodowli nieprzewietrzanej oraz w czasie stałego przewietrzania.

Do badań w warunkach statycznych szereg 6 do 10 probówek zawierających zestawy wymienionych pożywek zaszczepiano objętością 0,5 ml przygotowanych zawiesin bakteryjnych.

Posiewy hodowano w temperaturze 27 ± 1°C przez 48, 72 i 96 godzin. Badania w warunkach stałego napowietrzania prowadzono w kolbkach zawierających 20 ml pożywki, które zaszczepiano za pomocą 2 ml przygotowanej zawiesiny bakteryjnej. Hodowlę prowadzono w temperaturze 27 ± 1°C, przepuszczając przez pożywkę oczyszczone przez filtrację watą powietrze w ilości 0,8 l/godz. Rozkład aminokwasów badano po 8, 12, 24 i 48 godzinach stałego napowietrzania.

Dynamikę rozkładu aminokwasów zawartych w pożywkach oznaczono metodą chromatografii bibułowej. Po określonym czasie hodowli, pobierano jałowo 1 ml zawiesiny bakteryjnej i wirowano przez 15 minut przy 3 tysiącach obrotów na minutę. Płyn znad osadu dekantowano i używano do badań chromatograficznych. Obserwację dynamiki rozkładu aminokwasów umożliwiło porównanie intensywności plam chromatogramów sporządzonych z hodowli z plamami chromatogramów wzorcowych, wykonanych z pożywek jałowych o tym samym składzie aminokwasowym.

Przebieg doświadczeń i wyniki badań

Wolne i związane aminokwasy w ściekach garbarskich

Rozkład białek zawartych w skórach surowych w procesie moczenia i wapnienia skór przebiega głównie pod wpływem działania enzymów bakterii gnilnych tego środowiska. Występowanie procesów hydrolizy białek w ściekach starano się wykazać przy pomocy analizy chromatograficznej wód poprodukcyjnych z moczenia i wapnienia skór. Analiza ta miała wykazać obecność w stanie wolnym aminokwasów stanowiących główne składniki białek skóry. Badane ścieki w ilości 100 ml zagęszczano i oddzielano od soli drogą ekstrakcji acetonowej. Uzyskany preparat stosowano do oznaczania wolnych aminokwasów. Stosowano porcje po 0,020 ml ekstraktu otrzymanego ze ścieków z moczenia skór oraz po 0,010 ml ekstraktu ze ścieków z wapnienia skór.

Związane aminokwasy uwalniano przez 24 godzinną hydrolizę kwasową ścieków z moczenia i wapnienia skór. Na punkty startowe na bibule nanoszono porcje po 0,010 ml ekstraktu. Typowy skład wolnych aminokwasów w ściekach z moczenia skór oraz wapnienia i płukania skór po wapnieniu podaje rysunek 1 oraz tablice III i IV.

Tablica III

Wolne aminokwasy wykazane chromatograficznie w ściekach z moczenia skór

Aminokwasy	Próby			
	a_1	a_2	a_3	a_4
Cystyna	0	0	0	++
Lizyna	++	++	+	++
Arginina	++	++	0	++
Glicyna	++	++	++	++
Kwas glutaminowy	+++	++	+++	++
Prolina	0	0	0	0
Tyrozyna, walina	+	+	++	+
Fenyloalanina, leucyna, izoleucyna	+	+	++	+

Objaśnienie znaków: 0 = brak aminokwasów w roztworze; symbolem od + do +++ oznaczano wzrastające natężenie barwy plam aminokwasów w chromatogramach rozmywanych roztworem n-butanolu - kwasu octowego i wody (4:1:5), wywoływanych 0,2% alkoholowym roztworem ninhydryny.

Tablica IV

Wolne aminokwasy wykazane chromatograficznie w ściekach z wapnienia skór

Aminokwasy	Próby			
	b_1	b_2	b_3	b_4
Cystyna	+	0	0	0
Lizyna	+	+	++	++
Arginina	0	0	+	+
Glicyna	+++	++	++	++
Kwas glutaminowy	+++	++	++	++
Prolina	0	+	+	0
Tyrozyna, walina	+++	++	+++	+++
Fenyloalanina, leucyna, izoleucyna	+++	+++	+++	+++

Objaśnienie znaków: 0 = brak aminokwasów w roztworze; symbolem od + do +++ oznaczano wzrastające natężenie barwy plam aminokwasów w chromatogramach rozmywanych roztworem n-butanolu - kwasu octowego i wody (4:1:5), wywoływanych 0,2% alkoholowym roztworem ninhydryny.

Tablica V

Aminokwasy wykazane chromatograficznie w ściekach z moczenia i wapnienia skór po hydrolizie kwasowej

Aminokwasy	Hydroliza kwasowa ścieków				
	moczenie skór		wapnienie skór		
	próby		próby		
	a_1	a_2	b	b_1	b_2
Cystyna	++	+	++	++	++
Lizyna	++	+	++	+++	++
Arginina	++	++	+++	+++	+++
Glicyna	+++	+++	+++	+++	++
Kwas glutaminowy	+++	+++	+++	+++	+++
Aminokwas niezident.	+++	+++	++	+++	+++
Prolina	0	0	++	++	++
Tyrozyna, walina, fenyloalanina, leucyna, izoleucyna	+	+++	++	+++	+++

Objaśnienie znaków: 0 = brak aminokwasów w roztworze; symbolem od + do +++ oznaczano wzrastające natężenie barwy plam aminokwasów w chromatogramach rozmywanych roztworem n-butanolu - kwasu octowego i wody (4:1:5), wywołanych 0,2% alkoholowym roztworem ninhydryny.

W obu rodzajach ścieków hydroliza kwasowa wykazała obecność związanych aminokwasów. Chromatograficznie stwierdzono występowanie cystyny, lizyny, argininy, glicyny kwasu glutaminowego, tyrozyny, waliny, fenyloalaniny, leucyny, izoleucyny oraz niezidentyfikowanego aminokwasu. Oprócz wymienionych aminokwasów w ściekach z wapnienia skór występowała prolina. Plama nieoznaczonego aminokwasu na chromatogramach znajdowała się poniżej plamy kwasu glutaminowego. Uwidoczniają to rysunki 2 i 3 oraz tablica V.

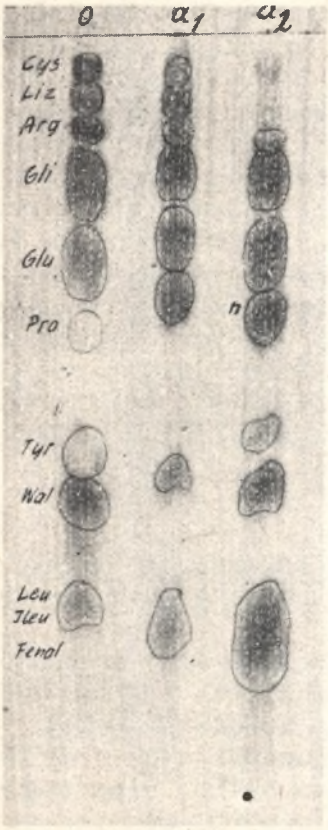
Wykazane w oznaczeniach chromatograficznych wolne aminokwasy stanowią główne składniki białek skóry, kollagenu i keratyny. Plamy aminokwasów, występujących w wymienionych białkach w znacznych ilościach były intensywniejsze aniżeli plamy aminokwasów mniej typowych dla tych białek lub występujących tylko w jednej z wymienionych substancji białkowych.

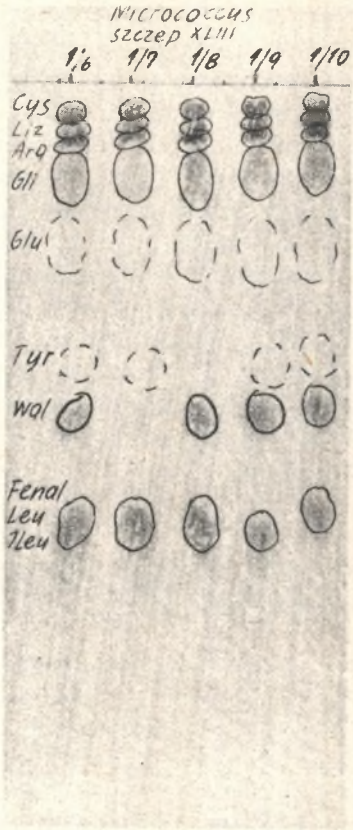
Rozkład aminokwasów stwierdzonych w ściekach z moczenia i wapnienia skór przez bakterie wyizolowane z tych środowisk

Rozkład aminokwasów występujących w odpływach z moczenia i wapnienia skór przez bakterie wyosobnione z tych środowisk badano na pożywkach sporządzonych według ŻUKOWA [11], LEDERBERGA [18] i DISLERA [13]. Do pożywek tych dodawano aminokwasy: l-cystynę, l-lizynę, l-argininę, kwas l-glutaminowy, glicynę, l-tyrozynę, dl-walinę, dl-fenyloalaninę, l-leucynę, l-izoleucynę w ilościach po 0,1 mg/l każdego aminokwasu według receptury podanej w publikacjach ŻUKOWA [11] i LEDERBERGA [18] (tablica I i II).

Przed użyciem pożywek do hodowli przeprowadzano kontrolę ich jałowości przez termostatowanie w temperaturze 27°C w okresie 48 godzin.

Do badań wykorzystywania wymienionych aminokwasów w procesie metabolizmu bakteryjnego wzięto dowolnie wybrane szczepy bakterii z poszczególnych grup rodzaju Achromobacter, Micrococcus, Bacillus, Alcaligenes i Escherichia. Powyższe szczepy występowały co najmniej w 40% diagnostycznych badań bakteriologicznych poprzedzających niniejsze prace [14]. Wytypowane szczepy bakteryjne hodowano na bulionie agarowym przez 24 godziny w temperaturze 27°C. Z hodowli tych sporządzano zawiesinę bakteryjną o gęstości około $2x10^6$ komórek w 1 ml roztworu soli fizjologicznej i





Rys. 3. Typowy rozdział chromatograficzny aminokwasów w hydrolizacie kwasowym ścieków z moczenia skór:

0 - chromatogram wzorcowy, a_1, a_2 - chromatogramy dwóch różnych prób z moczenia skór
n - niezidentyfikowany aminokwas

Chromatogramy rozwijano roztworem n-butanolu kwasu octowego i wody (4:1:5)

Rys. 4. Fragment z tabeli VI pożywki ŻUKOVa od 1/6 do 1/10 demonstruje typowy przebieg rozkładu kwasu glutaminowego i tyrozyny przez rodzaj Micrococcus szczep XLIII w hodowli nienapowietrzanej

zawiesinę tę dokładnie przemywano płynem fizjologicznym. Zawiesina ta służyła do zaszczepienia prób użytych w badaniach nad rozkładem aminokwasów w hodowlach nieprzewietrzanych i przewietrzanych.

Badania rozkładu aminokwasów w hodowlach nieprzewietrzanych przez bakterie wyosobnione ze ścieków garbarskich

Badania rozkładu aminokwasów przeprowadzono w dwu seriach w hodowlach nienapowietrzanych (seria I i II). Użyto wytypowanych szczepów bakteryjnych z rodzaju Achromobacter oznaczonych symbolem I, CI, CXXI, z rodzaju Alcaligenes szczep LXVIII, -Escherichia szczep oznaczony numerem CIII z rodzaju Micrococcus szczepy o symbolach IX, XLIII i LXXII a z rodzaju Bacillus szczepy XVI, LIII i LXXXVI. W pierwszej serii stosowano pożywkę sporządzoną według ŻUKOWa [11], zaś w drugiej serii użyto pożywki przygotowanej według przepisów LEDERBERGa [18].

Bakterie z rodzaju Bacillus nie wykorzystywały aminokwasów na podłożach wyżej wymienionych, dlatego badano je dodatkowo w trzeciej serii doświadczeń na pożywce sporządzonej według DISLERa [13]. Na tym podłożu DISLER badał zużycie aminokwasów jako źródła węgla i azotu dla Bacillus mesentericus i otrzymał dobre wyniki wzrostu.

Roztwory wymienionych pożywek zaszczepiano objętością 0,5 ml przygotowanych zawiesin bakteryjnych. Posiewy hodowano w temperaturze 27 ± 1 °C przez okres 24, 48, 72 i 96 godzin. Były to warunki ogólnie przyjęte dla tego typu badań [11, 12, 20].

Rozkład poszczególnych aminokwasów zawartych w wymienionych podłożach oznaczano metodą chromatograficzną po 48, 72 i 96 godzinach hodowli. W tych okresach czasu pobierano jałowo po 1 ml cieczy i wirowano. Ciecz nadosadową dekantowano i używano bezpośrednio do badań chromatograficznych bez zabiegów zagęszczających.

Odczytane wyniki z chromatogramów rozkładu aminokwasów przez użyte szczepy bakteryjne w wymienionych podłożach nienapowietrzanych podają tablice VI i VII. Fragmenty przebiegu rozkładu badanych aminokwasów w podłożu ŻUKOWa obrazuje rysunek 4, zaś w pożywce LEDERBERGa - rysunek 5.

Tablica VI

Rozkład niektórych aminokwasów występujących w ściekach garbarskich w czasie hodowli na pożywce ŻUKOWa z zawiesinami drobnoustrojów wydzielonych z tych środowisk

Rodzaj bakterii	Symbol szczepu	Aminokwasy: cystyna (Cys), lizyna (Liz), arginina (Arg), glicyna (Gli), kw. glutaminowy (Glu), tyrozyna (Tyr), walina (Val) fenyloalanina (Fenol), leucyna (Leu), izoleucyna (Ileu)																													
		Symbol pożywki i objęte aminokwasy																													
		1/1 pełny skład			1/2 - odjęta Cys			1/3 - odjęta Liz			1/4 - odjęta Arg			1/5 - odjęta Gli			1/6 - odjęta Glu			1/7 - odjęta Val			1/8 - odjęta Tyr			1/9 odjęta Fenol			1/10 - odjęta Leu i Ileu		
		Czas hodowli																													
		48	72	96	48	72	96	48	72	96	48	72	96	48	72	96	48	72	96	48	72	96	48	72	96	48	72	96	48	72	96
Achromobacter	I	+++	+++	Arg+	+++	+++	Arg+	+++	+++	Arg+	+++	+++	+++	+++	+++	Arg+	+++	+++	Arg+	+++	+++	Arg+	+++	+++	Arg+	+++	+++	Arg+	+++	+++	Arg+
	CI	+++	Glu, Gli +	Arg, Gli, Glu, Cys, Tyr ++ 0	+++	Glu, Gli +	Arg, Gli, Glu, Tyr ++ 0	+++	Glu, Gli +	Arg, Gli, Glu, Cys, Tyr ++ 0	+++	Glu, Gli +	Gli, Glu, Cys, Tyr ++ 0	+++	Glu +	Arg, Glu, Cys, Tyr ++ 0	+++	Gli +	Arg, Gli, Cys, Tyr ++ 0	+++	Glu, Gli +	Arg, Gli, Glu, Cys, Tyr ++ 0	+++	Glu, Gli +	Arg, Gli, Glu, Cys, Tyr ++ 0	+++	Glu, Gli +	Arg, Gli, Glu, Cys, Tyr ++ 0	+++	Glu, Gli +	Arg, Gli, Glu, Cys, Tyr ++ 0
	CXXI	+++	+++	Cys, Liz, Arg, Glu, Tyr +	+++	+++	Liz, Arg, Glu, Tyr +	+++	+++	Cys, Arg, Glu, Tyr +	+++	+++	Cys, Liz, Glu, Tyr +	+++	+++	Cys, Liz, Arg, Glu, Tyr +	+++	+++	Cys, Liz, Arg, Tyr +	+++	+++	Cys, Liz, Arg, Glu, Tyr +	+++	+++	Cys, Liz, Arg, Glu, Tyr +	+++	+++	Cys, Liz, Arg, Glu, Tyr +	+++	+++	Cys, Liz, Arg, Glu, Tyr +
Alcaligenes	LXVIII	+++	+++	Gli +	+++	+++	Gli +	+++	+++	Gli +	+++	+++	Gli +	+++	+++	+++	+++	+++	Gli +	+++	+++	Gli +	+++	+++	Gli +	+++	+++	Gli +	+++	+++	Gli +
Escherichia	CIII	+++	+++	Cys 0	+++	+++	+++	+++	+++	Cys 0	+++	+++	Cys 0	+++	+++	Cys 0	+++	+++	Cys 0	+++	+++	Cys 0	+++	+++	Cys 0	+++	+++	Cys 0	+++	+++	Cys 0
Micrococcus	IX	+++	Glu++	Glu 0	+++	Glu++	Glu 0	+++	Glu++	Glu 0	+++	Glu++	Glu 0	+++	Glu++	Glu 0	+++	+++	+++	+++	Glu++	Glu 0	+++	Glu++	Glu 0	+++	Glu++	Glu 0	+++	Glu++	Glu 0
	XLIII	+++	Glu, Tyr 0	Glu, Tyr 0	+++	Glu, Tyr 0	Glu, Tyr 0	+++	Glu, Tyr 0	Glu, Tyr 0	+++	Glu, Tyr 0	Glu, Tyr 0	+++	Glu, Tyr 0	Glu, Tyr 0	+++	Tyr 0	Tyr 0	+++	Tyr 0, Glu 0	Tyr 0, Glu 0	+++	Glu 0	Glu 0	+++	Glu, Tyr 0	Glu, Tyr 0	+++	Glu, Tyr + 0	Glu, Tyr 0
	LXXIIa	+++	+++	Arg+	+++	+++	Arg+	+++	+++	Arg+	+++	+++	+++	+++	+++	Arg+	+++	+++	Arg+	+++	+++	Arg+	+++	+++	Arg+	+++	+++	Arg+	+++	+++	Arg+
Bacillus	XIV	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	LIII	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	LXXXVI	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

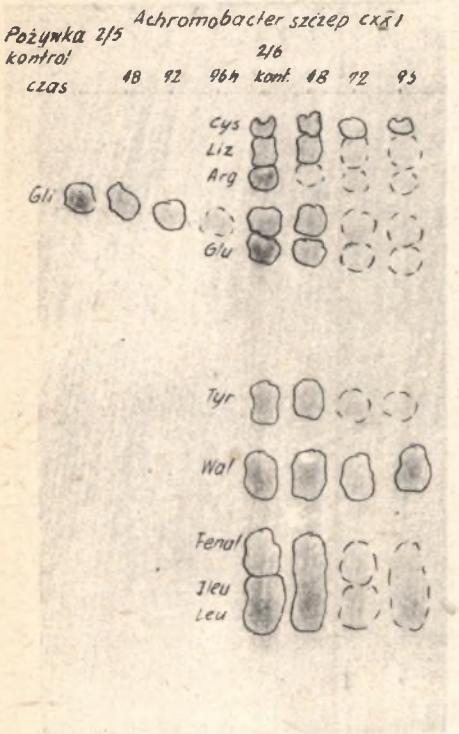
Uwaga: W pożywce ŻUKOWa znajdowało się dziesięć aminokwasów. Badania obejmowały serie hodowlane w środowisku kolejno zubożanym w jeden z badanych aminokwasów. Maksymalna wielkość i natężenie zabarwienia plamy chromatografii oznaczono symbolem +++. Zupełny zanik określonego aminokwasu oznaczono znakiem 0 z nazwą związku.

Tablica VII

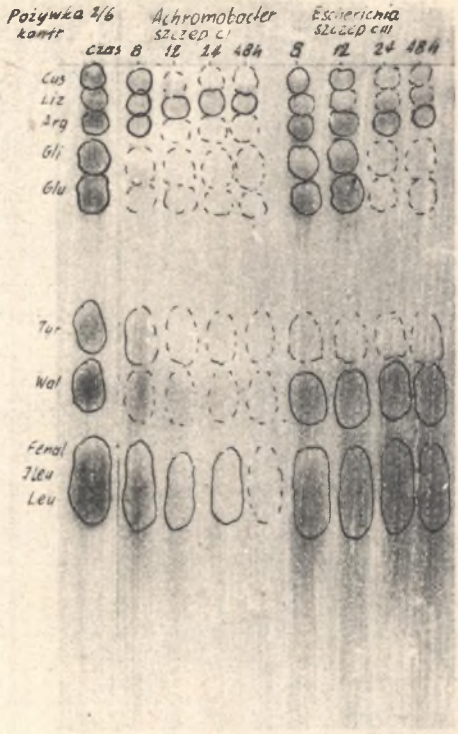
Rozkład kilku aminokwasów występujących w ściekach garbarskich w czasie statycznej hodowli w pożywce LEDERBERGa z zawiesinami drobnoustrojów

Rodzaj bakterii	Symbol szczepu	Symbol pożywki i dodawane aminokwasy																	
		2/1 Cystyna (Cys), lizyna (Liz) arginina (Arg)			2/2 Walina (Wal) leucyna (Leu), izoleucyna (Ileu)			2/3 Tyrozyna (Tyr), fenyloalanina (Fenal)			2/4 Kwas glutaminowy (Glu)			2/5 Glicyna (Gli)			2/6 Cys, Liz, Arg, Wal, Leu, Ileu Tyr, Glu, Gli, Fenal.		
		Czas hodowli			Czas hodowli			Czas hodowli			Czas hodowli			Czas hodowli			Czas hodowli		
		48	72	96	48	72	96	48	72	96	48	72	96	48	72	96	48	72	96
Achromobacter	I	Arg +	Arg 0	Arg 0	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	Gli +	Gli +	+ + +	Arg 0 Gli +	Arg 0 Gli +
	CI	Arg +	Arg 0	Arg 0	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	Tyr 0 Fenal +	+ + +	Glu +	Glu 0	+ + +	Gli ++	Gli 0	Arg Gli Glu Tyr + } 0	Arg Gli Glu Tyr + } 0	Arg Gli Glu Tyr Fenal ++ } 0
	CXXI	Cys ++ Liz ++ Arg ++	Cys ++ Liz 0 Arg ++	Liz 0 Cys + Arg +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	Tyr ++	Tyr + Fenal ++	Glu ++	Glu 0	Glu 0	+ + +	Gli ++	Gli +	Arg 0	Cys, Gli Tyr, Fenal Liz, Arg Glu } 0	Cys + Wal Leu Ileu ++ Liz, Arg Gli, Glu Tyr } 0
Escherichia alcaligena	LXVII	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	Glu 0	Glu 0	+ + +	Gli ++	Gli 0	Gli +	Glu 0 Gli 0	Glu 0 Gli 0
	CIII	+ + +	Cys Liz } ++	Cys Liz } ++	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	Glu ++	Glu 0	+ + +	Gli +	Gli 0	+ + +	Gli Glu } 0 Liz Cys } ++	Cys Liz } ++ Glu Gli } 0
Micrococcus	IX	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	Glu 0	Glu 0	Glu 0	+ + +	+ + +	+ + +	Glu ++	Glu 0	Glu 0
	XLIII	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	Tyr 0	Tyr 0	Tyr 0	Glu 0	Glu 0	Glu 0	+ + +	+ + +	+ + +	Glu Tyr } 0	Glu Tyr } 0	Glu Tyr } 0
	LXXIIa	+ + +	+ + +	Arg 0	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	Arg 0
Bacillus	XIV	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +
	LIII	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +
	LXXXVI	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +

Uwaga: W pożywce LEDERBERGa znajdowały się serie składające się z jednego do dziesięciu wybranych aminokwasów. Maksymalna wielkość i natężenie zabarwienia plamy chromatografii znaczono symbolem +++. Zupełny zanik określonego aminokwasu znaczono znakiem 0 z nazwą związku.



Rys. 5. Typowy przebieg częściowego wykorzystania glicyny przez rodzaj Achromobacter szczep CXXI w pożywce LEDERBERGa 2/5 oraz całkowitego zużycia lizyny, argininy, glicyny, kwasu glutaminowego i tyrozyny, silnego cystyny i częściowego fenyloalaniny, leucyny i izoleucyny w pożywce LEDERBERGa 2/6 w hodowlach nienapowietrzanych (tablica VII)



Rys. 6.Typowy przebieg rozkładu cystyny,argininy,glicyny, kwasu glutaminowego, tyrozyny, waliny, leucyny, izoleucyny i fenyloalaniny przez rodzaj Achromobacter szczep CI, rozkład częściowo cystyny, lizyny i całkowity glicyny,kwasu glutaminowego i tyrozyny przez rodzaj Escherichia szczep CIII w podłożu LEDERBERGa 2/6 w warunkach stałego napowietrzania (tablica VIII)

Badania rozkładu aminokwasów przez kultury bakterii wyosobnionych ze ścieków garbarskich w czasie napowietrzania

Przeprowadzono badanie rozkładu aminokwasów w warunkach stałego napowietrzania (seria III). Zastosowano szczepy bakteryjne należące do rodzajów Achromobacter znaczone symbolami I, CI i CXXI, Alcaligenes o symbolu LXVIII, Escherichia o symbolu CIII, Micrococcus o symbolach IX, XLIII i LXXIIa oraz Bacillus o symbolach XIV, LIII i LXXXVI. Badania te przeprowadzono na pożywce przygotowanej według LEDERBERGa [18]. Bakterie z rodzaju Bacillus znaczone symbolami XIV, LIII i LXXXVI hodowano dodatkowo w pożywce DISLERa [13].

Kolbki zawierające po 20 ml pożywki zaszczepiane przez 2 ml przygotowanych zawiesin bakteryjnych oraz kolbki kontrolne z pożywką jałową hodowano w temperaturze 27 ± 1°C przy stałej aeracji. Przez pożywkę przepuszczano 0,8 l wyjałowionego powietrza na godzinę.

Rozkład aminokwasów wprowadzonych w pożywkach badano metodą chromatografii bibułowej po 8, 12, 24 i 48 godzinach napowietrzania. Zastosowano metodykę użytą w badaniu bakteryjnego rozkładu aminokwasów w seriach bez napowietrzania.

Po zakończeniu doświadczenia przeprowadzano kontrolę czystości kultur napowietrzanych przez rozsiewy powierzchniowe hodowli na bulionie agarowym w płytkach Petriego i przez bezpośrednie wykonanie preparatów barwionych metodą Grama.

Kontrolne napowietrzanie jałowej pożywki z badanymi aminokwasami nie zmieniało ich stężenia w podłożu.

Otrzymane wyniki chromatograficznych badań rozkładu aminokwasów przez bakterie przy stałym napowietrzaniu zestawiono w tablicy VIII. Typowy przebieg dynamiki rozkładu badanych aminokwasów podają rysunki 6 i 7.

Omówienie wyników

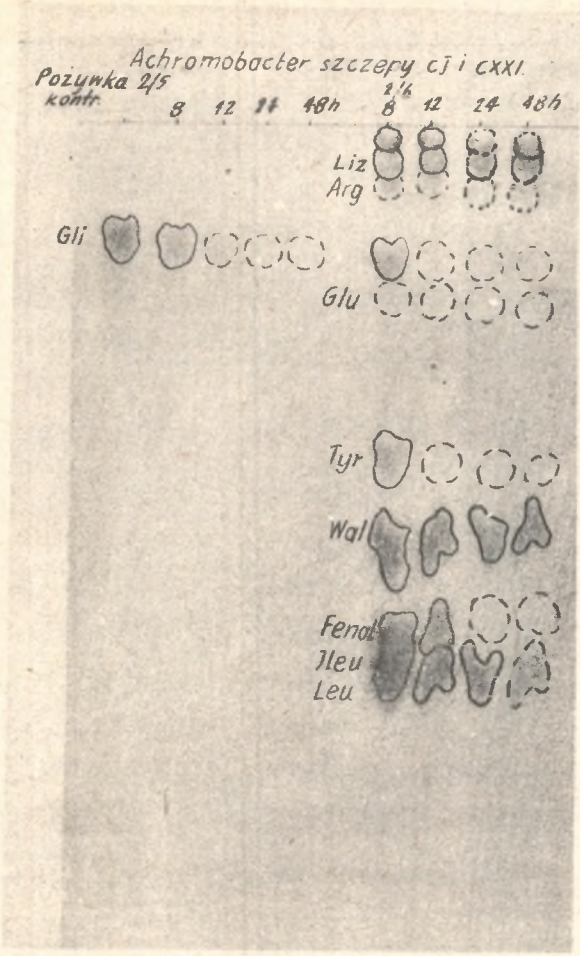
Drobnoustroje wyizolowane ze ścieków garbarskich rozwijają się w tych ściekach na skutek zdolności wykorzystywania organicznych substancji zanieczyszczających, jako substratów energetycznych i materiałów dla syntezy masy komórkowej. Substancje zanieczyszczające miały głównie charakter

Tablica VIII

Rozkład kilku wybranych aminokwasów występujących w ściekach garbarskich w czasie stałej dynamicznej aeracji hodowli w pożywce LEDERBERGa z zawiesinami wytypowanych drobnoustrojów.

Rodzaj bakterii	Symbol szczepu	Symbol pożywki i dodawane aminokwasy																							
		2/1 Cystyna (Cys), lizyna (Liz) arginina (Arg)				2/2 Walina (Wal), leucyna (Leu) izoleucyna (Ileu)				2/3 Tyrozyna (Tyr) Fenyloalanina (Fenal)				2/4 Kwasglutaminowy (Glu)				2/5 Glicyna (Gli)				2/6 Cys, Liz, Arg, Wal, Leu, Ileu, Glu, Gli, Tyr, Fenal			
		Czas hodowli				Czas hodowli				Czas hodowli				Czas hodowli				Czas hodowli				Czas hodowli			
		8	12	24	36-48	8	12	24	36-48	8	12	24	36-48	8	12	24	36-48	8	12	24	36-48	8	12	24	36-48
Achromobacter	I	+++	+++	+++	Arg 0	+++	+++	+++	Wal, Leu, Ileu } ++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	Glu 0	Glu 0	+++	+++	Gli 0	Gli 0	+++	+++	Arg 0	Arg, Glu, Gli } 0
	C1	Arg +	Cys + Arg 0	Cys, Arg } 0	Cys, Arg } 0	+++	+++	Wal, Leu, Ileu } ++	Wal, Leu, Ileu } +	Tyr +	Tyr 0 Fenal +	Tyr 0 Fenal +	Tyr 0 Fenal +	Glu 0	Glu 0	Glu 0	Glu 0	+++	Gli +	Gli 0	Gli 0	Gli, Glu } +	Gli, Glu, Tyr } 0 Cys, Arg, Wal, Fenal, Leu, Ileu } +	Cys, Arg, Glu, Tyr, Gli } 0 Wal, Fenal, Ileu, Leu } +	Cys, Arg, Gli, Glu, Tyr, Ileu, Leu, Wal, Fenal } +
	CXXI	Cys +	Cys + Liz, Arg } +	Cys, Liz, Arg + } +	Cys, Liz, Arg } +	+++	+++	Wal, Leu, Ileu } ++	Wal, Leu, Ileu } ++	+++	Tyr ++	Tyr 0	Tyr 0 Fenal ++	Glu 0	Glu 0	Glu 0	Glu 0	+++	+++	Gli ++	Gli 0	Arg + Glu 0	Arg, Gli, Glu, Tyr } 0	Arg, Gli, Glu, Tyr, Fenal } 0 Liz, Wal, Leu, Ileu } ++	Arg, Gli, Glu, Tyr, Fenal } 0 Liz, Wal, Leu, Ileu } ++
Alcaligenes	LXVIII	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	Glu 0	Glu 0	+++	+++	Gli ++	Gli 0	+++	+++	Glu, Gli } 0	Glu, Gli } 0
Escherich.	CIII	+++	Cys + Liz +	Cys ++ Liz +	Cys ++ Liz +	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	Tyr 0	+++	Glu ++	Glu 0	Glu 0	+++	+++	Gli 0	Gli 0	Tyr 0	Cys ++ Liz ++ Tyr 0	Cys, Liz } ++ Gli, Glu, Tyr } 0	Cys, Liz } ++ Gli, Glu, Tyr } 0
Micrococcus	IX	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	Glu ++	Glu 0	Glu 0	+++	+++	+++	Gli ++	+++	+++	Gli ++ Glu 0	Gli ++ Glu 0
	XLIII	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	Tyr 0	Tyr 0	Tyr 0	Tyr 0	Glu 0	Glu 0	Glu 0	Glu 0	+++	+++	+++	+++	Glu, Tyr } 0	Glu, Tyr } 0	Glu, Tyr } 0	Glu, Tyr } 0
	LXXIIa	Arg 0	Arg 0	Arg 0	Arg 0	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	Arg ++	Arg +	Arg 0	Arg 0
Bacillus	XIV	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	LIII	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	LXXXVI	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

Uwaga: W pożywce LEDERBERGa znajdowały się serie składające się od jednego do dziesięciu wybranych aminokwasów. Maksymalna wielkość i natężenie zabarwienia plamy chromatografi znaczono symbolem +++. Zupełny zanik określonego aminokwasu znaczono znakiem 0 z nazwą związku



Rys. 7. Typowy przebieg wykorzystania glicyny w podłożu LEDERBERGa 2/5 przez rodzaj Achromobacter szczep CI w czasie stałego napowietrzania. Typowy przebieg zużycia kwasu glutaminowego, glicyny, tyrozyny, argininy, fenyloalaniny oraz słabego - cystyny przez rodzaj Achromobacter szczep CXXI w pożywce LEDERBERGa przy stałym napowietrzaniu

białek i produktów ich rozkładu. Rozkład związków polipeptydowych i aminokwasów przez bakterie wyizolowane ze ścieków garbarskich nie jest dokładnie poznany. Interesujące więc było poznanie stopnia wykorzystywania aminokwasów z podłoża przez drobnoustroje wyosobnione ze środowiska charakteryzującego się dużą zawartością substancji organicznych pochodzenia białkowego.

W przeprowadzonych badaniach uwzględniono te aminokwasy, które występowały w stanie wolnym w ściekach lub w hydrolizatach kwasowych ścieków garbarskich z moczenia oraz wapnienia i płukania skór po wapnieniu. Występowanie tych aminokwasów stwierdzono metodą chromatografii bibułowej (tablice III, IV, V).

Badania chromatograficzne wykazały występowanie wolnej cystyny, lizyny, argininy, glicyny, kwasu glutaminowego, tyrozyny i waliny oraz fenyloalaniny, leucyny i izoleucyny (tablice III i IV, rys. 1).

W hydrolizatach kwasowych oprócz wymienionych aminokwasów występowała ponadto prolina oraz niezidentyfikowany aminokwas, zaś stężenie występujących aminokwasów było wyraźnie wyższe (tablica V, rysunek 3). Świadczy to o częściowym związaniu tych aminokwasów w układach polipeptydowych i innych związkach białkowych w świeżym środowisku ściekowym.

Badanie przyswajania i rozkładu aminokwasów przez wybrane szczepy bakteryjne przeprowadzono w trzech seriach. Pierwszą serię badań nad metabolizmem aminokwasów wykonano na pożywce ŻUKOWa [11]. Drugą i trzecią serię doświadczeń przeprowadzono na pożywce LEDERBERGa [18].

Rozkład aminokwasów przez bakterie przetrwalnikujące z rodzaju Bacillus badano oprócz tego dodatkowo na pożywce DISLERa [13]. Do wymienionych pożywek dodawano l-cystynę, l-lizynę, l-argininę, l-kwas glutaminowy, dl-walinę, l-tyrozynę, dl-fenyloalaninę, glicynę, l-leucynę i l - izoleucynę. Do pożywki ŻUKOWa aminokwasy dodawano według schematu podanego w tablicy I, zaś do pożywki LEDERBERGa i DISLERa według receptury podanej w tablicy II. Do doświadczeń tych pobrano szczepy bakteryjne, które występowały co najmniej w 40% przeprowadzonych analiz bakteriologicznych omawianych środowisk [14]. Były to bakterie z rodzajów Achromobacter (szczepy I, CI, CXXI), Alcaligenes (szczep LXVIII), Escherichia (szczep CIII), Micrococcus (szczepy IX, XLIII, LXXIIa) i Bacillus (szczepy XIV, LIII, LXXXVI).

Przebieg wykorzystywania aminokwasów w poszczególnych seriach doświadczeń przez wymienione szczepy bakteryjne przedstawia się następująco:

Szczep I z rodzaju Achromobacter bez napowietrzania w pożywce ŻUKOWa zużywał tylko częściowo argininę, co wyraźnie było widoczne po 96 godzinach hodowli (tablica VI), natomiast w pożywce LEDERBERGa całkowicie argininę i częściowo glicynę po 72 godzinach obserwacji (tablica VII). W trzeciej serii badań przy stałym napowietrzaniu na podłożu LEDERBERGa w kontakcie z bakteriami szczepu I z rodzaju Achromobacter znikał zupełnie kwas glutaminowy, arginina i glicyna oraz częściowo walina, leucyna i izoleucyna. Czas rozkładu tych aminokwasów wynosił 24 do 36 godzin (tablica VIII).

Szczep CI z rodzaju Achromobacter bez napowietrzania w pierwszej serii badań na pożywce ŻUKOWa rozkładał całkowicie kwas glutaminowy, glicynę i argininę oraz częściowo tyrozynę i cystynę po 96 godzinach obserwacji (tablica VI). W pożywce LEDERBERGa arginina, kwas glutaminowy i glicyna znikały zupełnie z podłoża po 48 godzinach, zaś tyrozyna oraz częściowo fenyloalanina po 96 godzinach hodowli pod wpływem badanego szczepu Achromobacter (tablica VII). Przy stałym napowietrzaniu w trzeciej serii doświadczeń z pożywką LEDERBERGa po 8 godzinach znikał zupełnie kwas glutaminowy, zaś po 12 godzinach aeracji arginina, tyrozyna, po 24 godzinach stwierdzano zanik cystyny, glicyny oraz znikanie fenyloalaniny, waliny, leucyny i izoleucyny (tablica VIII, rysunki 6 i 7).

Szczep CXXI z rodzaju Achromobacter bez napowietrzania w pierwszej serii badań w pożywce ŻUKOWa wykorzystywał częściowo cystynę, lizynę, argininę, kwas glutaminowy i tyrozynę po 96 godzinach hodowli (tablica VI). W drugiej serii badań w pożywce LEDERBERGa obserwowano zupełne zanikanie argininy po 48 godzinach hodowli. Całkowity zanik lizyny i kwasu glutaminowego oraz silny - cystyny, tyrozyny i glicyny odnotowano po 72 godzinach obserwacji. Po 96 godzinach hodowli znikała z podłoża jeszcze tyrozyna i glicyna oraz częściowo fenyloalanina, leucyna i izoleucyna (tablica VII, rys. 5). W warunkach stałego napowietrzania z podłoża LEDERBERGa po 8 godzinach hodowli znikał zupełnie kwas glutaminowy, po 12 godzinach hodowli znikała glicyna i tyrozyna oraz częściowo cystyna, lizyna i silnie arginina, zaś po 24 godzinach napowietrzania - całkowicie

arginina i fenyloalanina oraz częściowo walina, leucyna i izoleucyna (tablica VIII i rysunek 7).

Szczep LXVIII z rodzaju Alcaligenes bez napowietrzania w pierwszej serii badań z pożywki ŻUKOWa zużywał częściowo glicynę po 96 godzinach hodowli (tablica VI). W drugiej serii doświadczeń na podłożu LEDERBERGa zużywał całkowicie kwas glutaminowy oraz glicynę po 72 godzinach obserwacji (tablica VII). Przy stałym napowietrzaniu hodowli w pożywce LEDERBERGa kwas glutaminowy i glicyna były wykorzystywane całkowicie, po 24 godzinach napowietrzania (tablica VIII).

Szczep CIII z rodzaju Escherichia bez napowietrzania w pierwszej serii badań w pożywce ŻUKOWa zużywał całkowicie cystynę po 96 godzinach hodowli (tablica VI). W drugiej serii prób w pożywce LEDERBERGa znikały zupełnie kwas glutaminowy i glicyna oraz częściowo lizyna i cystyna po 72 godzinach obserwacji (tablica VII). W warunkach stałego napowietrzania z pożywki LEDERBERGa znikała zupełnie po 8 godzinach hodowli tyrozyna, zaś po 24 godzinach częściowo cystyna i lizyna a zupełnie kwas glutaminowy i glicyna (tablica VIII, rysunek 6).

Szczep IX z rodzaju Micrococcus bez napowietrzania w pożywce ŻUKOWa wykorzystywał całkowicie kwas glutaminowy po 96 godzinach hodowli (tablica VI), a w pożywce LEDERBERGa po 48 godzinach hodowli (tablica VII). Przy stałym napowietrzaniu kwas glutaminowy znikał z podłoża już po 24 godzinach obserwacji, zaś glicyna częściowo po 48 godzinach hodowli (tablica VIII).

Szczep XLIII z rodzaju Micrococcus we wszystkich trzech seriach badań zużywał całkowicie tyrozynę i kwas glutaminowy, w warunkach statycznych czas rozkładu tych aminokwasów wynosił tu 48 godzin, zaś przy stałym napowietrzaniu - 8 godzin (tablica VI, VII, VIII i rysunek 4).

Szczep LXXIIa z rodzaju Micrococcus bez napowietrzania w pożywce ŻUKOWa zużywał częściowo argininę (tablica VI), zaś w pożywce LEDERBERGa zanik argininy był zupełny po 96 godzinach hodowli (tablica VII). W trzeciej serii badań przy stałym napowietrzaniu pożywki LEDERBERGa, arginina znikała z podłoża po 24 godzinach hodowli w pożywce zawierającej mieszaninę dziesięciu aminokwasów (tablica VIII).

Badania zapotrzebowania na aminokwasy przez laseczki z rodzaju Bacillus (szczepy XIV, LIII i LXXXVI) na pożywce ŻUKOWa i LEDERBERGa zarówno bez napowietrzania jak i przy stałym napowietrzaniu nie dały przewidzianych rezultatów

(tablice VI, VII i VIII). W badaniach chromatograficznych nie stwierdzono zaniku ani zmniejszania się plam aminokwasów dodawanych do pożywki w badanym okresie hodowli. W celu wyjaśnienia tego zjawiska wprowadzono do doświadczenia z zawiesinami laseczek dodatkowo podłoże sporządzone według receptury DISLERa. W tej pożywce źródłem azotu i węgla były badane aminokwasy w stężeniu po 1 mg/l pożywki. Wyniki hodowlane zarówno w warunkach statycznych, jak też przy stałej aeracji były ujemne. Nie stwierdzono rozkładu aminokwasów przez te bakterie. DISLER [13] na tym podłożu badał wykorzystywanie różnych aminokwasów jako źródło azotu i węgla przez Bacillus mesentericus. Wyniki jego badań wykazały, że badany drobnoustrój zużywał przy wzroście kwas asparaginowy, argininę, kwas glutaminowy, prolinę i alaninę.

Bierność badanych szczepów z rodzaju Bacillus względem substratów aminokwasowych jest interesująca i wymaga dodatkowych specjalnych badań biochemicznych. Obserwacje takie nie mieszczą się jednak w ramach przeprowadzanych doświadczeń.

Otrzymane wyniki z przeprowadzonych badań nad rozkładem aminokwasów w podłożu ŻUKOWa i LEDERBERGa w seriach bez napowietrzania przez szczepy rodzajów Achromobacter, Alcaligenes i Escherichia wyraźnie wskazują, że zużycie aminokwasów przebiegało szybciej w pożywce LEDERBERGa.

Na przebieg wykorzystywania aminokwasów obecnych w środowisku przez poszczególne szczepy bakteryjne mają wpływ różne czynniki, jak skład podłoża, obecność lub nieobecność glikozy, stężenie i obecność innych aminokwasów, dodatek substancji stymulujących rozkład aminokwasów (np. kwas nikotynowy), pH środowiska oraz pojawienie się produktów metabolizmu w czasie hodowli, które nagromadziły się w pożywce [9, 10, 11, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26].

Powolne, a często niepełne wykorzystywanie aminokwasów przez wymienione szczepy bakteryjne w pożywce ŻUKOWa uwidaczniające się najszybciej po 72 godzinach hodowli mogło być wywołane składem mineralnym podłoża i obecnością 0,5% glikozy. Można by to wytłumaczyć tym, że badane kultury zużywały najpierw glikozę i sole amonowe jako źródło węgla i azotu, a dopiero później przyswajały niektóre aminokwasy bardziej dla nich dostępne. Badania chromatograficzne wskazywały, że najczęściej całkowicie lub częściowo zużywany był kwas glutaminowy i arginina, następnie tyrozyna, glicyna, lizyna i cystyna. Typowy rozkład aminokwasów w ho-

dowli bakteryjnej w pożywce ŻUKOWa ilustruje rysunek 4, który podaje fragmenty wybranej serii badań nad rozkładem badanych aminokwasów przez wytypowane szczepy bakteryjne.

Wyniki analiz chromatograficznych z badań przeprowadzonych bez napowietrzania świadczą, że zużycie aminokwasów przebiegało lepiej w podłożu LEDERBERGa niż w pożywce ŻUKOWa. Pożywka LEDERBERGa różniła się nieznacznie od pożywki ŻUKOWa składem mineralnym podłoża oraz obecnością 0,2% glikozy i 0,05% cytrynianu sodu. Już po 48 godzinach hodowli następował widoczny, częściowy lub całkowity zanik wykazywanych chromatograficznie plam poszczególnych aminokwasów. W pożywce LEDERBERGa, na przykładzie niektórych szczepów, można było prześledzić wpływ jednych aminokwasów na przebieg wykorzystywania innych substratów aminokwasowych obecnych w pożywce.

Szczep CI z rodzaju Achromobacter w pożywce 2/1 zawierającej trzy aminokwasy zużywał całkowicie argininę po 72 godzinach hodowli, zaś kwas glutaminowy w pożywce 2/4 i glicynę w pożywce 2/5 po 96 godzinach obserwacji. Wymienione aminokwasy w pożywce 2/6, która zawierała dziesięć aminokwasów, były całkowicie wykorzystane po 48 godzinach hodowli (tablica VII, rysunek 5). W większości obserwowanych przypadków całkowicie lub częściowo znikał z pożywki kwas glutaminowy, glicyna, arginina, następnie tyrozyna, lizyna oraz fenyloalanina. To szybsze i pełniejsze wykorzystywanie aminokwasów mogło być wywołane zmniejszoną ilością glikozy oraz obecnością cytrynianu sodu w pożywce.

Wyniki uzyskane w trzeciej serii doświadczeń przeprowadzonych na pożywce LEDERBERGa przy stałym napowietrzaniu (tablica VIII) świadczą, że przyspieszony wskutek napowietrzania i mieszania, zwielokrotniony przyrost populacji bakteryjnych daje znacznie szybsze i pełniejsze zużycie aminokwasów. W tej serii stwierdzono, że najszybciej po 8 do 12 godzin napowietrzania znikał z podłoża kwas glutaminowy, arginina, tyrozyna i glicyna, następnie po 24 godzinach hodowli całkowicie lub częściowo - cystyna, lizyna, walina oraz fenyloalanina, leucyna i izoleucyna. Przebieg tego doświadczenia obrazują rysunki 6 i 7, które odnoszą się do wybranych serii badań rozkładu aminokwasów przez wytypowane do badań szczepy bakteryjne.

Stwierdzono, że wśród badanych kultur hodowlanych bez napowietrzania w pożywce LEDERBERGa (tablica VII) kwas glutaminowy zużywało 55% szczepów, glicynę 45%, argininę 36%, tyrozynę 27%, a cystynę, lizynę i fenyloalaninę 18% szcze-

pów. W warunkach stałej aeracji (tablica VIII) kwas glutaminowy wykorzystywało 63% szczepów, glicynę 45%, argininę i tyrozynę 36% oraz cystynę, lizynę i fenyloalaninę 18% szczepów. Walina, leucyna i izoleucyna były wykorzystywane częściowo przez bakterie z rodzaju Achromobacter, lecz tylko w hodowlach stale napowietrzanych (tablica VIII, rysunki 6 i 7). W hodowlach nienapowietrzanych nie stwierdzono przyswajania tych aminokwasów.

Największą część aminokwasów w pożywce całkowicie lub częściowo wykorzystywały bakterie z rodzaju Achromobacter (szczepy CI i CXXI) oraz szczep CIII z rodzaju Escherichia. Szczep CXXI w warunkach statycznych zużywał 70% dodawanych do podłoża aminokwasów, a w warunkach stałego napowietrzania 90%. Szczep CI w warunkach statycznych rozkładał 50% badanych aminokwasów, a przy stałym napowietrzaniu 90% tych substratów. Szczep CIII w warunkach statycznych wykorzystywał 40% obecnych w pożywce aminokwasów, a przy stałym napowietrzaniu 50% tych związków. Inne szczepy z badanych rodzajów Micrococcus, Alcaligenes i Achromobacter zużywały w hodowlach nienapowietrzanych od 10 do 20% obecnych w podłożu aminokwasów, zaś od 10 do 30% przy stałym napowietrzaniu.

Wyniki niepełnego wykorzystywania aminokwasów z podłoża przez szczepy wymienionych rodzajów bakterii, nawet przy stałym napowietrzaniu, nie są odosobnione. Podobne spostrzeżenia niepełnego wykorzystywania aminokwasów w swoich pracach poczynili ŻWIRBLANSKAJA [12], badając zużycie aminokwasów obecnych w podłożu przez bakterie z rodzaju Achromobacter, Flavobacterium i Bacillus. SOCHINA i BIRGER [20], BŁOCHINA i współpracownicy [21] oraz ŻUKOW [11] przy badaniu zapotrzebowania na aminokwasy przez bakterie chorobotwórcze przewodu pokarmowego stwierdzili podobne zjawiska. DISLER [13] i MALCEVA [27] w badaniu zużycia aminokwasów obecnych w pożywkach przez niektóre gatunki rodzaju Bacillus zaobserwowali również niecałkowite wykorzystanie substratów aminokwasowych w czasie wzrostu kultur tego rodzaju bakterii. JURSIK [2] badając zużycie aminokwasów przez mieszane populacje bakteryjne osadu czynnego i złóż biologicznych stwierdził, że ubytek aminokwasów w odpływach po osadzie czynnym wynosił 41%, zaś po złożach biologicznych 53%. Na podstawie obserwacji własnych w porównaniu z informacjami z literatury można stwierdzić, że tylko nieliczne szczepy bakteryjne mają zdolność wykorzystywania większej liczby aminokwasów obecnych w podłożu.

Przeprowadzone badania wskazują, że badane drobnoustroje rodzajów Achromobacter, Escherichia, Alcaligenes i Micrococcus w warunkach stałego napowietrzania wykorzystywały całkowicie z badanych dziesięciu aminokwasów kwas glutaminowy, glicynę, argininę, tyrozynę, lizynę i cystynę. Bakterie z rodzaju Achromobacter zużywały oprócz tego częściowo walinę, fenyloalaninę, leucynę i izoleucynę. Ta właściwość wykorzystywania aminokwasów występujących wolno lub w układach polipeptydowych w ściekach garbarskich z moczenia oraz wapnienia i płukania po wapnieniu skór przez drobnoustroje wyosobnione z tych środowisk, może odgrywać praktyczną rolę w procesie biologicznego oczyszczania tych ścieków.

Stwierdzone w powyższych badaniach własności przyswajania i rozkładu omawianych aminokwasów przez szczepy bakteryjne wyizolowane ze ścieków garbarskich mają charakter opisowy. Byłoby również interesujące powiązanie tych procesów metabolicznych z budową chemiczną i charakterem badanych aminokwasów. Udało się stwierdzić, że niektóre aminokwasy, na przykład kwas glutaminowy, arginina i glicyna podlegały łatwemu przyswajaniu, inne zaś jak leucyna i izoleucyna były bardziej odporne na działanie tych bakterii. Intensywność przyswajania aminokwasów wyraźnie wzrastała pod wpływem napowietrzania, zgodnie z ogólnie stwierdzaną prawidłowością przyspieszania procesów tlenowego rozkładu bakteryjnego wskutek aeracji.

Trudno jednak na podstawie przeprowadzonych badań mikrobiologicznych, które nie miały charakteru systematycznych obserwacji biochemicznych i enzymatycznych, podać ściślejsze informacje o procesie dezaminacji w metabolizmie aminokwasów. Jak się wydaje obserwacje te przekraczały ramy zamierzonych badań. Przeprowadzone badania umożliwiają jednak podanie ogólnych i oczywistych wniosków. Badane aminokwasy w obecności węglowodanów, a szczególnie glikozy (pożywka ŻUKOWa i LEDERBERGa) wykazywały własności drugorzędnych substratów energetycznych i dłużej utrzymywały się w środowisku hodowlanym. Dopiero brak lub wyczerpanie się bezazotowego substratu węglowodanowego sprzyjało przyswajaniu i metabolizmowi aminokwasów.

Środowisko ścieków garbarskich zawierało głównie aminokwasowe produkty rozkładu białek pochodzących ze skór, które stanowiły surowiec technologiczny. Środowisko to sprzyjało przystosowaniu się bakterii do wykorzystywania tych

właśnie związków azotowych jako podstawowych substratów w procesach metabolicznych.

STRESZCZENIE

Badano zdolności bakterii wyosobnionych ze ścieków garbarskich do rozkładania i wykorzystywania aminokwasów występujących w tych środowiskach. Doświadczenia prowadzono na mineralnych podłożach płynnych sporządzonych według ŻUKOWa i LEDERBERGa. Pożywki te wzbogacano przez dodatek dziesięciu aminokwasów: l-cystyny, l-lizyny, l-argininy, glicyny, l-tyrozyny, dl-waliny, dl-fenyloalaniny, l-leucyny, l-izoleucyny i kwasu glutaminowego w stężeniach 0,1 mg/ml pożywki z dodatkiem 0,2 do 0,5% glikozy. Zużycie aminokwasów w hodowlach oznaczano metodą chromatografii bibułowej.

Do badań użyto szczepów bakteryjnych występujących co najmniej w 40% przeprowadzonych analiz bakteriologicznych ścieków garbarskich z moczenia oraz wapnienia i płukania skór po wapnieniu. Szczepy te należały do rodzajów Achromobacter, Alcaligenes, Escherichia, Micrococcus i Bacillus.

Badania przeprowadzono w trzech seriach. Pierwszą i drugą serię badań prowadzono w pożywkach ŻUKOWa i LEDERBERGa w hodowlach nienapowietrzanych w temperaturze 27 ± 1°C przez okres 48, 72 i 96 godzin, zaś trzecią serię w pożywce LEDERBERGa w warunkach stałego napowietrzania przez okres 8, 12, 24 i 48 godzin hodowli.

Otrzymane wyniki w pierwszej serii badań w pożywce ŻUKOWa w warunkach bez napowietrzania wskazały, że zużycie aminokwasów, całkowite lub częściowe, występowało najwcześniej po 72 godzinach hodowli, zaś w drugiej serii badań w pożywce LEDERBERGa już po 48 godzinach obserwacji. Najlepsze przyswajanie aminokwasów obserwowano w trzeciej serii badań przeprowadzonych na pożywce LEDERBERGa przy stałym napowietrzaniu hodowli: zużycie aminokwasów obecnych w pożywce było znacznie szybsze i pełniejsze, a często występowało już po 8, 12 lub 24 godzinach napowietrzania. W badaniach tych stwierdzono, że wśród użytych kultur na pożywce LEDERBERGa w hodowlach nienapowietrzanych kwas glu-

taminowy zużywało 55% szczepów, glicynę 45%, argininę 36%, tyrozynę 27%, a cystynę, lizynę i fenyloalaninę 18% szczepów. W warunkach stałego napowietrzania, kwas glutaminowy wykorzystywało 63% szczepów, glicynę 45%, argininę i tyrozynę 36% i fenyloalaninę 18% badanych szczepów.

Wykazano, że napowietrzanie hodowli nie tylko znacznie przyspiesza zużycie aminokwasów, ale również powoduje rozkład całkowity lub częściowy innych aminokwasów obecnych w pożywce, czego nie obserwowano w hodowlach nienapowietrzanych. Istnieją duże rozbieżności w zdolności przyswajania aminokwasów dawkowanych do pożywki przez szczepy bakteryjne, wytypowane do badania. Stwierdzono, że niektóre aminokwasy jak kwas glutaminowy, arginina, glicyna były szybko przyswajane, inne zaś jak leucyna, izoleucyna i walina były oporne na działanie tych bakterii.

Największą ilość aminokwasów obecnych w pożywce całkowicie lub częściowo wykorzystywały w procesie metabolizmu bakterie z rodzaju Achromobacter występujące najliczniej w badanych ściekach garbarskich. W warunkach stałego napowietrzania niektóre szczepy z rodzaju Achromobacter wykorzystywały 90% aminokwasów, dodawanych do podłoża. Szczepy innych badanych rodzajów bakterii w tych samych warunkach wykorzystywały od 10% do 50% obecnych w podłożu aminokwasów.

Politechnika Śląska
Katedra Biologii Sanitarnej

LITERATURA

[1] EFFENBERGER M., JURSIK F.: "Metabolismus bilkovin a chromatografie aminokyselin v mestskych splascich" - Vodni Hospodarstvi 6, 277 (1959).

[2] JURSIK F.: "Sledovani bilkovin a aminokyselin v odpadnich vodach" Sbornik vysoke skolny chemisko-technologicke v Praze 4, 221 (1960).

[3] SASTRY A.C., SUBRAHMANYAM P.V.R., PILLAI S.C.: "Amino acids in Treated Sewage in India" - Sew. Ind. Wastes 30, 1241 (1948).

[4] STEWARD J.: "A micro-method for performing the phenylalanine test on cultures from multi carbohydrates" - Nature 191, 521 (1961).

[5] SUBRAHMANYAM P.V.R., SASTRY C.A., RAO A.V., PILLAI S.C.: "Amino acids in sewage sludges" - J. Water Pollut. Control Federat. 32, 344 (1960).

[6] EPPS M.M.R.: "Studies on bacterial amino-acid-dekarboxylases. II. Tyrosine dekarboxylase" - Biochem. J. 38, 242 (1944).

[7] GALE E.F. and EPPS H.M.R.: "Studies an bacterial amino-acid dekarboxylase. I. (1-) lisyne dekarboxylase" - Biochem. J. 38, 232 (1944).

[8] STEPHENSON M.: "Metabolism bakterii" Izd. Inostr. Liter., Moskva (1951).

[9] KLIGLER and GROSOWITZ: "Function of nicotinic acid in bacteria metabolism" - J. Bact. 42, 173 (1944).

[10] JOHNSON R.B.: "Factors influencing the growth of Shigella dysenteriae in a synthetic medium" - J. Bact. 68, 604 (1954).

[11] ŻUKOW G.N.: "Do pytania pro azotiste żyvlenie mikrobov dezenternoj grupy" - Mikrobiołogicznyj Żurnał 24, 7 (1962).

[12] ŻVIRBLIANSKAJA A.J.: "Izuczenije metabolisma nekatorych bakterii - vreditelej pivovarenija" - Mikrobiołogija 32, 541 (1963).

[13] DISLER E.N.: "Razvitie Bacillus mesentericus na atdielnych aminokisłotach" - Mikrobiołogija 32, 981 (1963).

[14] PETRYCKA H.: "Tlenowa mikroflora bakteryjna ścieków garbarskich z moczenia i wapnienia skór" - Zesz.Nauk. Pol. Śl., Inżynieria Sanitarna 9, 3 (1966).

[15] OPIEŃSKA-BLAUTH J.: "Chromatografia" - PWN, Warszawa (1957).

[16] SALLE A.J.: "Fundamental Principles of Bacteriology" - McGraw-Hill Book Comp., Inc., New York (1961).

[17] OPIEŃSKA-BLAUTH J.: "Metody chromatograficzne w badaniach aminocydurii" - Postępy Biochemii 7, 84 (1961).

[18] LEDERBERG J.: "Isolation and Charakterisation of Biochemical Mutant of Bacteria" - Methods im Medical Research 3, 5 (1950).

[19] PELCZAR M.J.: "Quantitative Bacterial Physiology" - Burgess Publ., Minnesota (1958).

[20] SOCHINA A.M., BIRGER M.O.: "Potreblenije aminokisłot mikrobami semiejstva kisecznych" - Żurnał Mikrob. Epidem. Immun. Zeszyt 11, 82 (1961).

[21] BŁOCHINA I.N., PIETROVA R.S., ZAVPOVSKAJA I.S.: "Izmenenie aminokisłogo sostava pitatelnoj sredy v procesu rosta mikrobov kisecznoj grupy" - Żurnał Mikrob. Epidem. Immun. Zeszyt 10, 103 (1956).

[22] CHOMIK S.R., HAŁAJEV J.V.: "Glùtamino - dekarboksylazy v differencjalnoj diagnostike Salmonell i parakisecznych pałoček" - Żurnał Mikrob. Epidem. Immun. - Zeszyt 7, 60 (1959).

[23] GUNSALUS I.C., STANIER R.Y.: "Metabolism bakterii" - Inostr. Lit. Moskva (1963).

[24] McCOY T.A., PATTERSON M.K., McCLURE L.E., GRIST L.K.: "Amonoacid Metabolic Studies" - J. Bact. 66, 691 (1954).

[25] RIPPEL-BALDES A.: "Mikrobiologia ogólna" - PWRiL, Warszawa (1958).

[26] ZABŁOCKI B.: "Podstawy chemii bakteryjnej" - PWN, Warszawa (1955).

[27] MALCEVA N.M.: "Vidnosenija Bacillus megatherium do dżereł vuhlecu azotu i fosforu" - Mikrobioł. Żurnał 23, Zesz. 2, 7 (1961).

ДЕГРАДАЦИЯ НЕКОТОРЫХ АМИНОКИСЛОТ, ВЫСТУПАЮЩИХ В КОЖЕВЕННЫХ СТОЧНЫХ ВОДАХ ПОСРЕДСТВОМ БАКТЕРИЙ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ЭТОЙ СРЕДЫ

Р е з ю м е

Исследовалась способность бактерий, выделенных из кожевенных сточных вод к деградации и использования аминокислот, выступающих в этих средах. Опыты производились на минеральных жидких средах, выполненных по Жукову и Ледербергу. Эти питательные среды обогащались путем прибавки десяти аминокислот: l - цистина, l-лизина, l-аргинина, глицина, l-тирозина, dl-валина, dl-фенилоаланина, l-леуцина, l-изолеуцина и глютаминовой кислоты в концентрациях 0,1 мг/мл питательной среды с прибавкой 0,2 до 0,5% глюкоза. Употребление аминокислот в питательных средах определено методом бумажной хроматографии.

Для исследований употреблялись штаммы бактерий, выступающих не менее в 40% проведенных бактериологических анализов кожевенных сточных вод из замочки, а также кальцинирования и промывки кожи после кальцинирования. Эти штаммы принадлежали к родам Achromobacter, Alcaligenes, Escherichia, Micrococcus и Bacillus.

Исследования производились в трех сериях. Первая и вторая серия исследований производилась в питательной среде Жукова и Ледерберга в неаэрированных средах при температуре 27 ± 1°C на протяжении 48, 72 и 96 часов. Третяя серия выполнялась в питательной среде Ледерберга в условиях постоянной аэрации на протяжении 8, 12, 24, и 48 часов выращивания.

Полученные результаты в первой серии исследований на питательной среде Жукова в условиях без аэрации показали, что употребление аминокислот, полное или частичное, выступало только что после истечения 72 часов выращивания, а во второй серии исследований в питательной среде Ледербергауже после 48 часового наблюдения. Оптимальное употребление аминокислот наблюдалось в третей серии исследований, проведенных на питательной среде Ледерберга при постоянной аэрации. Употребление аминокислот, присутствующих в питательной среде, было значительно быстрым и более полным, а часто выступало уже после 8, 12 или 24-часовой аэрации. В этих исследованиях обнаружено, что между примененными штаммами на питательной среде Ледерберга в неаэрированных условиях глютаминовую кислоту употреблало 55% штаммов, глиции 45%, аргинин 36%, тирозин 27%, а цистин, лизин и фенилоаланин 18% штаммов. В условиях постоянной аэрации глютаминовую кислоту употребляло 63% штаммов, глицин 45%, аргинин и тирозин 36%, а фенилоаленин 18 исследуемых штаммов.

Указано, что аэрация культур не только значительно ускоряла употребление аминокислот, но также вызывала полную или частичную деградацию других аминокислот, содержащихся в питательной среде; этого не наблюдалось в неаэрированных культурах. Отмечалось значительные расхождения в способности употребления аминокислот, прибавляемых в питательную среду штаммами бактерий, изобранными для исследования. Пришли к заключению, что некоторые аминокислоты, как глютаминовая кислота, аргинин к глицин, быстро подвергались деградации. Другие, как леуцин, изолеуцин и валин не сопротивлялись действию этих бактерий.

Максимальное количество аминокислот, присутствующих в питательной среде, полностью или частично употреблялось в процессе метаболизма бактерий рода Achromobacter, которые выступали наиболее численно в исследуемых кожевенных сточных водах. В условиях постоянной аэрации некоторые штаммы рода Achromobacter употребляли 90% аминокислот, прибавляемых к среде. Штаммы других исследуемых родов бактерий в тех же условиях употребляли от 10 до 50% аминокислот, присутствующих в среде.

Силезский политехнический институт
Кафедра санитарной биологии

THE DECOMPOSITION OF SOME AMINOACIDS OCCURRING IN TANNERY WASTE WATERS BY THE BACTERIA ISOLATED FROM THIS ENVIRONMENT

S u m m a r y

The ability of bacteria isolated from the tannery waste waters to decompose and use of the aminoacids present in this environment have been investigated. The observations were carried out in the liquid culture media prepared according to ŻUKOW and LEDERBERG. Those media have been enriched by addition of 10 aminoacids, namely: l-cystine, l-lysine, l-arginine, glycine, l-tyrosine, dl-valine, dl-phenylalanine, l-leucine, l-isoleucine and glutamic acid. These aminoacids were used in concentration of 0,1 mg/ml of culture medium with the addition of 0,2 to 0,5 per cent of glucose. The consumption of the aminoacids from those media has been demonstrated by the paper chromatography.

The strains of bacteria used in these investigation occurred at least in 40 per cent of the performed bacteriological analyses of the soak waters and waste waters from

liming and washing of leather after liming. These strains belonged to the genera: Achromobacter, Alcaligenes, Escherichia, Micrococcus and Bacillus.

The investigations were carried out in three series. The first and second series were performed with the ŻUKOW's and LEDERBERG's culture media at the temperature of 27 ± 1 °C during 48, 72 and 96 hours of cultivation without aeration. The third serie of observation with LEDERBERG's culture medium was performed in conditions of continuous aeration during 8, 12, 24 and 48 hours of cultivation.

The results obtained from the first serie of these investigations with ŻUKOW's medium have shown that the total or partial consumption of aminoacids occurred after 72 hours of cultivation. In the second serie it was already reached after 48 hours of observations. The best utilisation of aminoacids was observed however, in the third experimental serie with LEDERBERG'S medium at a continuous aeration of culture. The aminoacids consumption in these conditions was far more rapid and complete. It occurred usualy after 8, 12 or 24 hours of aeration.

It was found in observations with LEDERBERG's culture medium with out aeration that 55 per cent of isolated bacterial strains were able to use glutamic acid; 45 per cent - glycine; 36 per cent - arginine; 27 per cent - tyrosine and 18 per cent - cystine, lysine and phenylalanine.

In conditions of constant aeration glutamic acid has been consumed by 63 per cent of the strains used; glycine by 45 per cent; arginine and tyrosine by 36 per cent and phenylalanine by 18 per cent of the bacterial strains.

It was indicated that the constant aeration of bacterial culture accelerated the aminoacids consumption and caused a total or a partial decomposition of other aminoacids present in the medium. This phenomenon was not observed in the cultivations without aeration. Some substantial differences of aminoacids utilisation by the bacterial strains under investigation were observed.

It was found that some aminoacids such as glutaminic acid, arginine and glycine were readily used but the other such as leucine, isoleucine and valine were resistible to the action of those bacteria.

The greatest number of aminoacids present in the culture media has been totally or partialy consumed in metabolism of Achromobacter genus bacteria, which occurred in largest numbers in the tannery waste waters. In the conditions of constant aeration some strains of the genus Achromobacter used 90 per cent of aminoacids added. Some other strains of bacteria in the similar conditions were able to consume from 10 to 50 per cent of aminoacids present in culture media.

Silesian Technical University
Laboratory of Sanitary Biology