Badania nad mikroflorą mleka polskich. (Recherches sur la microflore des laits polonais).

Napisała

MARJA BURBIANKA.

Z pośród licznych przemian, zachodzących w mleku pod wpływem działania bakterij, jedną z najbardziej znanych jest fermentacja cukru mlecznego, przyczem powstały przy tem kwas mlekowy powoduje ścinanie się sernika, czyli t. zw. samorzutne zsiadanie się mleka.

Według najdawniejszych pojęć uważano, że proces ten odbywa się pod wpływem kazeiny, której nadawano własności enzymu. Dopiero Pasteur ustalił w r. 1857, że tym czynnikiem wywołującym fermentację jest pewien żywy organizm, który nazwał „*ferment lactique*“.

Pierwsze czyste kultury bakterij kwasu mlekowego zostały wyodrębnione przez Lister'a (9) w roku 1878 i opisane pod nazwą *Bacterium lactis acidi*, jako podwójne, nieruchome małe pałeczki, nie tworzące spor, Gramdodatnie.

Dalej Hüppe (6) podaje opis wyizolowanej przez niego z kwaśnego mleka bakterji, która ścinała mleko w przeciągu 15 - 24 godzin z wytworzeniem gazu. Jest to nieruchliwa pałeczka $1-1.7 \mu \times 0.3-0.4 \mu$, Gramujemna, nazwana przez Hüppe'go *Bact. acidi lactici*.

W roku 1885 Escherich (3) znalazł w przewodzie pokarmowym ludzi i zwierząt pewien gatunek wytwarzający kwas mlekowy. Opisane przez niego pod nazwą *Bacterium lactis aërogenes* bakterje, uważa jednak za identyczne z *Bacterium acidi lactici* Hüppe'go, pomimo znacznych różnic morfologicznych i fizjologicznych.

Dalsze badania w tym kierunku prowadzą Günther i Thierfelder (4), Grotenfelt (5), Leichmann (10), Weigmann (19) i cały szereg innych badaczy, którzy przeważnie opisują bakterje należące do jednego typu, nadając im jednakże różne nazwy.

Obecnie ustalił się pogląd, że głównym czynnikiem przy fermentacji cukru mlekowego w mleku są bakterje, które Löhnis (8) łączy pod nazwą *Streptococcus lactis* Lister, Beijerinck (1) pod nazwą *Lactococci*, a Weigmann (20) podaje pod zbiorową nazwą *Streptococcus lacticus*. Są to opisane przez Listera, Leichmanna, Günthera, Thierfeldera i innych bakterje, które występują w postaci pojedynczych i podwójnych krótkich pałeczek, które się układają także i w łańcuszki; spor nie tworzą, są nieruchome, Gramdodatnie i powodują rozkład cukru mlekowego z wytworzeniem tylko prawoskrętnego kwasu mlekowego według wzoru

Drugą, podrzędniejszą rolę przy ścinaniu się mleka stanowią bakterje typu *Bacterium acidi lactici* Hüppe, które przy rozkładzie cukru wytwarzają oprócz kwasu mlekowego kwas octowy i inne poboczne produkty, jak ślady alkoholu etylowego, CO_2 , H_2 i t. p., przyczem są Gramnegatywne.

Zadaniem tej pracy było zbadanie, czy bakterje, biorące główny udział w procesie ścinania się mleka polskich, są identyczne z opisywanymi dla mleka w środkowej, zachodniej i północnej Europie i oznaczenie ich cech.

Jako źródła dla izolowania tych ostatnich używane były mleko krowie i śmietana, których liczne próbki pobierano z różnych okolic Warszawy i innych miejscowości Polski w ciągu całego roku. Jako pożywki dla wyodrębniania bakterij służyły żelatyna i agar na serwatce, otrzymanej ze świeżego odtłuszczonego mleka przez ścięcie sernika zapomocą podpuszczki. Do szalek z agarem i żelatyną dodawano CaCO_3 w celu łatwiejszego uwidocznienia kolonij, wytwarzających kwas. Wyodrębnione ze śmietany i kwaśnego mleka bakterje, były przeszczepiane na sterylizowane mleko i pod uwagę brano tylko te kultury, które ścinały je conajmniej w ciągu 5—7 dni w $t^0 25^0$.

W celu porównania wyizolowane szczepy były następnie przenoszone na następujące pożywki:

Agar na wodzie + 2% laktozy + 1% peptonu; żelatyna + 2% laktozy + 1% peptonu, marchew, kartofle, serwatka.

Do wyodrębniania bakterij używane było mleko kwaśne 1-o, 2 u, 4-o, 6-cio dniowe, a także takie, które stało dłuższy czas, 7—14 dni. Przytem robione były badania nad takim, które się ścięło w t^0 pokojowej, a również i w temperaturach 26^0 , 30^0 i 35^0 C .

W $t^0 35^0$ występowały tylko bakterje typu *Aërogenes*, *Coli* i im pokrewne, które zwykle mleka w ciągu kilkunastu godzin nie ścinały.

W mleku zsiadłem w t⁰ pokojowej, w 25⁰ a pocześci i w 30⁰ C, a także w śmietanie, występował tylko jeden typ bakterij: Gram-dodatnie, pojedyncze i podwójne pałeczki, układające się też i w łańcuszki, w których przybierają czasem postać więcej okrągłą.

Na żelatynie (szalka) tworzą małe białe kolonie, rozpuszczające CaCO₃. Pod mikroskopem kolonie te są żółte o brzegach równych, okrągłe, o równomiernej ziarnistości. Wzrost powolny. Na agarze kolonie głębiej położone — soczewkowate, powierzchniowe okrągłe. Na żelatynie wzrost równomierny wzdłuż nakłucia, na powierzchni lekki nalot. Na agarze skośnym wzrost słaby, po kilku dniach dopiero biała kolonia sucha, o brzegach równych. Na pożywkach z serwatką wzrost szybszy niż na podłożach bezserwatkowych. Na marchwi i kartoflach nie rosną. Mleko sterylizowane ścinają w t⁰ 25⁰ w przeciągu 17—24 godzin, w postaci jednolitej galaretowatej masy. Nie tworzą gazu.

Opierając się na tem, że jedne typy występują głównie w postaci pojedynczych i podwójnych pałeczek, inne łańcuszków, a inne jeszcze tworzą normalnie obok pojedynczych i podwójnych pałeczek również łańcuszki, można było rozróżnić 3 szczepy, które oznaczymy Nr. I, II, III. Do późniejszych doświadczeń były użyte trzy typy szczepu I, Nr. Ia wyizolowany z siadłego mleka, Ib i Ic ze śmietany; szczep Nr. II ze śmietany i dwa typy szczepu Nr. III, III a i III b z mleka.

Poniższa tabelka podaje rozmiary wyizolowanych szczepów, ponieważ różnią się one prawie wyłącznie rozmiarem od typów bakterij mlecznych w literaturze opisywanych.

Rozmiar w μ żywych bakterij, użytych do doświadczeń:

Nr. Ia	Ib	Ic	II	III a	III b
1'25—1'65 0'80—1'25	1'25—1'65 0'80—1'25	1'25—1'65 0'80—1'25	1'85—2'10 0'80	1'00—1'45 0'80—1'25	1'25—1'65 0'80—1'25
pojedyncze i podwójne			łańcuszki	pojedyncze, podwójne i łańcuszki	

Wyodrębnione bakterje można zatem uważać za jedne z przedstawicieli typu *Streptococcus lactis* (Lister) Löhnis, inaczej *Bacterium lactis acidi* Leichmann, gdyż tak pod względem morfologicznym, jak zwłaszcza fizjologicznym, odpowiadają opisanym pod tą nazwą bakterjom. Różnica polega właściwie jedynie na wydłużonej

ich postaci, zbliżonej więcej do „*Bacterium*“ niż do „*Coccus*“, zwłaszcza w typie II.

Co do ilości wytwarzanego przez typowe bakterie kwasu mlekowego, dotychczasowe badania wykazały cyfry bardzo nieznaczne, gdyż już niewielka jego zawartość w pożywce wpływa hamująco na rozwój i własności fizjologiczne bakterji.

Timpe (17) w swych doświadczeniach z *Bacterium acidi lactici* Hüppe wykazał, że jeden i ten sam szczep zależnie od podłoża, na którym jest hodowany, wytwarza różne ilości kwasu. W obecności ciał neutralizujących, jak np. fosforanów i kazeiny, ilość kwasu w mleku dochodziła do 0·6%, podczas gdy na pożywce zawierającej 5% cukru i sól amonową, jako źródło azotu, nie przekraczała 0·04%.

Wyizolowany przez Schweitzera (14) z kwaśnego mleka gatunek, wytwarza w sterylizowanym mleku 0·585% kwasu mlekowego. Bakterje te identyfikuje Schweitzer z opisanym przez Günthera i Thierfeldera typem. Tymczasem Schierbeck (13) podaje 0·7% kwasu dla znalezionej w mleku *Bacterium Güntheri*. Według Rahn'a (12) 0·5% wpływa wyraźnie hamująco na dalszy rozwój *Bacterium lactis acidi*.

Według Dam'a (2) proces fermentacyjny zostaje wstrzymany, gdy koncentracja kwasu mlekowego dochodzi do 0·01 n. Co do ilości jonów wodorowych, które wpływają hamująco na dalszy rozwój bakterji kw. mlekowego, według Dam'a liczba granicznego stężenia waha się w granicach 10 do 20×10^{-5} .

Svanberg (16) jako graniczną wartość Ph dla *Streptococcus lacticus* podaje Ph = 3·5. Dalszy wzrost bakterji, według niego, przy tej wartości już nie może się odbywać.

Podobne cyfry podają Virtanen, Wichmann i Lindström (18), którzy stwierdzili, że rozwój *Streptococcus lacticus* ustaje przy Ph = 4·1, podczas gdy zdolność do rozkładu cukru dopiero przy Ph = 2·9.

Knudsen i Sorenson (7) znaleźli, że jeden i ten sam szczep, zaszczipiony na mleku tego samego pochodzenia, wytwarzał 0·84% kwasu mlekowego, podczas gdy na mleku innego pochodzenia 0·66%. Ph w obu wypadkach wynosiło 4·3. Drugi szczep streptokokków mlecznych wykazywał jeszcze większe różnice, mianowicie 0·78% i 0·42% przy Ph = 4·5 i Ph = 4·6, czyli, że ilość kwasu jest zależna od składu mleka.

Makrinow (11) podaje dla *Bacterium lactis acidi* Leichmann 0·9% kwasu w mleku.

Własne doświadczenia.

Ilość wytwarzanego kwasu.

Z pośród wyodrębnionych z wszystkich badanych prób mleka bakterij typu *B. lactis acidii* Leichmann użyto do bliższego poznania ich kwasotwórczości 6 szczepów.

Ilość wytwarzanego przez bakterje kwasu była obliczana na 3 rodzajach pożywek.

1) Na mineralnej o składzie 0·03% KH_2PO_4 , 0·01% NaCl , 0·01% MgSO_4 , 0·1% peptonu i 3·5% cukru mlecznego.

2) Na serwatce, którą otrzymano przez ścięcie świeżego mleka zapomocą podpuszczki.

3) Na sterylizowanym mleku.

Do doświadczeń posługiwano się kolbami o pojemności 100 cm^3 , do których wlewano po 50 cm^3 pożywki. Ilość kwasu mierzono za pomocą miareczkowania $\frac{1}{20}$ n NaOH przy użyciu fenoltaliny jako wskaźnika; przytem od ogólnej ilości cm^3 NaOH , które zostały zużyte na zmiareczkowanie kwasu, odejmowano ilość cm^3 NaOH , użytych na zmiareczkowanie pożywki w kolbce kontrolnej (niezaszczepionej). Tam, gdzie do pożywek był dodawany CaCO_3 , jako środek neutralizujący, wytwarzający się kwas mlekowy określano w sposób następujący: Po ukończonej fermentacji na mleczan wapnia działano kwasem szczawiowym do kwaśnej reakcji

Na sączku pozostał nierozpuszczalny szczawian wapnia, a w roztworze kwas mlekowy i nadmiar kwasu szczawiowego. Celem usunięcia tego ostatniego, gotowano przesącz z ZnCO_3 do reakcji obojętnej i znowu sączono.

rozpuszczalny na gorąco mleczan cynku — przechodził do roztworu, nadmiar ZnCO_3 i szczawian cynku pozostawały na sączku

Znajdujący się w roztworze mleczan cynku, po odparowaniu przesącza do małej objętości, wykrystalizował na zimno w postaci białego krystalicznego osadu. Po odsączeniu osad spalono i ilość kw. mlekowego obliczono z ilości ZnO .

Jednocześnie wykonywano określenia kontrolne, które właściwie miały znaczenie tylko przy serwatce, i znaną ilość kwasu mlekowego w kontrolnej serwatce odejmowano od ogólnej sumy.

I Doświadczenie.

Większą ilość kolbek z pożywką mineralną wzgl. z serwatką zaszczepiono jednocześnie jednakową ilością płynnej kultury (1 cm^3 kultury na 50 cm^3 pożywki). Jako materiał wyjściowy służyła płynna pożywka mineralna, do której przeniesiono oczko igły platynowej bakterij z kultury żelatynowej i którą zostawiono przez 48 godzin w $t^0 25^0$. Zaszczepione kolbki z pożywką mineralną i serwatką wstawiono do termostatu o $t^0 25 - 27^0$. Najprzód codziennie, a potem co kilka dni brano po 2 kolbki dla określenia ilości kwasu zapomocą miareczkowania. Jednocześnie do kilku kolbek dodano CaCO_3 , w których ilość kwasu obliczano dopiero po ukończonej fermentacji.

Tabela I przedstawia przebieg fermentacji na pożywce „mineralnej” w doświadczeniu ze szczepem Nr I b. Przyrost kwasu na pożywce tej jest nierównomierny; w jednych kolbkach fermentacja jest ukończona już po 3 dniach, podczas gdy w innych po 10-ciu nie dobiegła do końca. Można to tłumaczyć tem, że na tej pożywce bakterje wogóle bardzo źle rosną, więc chociaż przy szczepieniu starano się wprowadzać jednakowe ilości bakterij, mogło się jednak zdarzyć, że do jednej kolbki trafiło więcej żywych bakterij, do innych mniej, tak, że dalszy rozwój odbywał się mniej więcej w ten sposób, jak to obserwowano przy zastosowaniu pożywek „mineralnych” dla drożdży.

Na serwatce znacznie lepszy wzrost, już po 5 dniach osiągnięte jest maximum kwasu, poczem następuje spadek jego przez zużycie go. Ilość wytworzonego na serwatce kwasu jest zawsze większa niż na „mineralnej” pożywce. O ile przyjmiemy dla Nr. I b ilość kwasu wytworzoną na pożywce mineralnej odpowiadającą 3.4 i $3.5\text{ cm}^3/20\text{ n NaOH}$, wyniesie to w gramach 0.0155 kwasu mlekowego, na serwatce zaś 22.5 , 22.3 , $22.2\text{ cm}^3/20\text{ n NaOH}$, co odpowiada 0.1003 gr kwasu mlekowego, a zatem na serwatce 6—7 razy więcej.

Tabela II przedstawia przebieg fermentacji w doświadczeniu z szczepem Nr. III a. Szczep ten wykazuje wzrost na pożywce mineralnej bardziej równomierny; maximum osiągnięte po 2-ch dniach, na serwatce po 6 dniach. Przyjmując maksymalną ilość kwasu wytworzoną przez Nr. III a na pożywce mineralnej, odpowiadającą 5.8 , 5.3 i $6.5\text{ cm}^3/20\text{ n NaOH}$, i obliczając ze średniej odpowiadającą ilość kwasu mlekowego, otrzymamy 0.0264 gr . Na serwatce natomiast 39.6 cm^3 , 39.5 i $39.4\text{ cm}^3/20\text{ n NaOH}$ odpowiada 0.1777 gr kwasu mlekowego. Szczep zatem ten (III a) wytwarza tak na „mineralnej” pożywce, jak i na serwatce o mniej więcej 60% kwasu mlekowego, więcej niż poprzedni szczep (I b).

Tabela I.

Ilość $\text{cm}^3 \frac{1}{20} n$ NaOH zużytych do zmiareczkowania 50 cm^3 pożywki.

Szczep Nr. Ib.

Ilość dni	Mineralna		Serwatka	
	$\text{cm}^3 \text{ NaOH}$		$\text{cm}^3 \text{ NaOH}$	
1	1·7 2·1	1·9	9·6 13·0	11·3
2	3·2 1·7	2·45	15·4 19·9	17·65
3	3·6 5·2	2·44		
4	1·7 2·5	2·1	21·6 20·2	20·9
5	3·7 1·7	2·7	22·5	22·5
7	2·5 2·0	2·25	22·3 22·2	22·25
12	5·3 2·7	4·0	21·5 21·6	21·55
16	3·4 3·5	3·45	21·0 20·9	20·95

Tabela II.

Ilość $\text{cm}^3 \frac{1}{20} n$ NaOH zużytych do zmiareczkowania 50 cm^3 pożywki.

Szczep Nr. III a.

Ilość dni	Mineralna		Serwatka	
	$\text{cm}^3 \text{ NaOH}$		$\text{cm}^3 \text{ NaOH}$	
1	3·6 5·4	4·5	19·5	19·5
2	5·2 6·8	6·0	24·8 25·5	25·15
4	5·5 5·3	5·4	38·8 38·6	38·7
6	5·4 5·3	5·35	39·6 39·5	39·55
9	5·3 5·8	5·55	39·5 39·5	39·5
12	5·3 6·5	5·9	39·4 39·4	39·4
23	5·3 5·3	5·3		

Ponieważ te liczby nie zgadzają się z dotąd przez różnych autorów w innych krajach podawanymi ilościami kwasu mlekowego dla typu *Bacterium lactis acidi*, wprowadzono pewną modyfikację.

II Doświadczenie.

Zaszczepiono równorzędnie po 3 kolbki z pożywką mineralną, po 3 kolbki z serwatką i po 3 próbówki, z których każda zawierała 10 cm^3 mleka sterylizowanego. Zaszczepione kolbki zostawiono

w t^o 25 – 27^o aż do ukończenia fermentacji. Pożywa mineralna i serwatka na przeciąg 10–15 dni, mleko 7 dni. Wynik doświadczenia przedstawia tabela III.

Tabela III.

Nr. szczepu	Ilość kw. mleko- wego w ‰		Ilość kw. mleko- wego w ‰ przy dodatku CaCO ₃		Ilość kw. mlekow. w ‰ w mleku	Ph			
	Serwatka	Mineralna	Serwatka	Mineralna		Serwatka		Mineralna	
						Początkowe	ońcowe	Początkowe	ońcowe
I a	0·256	0·088			0·606	6·17	3·43	6·22	3·50
I b	0·233	0·088	3·154	0·110	0·566	6·10	4·70	6·50	4·8
I c	0·172	0·084			0·638	6·17	3·41	6·22	3·68
II	0·238	0·047				6·17	4·51	6·22	4·41
III a	0·355	0·074	1·701	0·112	0·587	6·50	4·10	6·28	4·30
III b	0·253	0·074			0·587	6·17	4·14	6·22	4·30

Widzimy, że najmniej kwasu było wytworzone na pożywce mineralnej, więcej na serwatce, a najwięcej na mleku. Można to tłumaczyć obecnością w serwatce i mleku różnych ciał, wiążących wolny kwas, jak np. białka, fosforany itp., i tem umożliwiającących jego produkcję. Wbrew oczekiwaniom, w kolbkach, które zawierały CaCO₃, nie został sfermentowany cały cukier, lecz fermentacja ustała przy niedużej ilości kwasu mlekowego. Mianowicie na mineralnej 0·1‰, na serwatce w jednym wypadku 1·7‰, w drugim 3·1‰ kwasu. Można to tłumaczyć tem, że na zimno nie cały kwas mlekowy zostaje związany wapniem i pozostaje część wolnego kwasu w roztworze, który wpływa hamująco na dalszą fermentację. Celem sprawdzenia tego przypuszczenia określano Ph w kolbkach kontrolnych z CaCO₃ niezaszczepionych i zaszczepionych, w których fermentacja odbywała się przez 7 dni. Okazało się, że w tych ostatnich odczyn był kwaśniejszy (wynosił Ph = 6·7) niż w kontrolnych (Ph = 7·16), mimo nadmiaru CaCO₃. Zawsze więc czynnikiem hamującym wzrost bakterij jest zbyt duża wytworzona kwasowość, gdyż wartości Ph na mineralnej pożywce i serwatce są prawie jednakowe.

Ilość wytworzonego kwasu na mineralnej pożywce nie przekracza 0·1‰ (taka ilość nie ścina sterylizowanego mleka). Na serwatce różnice koncentracji kwasu mlekowego są znacznie większe, gdyż wahają się

od 0.17% do 0.35%. Widocznie zależne jest od składu serwatki, wzgl. od większej lub mniejszej ilości ciał w niej neutralizujących. Ilość kwasu na mleku sterylizowanym waha się w granicach 0.56% do 0.60%. Kultury, które przez dłuższy czas były hodowane na żelatynowych lub agarowych pożywkach, po pewnym czasie znacznie słabiej zakwasały, niż ten sam szczep świeżo z mleka wyizolowany. Tak np. bakteria oznaczona Nr. V a w marcu 1930 r. wytworzyła 0.0513 gr. kwasu mlekowego, a w maju tegoż roku w tych samych warunkach wytworzyła już tylko 0.0106 gr.

Robione były próby doszczepiania do kolbek tych samych bakterij, lecz najmniejszego rozwoju, czy przyrostu kwasu nie można było zauważyć.

W celu zbadania, jak szybko przebiega fermentacja w zależności od ilości wprowadzonych bakterij, zaszczepiono większą ilość kolbek z pożywką mineralną różnemi ilościami płynnej kultury: 5 cm³, 0.25 cm³, 0.1 cm³, 10 oczek, 5 oczek, 2 oczka, 1 oczko.

Jako materiał wyjściowy służyła kolbka z pożywką mineralną, którą po zaszczepieniu oczkiem igły platynowej bakterij z żelatyny zostawiono na 24 godziny w t° 25°.

Ilość kwasu obliczano zapomocą miareczkowania na początku codziennie, a potem co dwa dni. Wyniki otrzymane po 24 godzinach wykazywały duże różnice w zależności od ilości wprowadzonej kultury. Np. przy 5 cm³ zużyto na zmiareczkowanie kwasu 7.95 cm³ 0.20582 n NaOH, przy 0.1 cm³ — 4.6 cm³ NaOH 1 oczko — 4.2 cm³ NaOH, lecz już po 3—4 dniach nastąpiło wyrównanie, wobec czego szczegółowych wyników tutaj nie przytaczam.

Wpływ temperatury i stężenia cukru.

W celu zbadania jaki wpływ ma temperatura i stężenie cukru na szybkość wytwarzania się kwasu mlekowego, zrobione były pożywki zawierające 0.1% peptonu i następujące ilości cukru: 0.5%, 1%, 1.5%, 2.0% i 2.5%, 3% i 3.5% laktozy, 2% glukozy, 2% galaktozy i glukoza + galaktoza w ilościach odpowiadających 2% cukru mlekowego. Zaszczepiono 48-godziną płynną kulturą na 2%-owym roztworze cukru mlekowego + 0.1% peptonu, biorąc po 0.5 cm³ na 50 cm³ pożywki. Zaszczepione kolbki zostawiono w temperaturze 25° i równorzędnie taka sama ilość z takimi samymi koncentracjami cukru była wstawiona do termostatu o t° 30° i 35°. Po dwóch dniach fermentację przzerwano zapomocą ogrzania do t° wrzenia, a ilość wytworzonego kwasu oznaczono zapomocą miareczkowania. Do-

świadczenie w t° 30° zepsuło się więc wyniki będą podane z 25° i 35°. Z danych na tablicy IV, widzimy, że w t° 25° ilość wytworzonego kwasu zwiększa się w miarę wzrastania koncentracji cukru, aż do 2% laktozy, gdzie osiąga swoje maximum ($4.17 \text{ cm}^3 \frac{1}{20} \text{ NaOH}$). Od 2.5% laktozy do 3.5% laktozy, ilość kwasu spada, czyli w t° 25° najodpowiedniejsza koncentracja laktozy dla najszybszej fermentacji jest 2%. Tymczasem w 35° maksimum kwasu jest osiągnięte przy 2.5% laktozy.

W t° 25° wzrost na glukozie jest lepszy niż na galaktozie, gdy w t° 35° jest odwrotnie. Jeżeli porównamy ilość kwasu wytworzonego na 2% laktozy i na glukozie + galaktozie, chociaż różnice są nieznaczne, jednak fermentacja szybciej przebiega na 2% laktozy, niż na glukozie + galaktozie, odpowiadającym 2% laktozy, pomimo, że w pierwszym wypadku muszą zajść 2 procesy: 1) rozkład laktozy na cukry proste i 2) rozkład heksozy na kwas mlekowy, kiedy w drugim wypadku ten I proces nie zachodzi.

W tablicy V są podane wyniki analogicznego doświadczenia, tylko zamiast 0.1 peptonu, było dodane 0.5% i fermentacja odbywała się w t° 25° i 30°. W tym wypadku do doświadczenia był użyty szczep Nr. III a.

Podobnie jak doświadczenie ze szczepem Nr. I c w t° 35 maksimum kwasu jest osiągnięte przy 2.5% laktozy, podczas gdy w t° 25° sądząc z Ph, najwięcej kwasu powinno być osiągnięte również przy 2.5% laktozy, jednak ilość $\text{cm}^3 \text{ NaOH}$ wskazuje co innego. Mianowicie przy 25° ilość kwasu wzrasta w miarę koncentracji laktozy.

Wzrost na glukozie w obu temperaturach jest lepszy niż na galaktozie. Ilość kwasu na 2% laktozy w t° 25° i 30° jest większa niż na glukozie + galaktozie, podobnie jak w doświadczeniu z uprzednim szczepem.

Streszczenie.

1. W badanych 63 próbkach mleka z różnych okolic Polski stwierdzono zawsze bakterje typu *Bacterium lactis acidii* Leichmann jako główne czynniki samorzutnego ścinania się mleka; nie we wszystkich próbkach stwierdzono i inne typy gazujące.

2. Dominujące bakterje typu *B. lactis acidii* były Gram +, nieruchliwe, niegazujące, odbiegały jednak morfologicznie cokolwiek od pod powyższą nazwą opisywanego typu średnio-, zachodnio- i północno-europejskiego, jak wynika bowiem z licznych pomiarów tak żywych jak zabarwionych bakteryj, są one dłuższe, zbliżone postacią komórki do rodzaju *Bacterium* niż do *Streptococcus*. Najczęściej wy-

Tabela IV.

Szczep Nr. 1c.

25° C					35° C			
Ilość cm ³ NaOH zużytych na zo- bojętnienie 40 cm ³ pożywki	Średnio cm ³ NaOH	Ph	Średnia Ph	Stężenie cukru	Ilość cm ³ NaOH	Średnio cm ³ NaOH	Ph	średnia Ph
2·5 2·2 3·3	2·66	4·14 4·14 3·90	4·06	0·50% laktozy	1·75 1·65 2·5 1·5	1·85	4·22 4·29 3·90 3·81	4·05
3·8 4·1 4·5	4·13	3·81 3·81 3·81	3·81	1·0% "	2·9 1·3 1·35	1·85	4·47 3·99 4·47	4·31
2·4 3·6	3·0	3·81 3·99	3·90	1·50% "	1·3 2·8	2·05	3·88 4·70	4·32
4·0 4·0 4·1 4·6	4·17	3·81 3·81 3·72 3·72	3·76	2·00% "	2·6 2·7 2·8 1·68	2·89	4·22 3·90 3·99 3·81	3·98
3·7 4·0 4·0	3·9	3·81 3·72 3·72	3·75	2·50% "	4·0 4·0	4·0	3·64 3·72	3·68
4·4 1·4	2·9	3·81 4·47	4·14	3·00% "	1·7 2·3	2·0	3·99 4·14	4·06
4·5 1·7 1·5 4·0	2·92	4·14 4·47 3·99 3·81	4·10	3·50% "	1·3 1·6	1·45	4·65 4·21	4·43
3·1 3·3 3·7 3·68	3·44	3·71 3·81 3·81 3·72	3·76	2·00% glikozy	1·2 1·25 2·0	1·48	4·46 4·47 4·29	4·40
2·35 2·3 2·3 2·8	2·87	3·93 3·99 4·14 4·07	4·03	2·00% galaktozy	2·0 1·8 1·5 2·0	1·82	4·15 4·14 4·65 4·14	4·27
3·9 4·0 4·0 3·8	3·9	3·81 3·72 3·81 3·81	3·79	glikoza + galaktoza	1·2 1·2 1·2 1·1	1·18	4·34 4·65 4·65 4·65	4·57

Tabela V.

25° C				30° C			
Ilość cm^3 NaOH zużytych na zo- bojętnienie 40 cm^3 pożywki	Średnia cm^3 NaOH	Ph	Średnie Ph	Stężenie cukru	Ilość cm^3 NaOH	Średnia cm^3 NaOH	Ph Średnie Ph
9·09 8·99 10·11	9·39	4·29 4·20	4·24	1·0 $\frac{0}{0}$ laktozy	9·87 9·97 9·57	9·8	4·10 4·14 4·10
10·22 10·32 10·42	10·32	4·14 4·10 4·14	4·12	1·5 $\frac{0}{0}$ "	10·69 10·89 10·79	10·79	4·06 3·99 4·04
10·01 10·11 10·11	10·07	4·14 4·14 4·14	4·14	2·0 $\frac{0}{0}$ "	10·48 10·28 10·18	10·31	4·04 4·06 4·06
10·42 13·18 10·22	11·27	4·08 3·85 4·08	4·0	2·5 $\frac{0}{0}$ "	12·22 10·99 13·23	12·14	3·99 3·99 3·90
10·62 13·08 11·03	11·57	4·10 3·99 4·08	4·05	3·0 $\frac{0}{0}$ "	11·2 11·4 11·2	11·26	3·99 3·99 3·99
11·03 13·08 11·24	11·79	4·10 3·99 4·10	4·06	3·5 $\frac{0}{0}$ "	10·89 11·2 10·99	11·02	3·99 4·08 4·10
10·11 8·58 8·68	9·12	4·29 4·20 4·29	4·26	2 $\frac{1}{0}$ glikozy	8·75 9·06 9·16	8·99	4·14 4·14 4·10
5·11 4·08 4·29	4·49	4·65 4·70 4·65	4·66	2 $\frac{1}{0}$ galaktozy	5·09 4·88 4·88	4·95	4·65 4·70 4·65
10·01 9·81 9·6	9·8	4·14 4·10 4·14	4·12	glikoza + galaktoza	9·67 9·77 9·57	9·67	4·14 4·10 4·14

stępowały typy o rozmiarze $0.8-1.25 \times 1.25-1.65 \mu$, rzadziej o jeszcze wybitniejszym kształcie pałeczkowym, $0.8 \times 1.85-2.10 \mu$, przy czym występowały przeważnie pojedynczo i we dwóinkach, formy natomiast dłuższe tworzyły zwykle wyraźne łańcuszki.

3. Do bliższych badań użyto 3 szczepy, różniące się sposobem wzrostu, a mianowicie szczep I nie tworzący nigdy łańcuszków, szczep II występujący zawsze w łańcuszkach i szczep III tworzący tak jedyńki i dwóinki, jak i łańcuszki.

4. Ilość wytworzonego kwasu mlekowego prawoskrętnego przez badane bakterie zależna jest od składu pożywki, t. zn. od ilości zawartych w pożywkach substancji kwas wytwarzany neutralizujących; na pożywkach „mineralnych“ z 0.1% peptonu przy 4.5% laktozy ilość wytworzonego kwasu nie przekraczała 0.1% , w mleku natomiast dochodziło do 0.6% .

5. Najszybsza fermentacja cukru mlekowego odbywa się w 25 do 35°C przy ilości laktozy $2-2.5\%$, przy czym z laktozy powstaje więcej kwasu mlekowego niż z proporcjonalnych ilości mieszanki glikozy i galaktozy.

6. Wzrost i fermentacja na glikozie jest zazwyczaj lepszą niż na galaktozie, wyjątek stanowił szczep I c przy 35°C , kiedy ilość wytworzonego kwasu mlekowego z galaktozy była nieco większa niż z glukozy.

7. Stwierdzono szybkie zatrącenie zdolności fermentacyjnej wszystkich szczepów przy hodowli na agarze lub żelatynie serwatkowej.

Panu Prof. Dr. K. Bassalikowi, kierownikowi Zakładu Fizjologii Roślin Uniw. Warsz., pod którego kierunkiem wykonałam powyższą pracę, składam i na tem miejscu serdeczne podziękowanie.

Z Zakładu Fizjologii Roślin Uniwersytetu Warszawskiego.

Résumé.

1. L'examen des 63 échantillons de lait, provenant de différents endroits de la Pologne, a permis de constater toujours des bactéries du type *Bacterium lactis acidii* Leichmann, comme agent principal de la coagulation spontanée du lait; on n'a pas trouvé toujours dans tous ces échantillons d'autres types gasogènes.

2. Les bactéries dominantes du type *B. lactis acidii* prennent Gram, sont immobiles et non gasogènes; elles diffèrent néanmoins morphologiquement un peu du type décrit sous ce nom pour l'Europe centrale, occidentale et septentrionale: de nombreuses mesures de

bactéries vivantes et colorées font voir qu'elles sont plus longues et se rapprochent plutôt quant à la forme cellulaire, au genre *Bacterium* qu'à *Streptococcus*. Les types les plus fréquents mesurent $0.8 - 1.25 \times 1.25 - 1.65 \mu$, plus rarement, les formes franchement bâtonneuses mesurent $0.8 \times 1.85 - 2.10 \mu$. En même temps elles vivent une par une et par paire, tandis que les formes plus longues donnent habituellement des chaînettes.

3. Trois souches, différentes au point de vue la croissance, constituèrent le matériel de recherches: la souche I ne donnant pas de chaînettes, la souche II donnant toujours de chaînettes et la souche III, dont les cellules vivent une par une, par paire et forment aussi des chaînettes.

4. La quantité d'acide lactique dextrogyre, formée par les bactéries étudiées, dépend de la composition du milieu, c. à d. de la quantité des substances contenues dans le substratum, qui neutralisent l'acide naissant: sur les substratums minéraux, additionnés de 0.1% de peptone et en présence de 4.5% de lactose, la quantité de l'acide lactique ne dépassait pas 0.1% , tandis que dans le lait elle atteignait 0.6% .

5. La fermentation du sucre lactique est la plus rapide à $25-35^{\circ}\text{C}$ en présence de 2 à 2.5% de lactose et c'est la lactose qui fournit davantage de l'acide lactique que la glucose et la galactose, ajoutées à la même proportion.

6. La croissance et la fermentation sur glucose sont habituellement meilleures que sur galactose; l'exception fait la souche I, qui à 35°C seulement, fournit au dépens de la galactose, un peu plus d'acide lactique qu'au dépens de la glucose.

7. On a constaté la perte rapide de la faculté fermentative de toutes les souches, cultivées sur gélose ou gélatine au petit lait.

Institut de physiologie végétale de l'Université de Varsovie.

Literatura.

- 1) Beijerinck — cytujė Löhnis str. 159.
- 2) van Dam, W. Über d. Einfluss der Milchsäure auf die Milchsäuregärung. — Biochem Zeitschrift 87. 1918, str. 107.
- 3) Escherich. Die Darmbakterien des Neugeborenen und Säuglings. — Fortschritte d. Medicin 3. 1885, str. 518, 547.
- 4) Günther u. Thierfelder. Bakteriöl. und Chemische Untersuchungen über d. spotane Milchgerinnung. — Archiv f. Hygiene XXV. 1895, str. 164.
- 5) Grotenfelt. Über d. Virulenz einiger Milchsäurebakterien. — Fortschr. d. Medicin 7. 1889, str. 129.

- 6) Hüppe — cytuję Lafar w Handbuch der Technischen Mykologie, t. 2. 1905—1908, str. 69.
- 7) Knudsen, S. u. Sorenson, A. Über Milch als Nährboden f. gewisse Milchsäurebakterien. — Zentralbl. f. Bakter. II Abt. 1927, t. 71, str. 500.
- 8) Löhnis. Handbuch d. landwirtschaftlichen Bakteriologie. 1910, str. 198. Berlin.
- 9) Leichmann. Über die Beteiligung des *Bacillus lactis aërogenes* an der freiwilligen Säuerung der Milch. — Zentralbl. f. Bakteriologie. 1899, t. 5, str. 344, 390.
- 10) Makrinow. Methoden zur Untersuchung der Milchsäuremikroben. — Zentralbl. f. Bakt. II Abt. 1927, t. 71, str. 399.
- 11) Rahn, Otto. Die Studengärleistung d. Einzelle von *Bacterium lactis acidi*. — Zentralbl. f. Bakter. II Abt. 1911, t. 32, str. 387.
- 12) Schierbeck. Über die Variabilität der Milchsäurebakterien mit Bezug auf die Gärungsfähigkeit. — Arch. f. Hygiene. 1900, t. 38, str. 294.
- 13) Schweitzer, Gustav. Milchhygienische Studien. — Zentralbl. f. Bakter. II Abt., t. 10, str. 568.
- 14) Serkowski. Mleko i Mleczarstwo. 1917, Warszawa, wyd. Gebethner i Wolff.
- 15) Svanberg, Olaf. Über die Wachstumsgeschwindigkeit der Milchsäurebakterien bei verschiedenen *H*-Konzentrationen. — Zeitschr. f. Physiol. Chemie. 1919/20, t. 108, str. 120.
- 16) Timpe, Hermann. Über die Beziehungen der Phosphate und des Caseïns zur Milchsäuregärung. — Arch. f. Hygiene. 1893, t. 18, str. 1.
- 17) Virtanen, A. I., Wichmann, E. I. und Lindstroëm, B. Über die Milchsäuregärung. — Zeitschr. f. Physiol. Chemie. 1927, t. 166, str. 21.
- 18) Weigmann. Versuch einer Einteilung der Milchsäurebakterien des Molkeereigewerbes. — Zentralbl. f. Bakt. 1899, t. 5, str. 827, 859.
19. Weigmann. Pilzkunde der Milch. 1924, str. 50. Berlin, wyd. Paul Parey.