MARIA MACIEREWICZ-STRĄCZYŃSKA

(Zakład Fizjologii Roślin U. J. P.).

DZIAŁANIE TEMPERATURY I pH NA KIEŁKOWANIE SPOR BAKTERII.

(Wirkung von Temperatur und pH auf die Keimung
von Bakteriensporen).

W S T Ę P.

Zagadnienie poruszone w tej pracy przekracza szczerze jej granice. Istota bowiem sprawy polega na pytaniu, czym jest kiełkowanie spor?

Ogólnie znany jest fakt, że spory bakterij w sprzyjających warunkach kiełkują, tworząc młode formy wegetatywne. Zjawisko to zaczyna się od pobrania wody, co wyraża się w napężnieniu spory, powiększeniu się więc jej objętości, i przez to zmniejszeniu stopnia łamliwości światła. Zewnętrzna błona sporowa, exina, nie jest jednolita — posiada miejsca mniej zgrubiałe t. zw. pory. W tych to punktach najmniej wytrzymałych na nacisk pęczniejącej plazmy przypuszczalnie następuje pęknięcie błony sporowej podczas kiełkowania (n. p. u *B. Bütschli* stwierdzone zostało istnienie pory polarnej). W zależności od położenia pory kiełkowanie może być polarne, bipolarne, ekwatorialne, lub też pośrednie, typ podkowisty (Gottheil, Holzmüller, Omeliański). Wreszcie jak u *B. leptosporus*, (Migula) kiełkowanie zachodzi bez rozrywania błon, ograniczając się do pęcznienia, wydłużenia się spory i tracenia zdolności silnego załamывania światła. Sposób kiełkowania spor uznany jest jako cecha stała, która służy do klasyfikacji bakterii.

Nie brak również prac cytologicznych, sięgających głębiej w przemiany, zachodzące w sporze podczas jej kiełkowania (Neumann, Ruzicka, Preisz, Menci).

Wszystkie te jednak dane morfologiczne nie mówią nic o warunkach, w których spory kiełkują.

Ogólnie wymienia się: wystarczającą ilość substancji pożywnych a przede wszystkim wody, odpowiednie ciśnienie osmotyczne, temperaturę, odpowiednie stosunki tlenowe — jako warunki potrzebne dla kiełkowania.

Interesującą jest rzeczą, jaka istnieje współzależność między warunkami: kiełkowania, rozwoju wegetatywnego oraz tworzenia się spor?

W literaturze spotykamy bardzo mało badań systematycznych, przeprowadzonych w tym kierunku.

Bla u (1905) określał dla całego szeregu bakterii sporowych ziemnych maksymalną temperaturę kiełkowania, wzrostu i tworzenia spor.

Z jego danych wynika, że na ogół temperatura maksymalna wzrostu leży wyżej niż temperatura maksymalna tworzenia spor. (Wyjątek stanowi *B. alvei*, u którego maksymalna temperatura kiełkowania jest niższa od maksymalnej temperatury tworzenia spor.).

Maksymalna temperatura kiełkowania jest na ogół równa lub niższa od maksymalnej temperatury wzrostu, (z wyjątkiem *B. asterosporus* i *B. sphaericus*, u których maksymalna temperatura kiełkowania jest wyższa od maksymalnej temperatury wzrostu).

Z badań Holzmüllera (1909) wynika, że optima temperatury dla kiełkowania, wzrostu i tworzenia spor są jednakowe. Minimum — jest najwyższe dla tworzenia spor a najniższe dla kiełkowania — maksimum najwyższe dla kiełkowania — najniższe dla tworzenia spor. Daranyi (1930) również stwierdza, że wytwarzanie spor wymaga węższych granic temperatury niż rozwój danych bakterii. Wund (1906), Engberding (1909) i Holzmüller podają, że dla aerobowych bakterii wymagania tlenowe przy kiełkowaniu i wzroście bakterii są mniej więcej równe, w okresie zaś tworzenia spor — większe. Z doświadczeń Holzmüllera wynika także, że granice koncentracji pożywki dla kiełkowania spor są szersze niż dla wzrostu danych bakterii. Przy czym autor uważa, że dla kiełkowania małe znaczenie ma rodzaj pożywki — a głównie chodzi o odpowiednie ciśnienie osmotyczne. Itano i Neill (1918-19), badając wpływ temperatury i pH na cykl rozwojo-

wy *B. subtilis*, stwierdzili, że dla kiełkowania spor istnieją szersze granice pH niż dla rozwoju, oraz szersze granice temperatury niż dla tworzenia spor.

W granicach temperatur 25° — 37° C (gdy 25° C jest bliskie optimum kiełkowania) zmiany temperatury wpływają mniej na szybkość kiełkowania niż zmiany pH. Krzywe dla tych dwóch temperatur są tylko nieco przesunięte względem siebie. Autorzy wprawdzie nie wyciągają tego wniosku, ale wynika on jasno z tablic i wykresów.

Badania wyżej przytoczone rzucają nieco światła na warunki fizyczne procesu kiełkowania spor, ale nie wyjaśniają, które z czynników koniecznych mają najbardziej pobudzający charakter oraz jakie jest wzajemne ustosunkowanie tych czynników.

Badania własne

CEL PRACY.

Zadanie niniejszej pracy ograniczało się do prześledzenia: 1) działania temperatury i pH na kiełkowanie spor, w porównaniu do wpływu tych czynników na rozwój wegetatywny, oraz 2) jaki wpływ wywiera pH środowiska na odporność spor ogrzewanych w 100° C.

MATERIAŁ.

Jako materiału do badań użyłam czterech gatunków bakterii:

1) <i>Bacillus cepae</i> K. Bassalik et R. Edelsztejn.	
2) Pałeczka Nr. 8.	} wyizolowane z gleby ogrodu
U. J. P. w Warszawie.
3) Pałeczka Nr. 27.	
4) Pałeczka Nr. 26.	

Pałeczka Nr. 8 i 27 są prawdopodobnie formami blisko spokrewnionymi. Morfologicznie różnią się tylko kształtem kolonii na szalce agarowej oraz cokolwiek wielkością form wegetatywnych i spor.

Fizjologicznie odchylenia są minimalne — dotyczą tylko kiełkowania w rozmaitych temperaturach i pH. Największa różnica zaznaczyła się między nimi podczas badania wpływu ciężkiej wody na kiełkowanie spor.

Pałeczka Nr. 26, podobna nieco z kształtu kolonii do Nr. 27, wykazuje znaczne różnice fizjologiczne.

Charakterystyka badanych bakteryj.

OPIS BAKTERII NR 8.

Pałeczki o lekko zaokrąglonych końcach. Występują pojedynczo, podwójnie, najczęściej jednak w regularnych łańcuskach.

Wymiar ich wynosi:

za życia na pożywce płynnej niebarwione	4,07 μ — 8,15 μ x 1,40 μ — 1,55 μ
średnia	5,48 μ x 1,46 μ
Pożywka płynna, bakterie barwione 2' na gorąco błękitem metylenowym	2,33 μ — 4,46 μ x 1,16 μ — 1,37 μ
średnia	3,63 μ x 1,25 μ
Agar, bakterie barwione 2' na gorąco błękitem metylenowym	3,20 μ — 4,07 μ x 1,16 μ — 1,55 μ
średnia	3,69 μ x 1,32 μ
Agar, bakterie ze sporą barwione 2' na gorąco błękitem metylenowym	3,49 μ — 4,66 μ x 1,34 μ — 1,75 μ
średnia	4,07 μ x 1,53 μ

Pałki zawierają liczne ziarnistości, silnie łamiące światło.

Ruchliwość: na agarze i w wodzie peptonowej z cukrem ruchliwe tylko przez 3—6 godzin od zaszczepienia.

Sporo na agarze w 30° C zaczynają się tworzyć już po 12 godzinach. Są owalne, nieco przesunięte w jeden koniec pałki.

Wielkość spory niebarwionej: 1,55 μ — 1,75 μ x 0,87 μ — 0,93 μ .

Kielkują polarnie. Optimum kiełkowania spor: 30° C; pH 7,0.

Optimum rozwoju wegetatywnego: 42° C, pH 7,0. Aerobowe. Gram pozytywne. Na szalkach z agarem zwykłym (1½% agaru, 1½% peptonu, 2% glukozy na wodzie wodociąg.): Kolonie wyrastają w t. 30° C już po kilkunastu godzinach. Mogą być różnych kształtów, przeważają kolonie o pozornie równym brzegu, często zlewające się w mgłę równo rozlaną po szalce. Podob. Nr 3 widać jednak, że brzeg kolonii jest nierówny, można wyróżnić wąsy rozbiegające się na wszystkie strony. Zdarzają się również kolonie gwiazdkowate. Agar skoszony: Powierzchnia lśniaco szara, zbliżona odcieniem do koloru agaru, czasem sfaldowana, na brzegach cieńsza, po środku grubsza. Czasem cała powierzchnia agaru pokryta jest drobnymi, okrągłymi kolonijkami — zawsze jednak po kilku dniach widać charakterystyczne wypustki na brzegach kolonii.

Agar nakłuty: Wzdłuż nakłucia rośnie słabo, na powierzchni wytwarza kolonię podobną jak na szalce.

Żelatynowe szalki. (12% żelatyny, 1½% peptonu, 2% glukozy na wodzie wodociąg.) Kolonie szare, kształtu promieniście rozchodzącej się rozety. Po 2 dniach żelatyna na szalkach kompletnie rozpuszczona w temperaturze pokojowej.

Żelatyna nakłuta: Rośnie wzdłuż nakłucia, tworząc charakterystyczne korzonkowate wypustki. Na powierzchni tworzy kożuszek o sfaldowanym brzegu. Żelatynę rozrzedza wolno. W temperaturze pokojowej w ciągu 10 dni kolonie o średnicy 5—7 mm. Kożuszek w miarę rozrzedzania się żelatyny opada równomiernie. Żelatyna rozrzedzona warstwowo.

Woda peptonowa 10/0: Zmętnienie silne, bardzo słaby, pierścieniowaty kożuszek, opadający na dno. Pałeczki zachowują ruchliwość dłużej niż na pożywce z cukrem.

Woda peptonowa Witte'go: 10/0 gruby kożuszek, różowo zabarwiony. Indolu nie tworzy.

Mleko: Lakmus odbarwia się dopiero po upływie 3 dni. Mleko ścięte, peptonizacja widoczna po 48 godz. od zaszczepienia.

Początkowo lekkie zakwaszenie (po 3 dniach z pH 6,7 — na pH 6,4) następnie słaba alkalizacja (po 11 dniach pH 7,3).

Kartofel: Wzrost dobry. U góry kolonia sucha, pomarszczona popielata—w dole błyszcząca, lekko śluzowata. Po kilku dniach występuje różowo-sine zabarwienie kolonii.

Azotany: redukuje (Wzrost na samych azotanach z cukrem nader słaby).

Żadnego alkoholu, cukru ni glukozydu nie fermentuje, nie wytwarza gazu.

Zakwasza: glukozę, fruktozę, galaktozę, maltozę, sacharozę, dekstryny, glicerynę.

Skrobii nie hydrolizuje.

Spory wytrzymują: ogrzewanie w 100° C: na agarze o pH 7,0 : 61' — 65'

„ pH 5,0 : 6^h — 7^h

„ pH 8,0 : > 2^{h30'}

OPIS BAKTERII NR 27.

Podaję tylko cechy, różniące ją od pałeczki Nr 8.

Wielkość pałek:

Pożywka płynna, bakterie niebarwione:	2,72 — 5,82 x 1,16 — 1,55 μ
„ „ „ barw. błę. met. 2':	3,28 — 4,36 x 1,16 μ
Agar, bakterie barwione błę. met. 2' na gorąco:	4,46 — 9,08 x 1,16 μ
„ „ „ ze sporą „ „ „ „ „	2,78 — 3,49 x 1,40 — 1,75 μ
Wielkość spory niebarwionej	1,55 — 1,75 x 0,87 — 0,93 μ

Na szalkach z agarem zwykłym: Kolonia o nierównym brzegu, rozgałęziona nierównomiernie — cienka mglista, koloru szarego. Pod obiektywem Nr 3 widać charakterystycznie powyginane wypustki—pojedyncze łańcuchy, wchodzące w podłoże, środek kolonii mocno pogmatwany—składający się jednak z szeregu poskręcanych nitek. Kolor: złotawo-metaliczny. Zdarzają się—lecz bardzo rzadko—kolonie podobne do Nr 8, t. j. rozlane równo, mgliste, po powierzchni agaru.

Usiłowano zidentyfikować opisane bakterie Nr 8 i 27 ze znanymi bakteriami sporowymi. Posługiwano się w tym celu kluczami: Bergey'a oraz Lehmana i Neumann'a jak również pracami oryginalnymi (Fischöder, Gottheil, Holz Müller, Eckelmann, Neide, Soule).

Nie zdołano znaleźć opisanych bakterii identycznych; pałeczki Nr 8 i Nr 27 są najbardziej zbliżone do grupy *B. anthracis*, ewentualnie do *B. anthracoides* Hüppe.

Podaję zestawienie cech charakterystycznych dla *B. anthracis* i *B. anthracoides*, pałeczki Nr 8 i Nr 27.

	<i>B. anthracis</i>	<i>B. anthracoides</i>	<i>B. Nr 8</i>	<i>B. Nr 27</i>
Wielkość pałki:	1 — 1,2 x 5 — 10 μ		1,1 — 1,5 x 2,3 — 8 μ	idem
Wielkość spory:				„
Ułożenie spory:	Centralne		Centr. nieco przesunięte ukośnie.	„
Gram:	+	+	+	„
Żel. nakłuta:	Rozrzedzają lejkowato lub warstwowo. Wzrost drzewkowaty z korzonkowatymi wypustkami.	idem	Rozrzedza warstwowo. Wzrost drzewkowaty z korzonkowatymi wypustkami.	„
Szalki żelat.:	u wszystkich czterech równo			
Agar skoszony:	idem			
Szalka agarowa:	idem			
Bulion mięsny:	Zmętnienie kłaczkowate, kożuszek niewyraźny, żółtawy osad.	Początk. zmętn., następnie wyjaśnienie, wytworzenie błonkowego kożuszka.	Zmętn. początk. jednolite, następnie kłaczkowate, b. słaby kożuszek pierścieniowaty (na peptonie Witte'a różowy), opadający na dno, osad kłaczkowaty	„
Mleko:	Lekkie zakwasz. koagulacja, peptonizacja.	t. s.	Lekkie zakw. koagul. pepton. wtórna lekka alkalicz.	„
Kartofel:	Nalot białawo-kremowy	t. s.	Początk. suchy popiel. nalot nast. kremowo różowawy.	„
Indol:	nie	nie	nie	nie
Redukcja azotan.:	nie	nie	tak	tak
Zakwasz. cukrów:	Glukoza	?	Glukoza, frukt, galakt, dextr, sachar, maltoza, gliceryna	t. s.
Hydroliza skrobi:	nie	nie	nie	nie
Stosunek do O ₂ :	Fakult. anaerob	t. s.	t. s.	t. s.
Opt. temp. wzrostu	37 — 38° C	t. s.	42° C	42° C
Kiełkowanie:	Polarne	t. s.	Polarne	t. s.
Ruchliwość:	Nieruchliwe	Ruchliwe w młodych kulturach.	Ruchliwe w młodych kulturach.	t. s.
Wygląd pałki:	Końce równo ucięte (u niektórych zaokrągl.) kapsułka, ziarnistości.	Końce zaokrągl., brak kapsułki, ziarnistości.	Końce zaokrągl., kapsułka brak, ziarnistości.	t. s.
Środowisko:	Patologiczny	Apatologiczny	Przypuszczalnie apatogeniczny, gleba.	t. s.

OPIS BAKTERII NR 26.

Pałeczki o zaokrąglonych końcach, pojedyncze, w parach lub łańcuszkach, czasem bardzo długich. Komórki łatwo tracą normalne kształty, stają się nieforemne i tworzą nieregularne łańcuszki. Mocno ziarniste, przy czym ziarnistości, silnie załamujące światło, pojawiają się w komórkach wcześniej; nie dały się te ziarnistości zidentyfikować ani jako glikogen ani wolutyna. Odnaczają się tym, że barwią się doskonale fuksyną karbolową i następnie odbarwiane 5% H_2SO_4 , zachowują się jak spory — t. j. nie odbarwiają się. (są więc „kwasoodporne“).

Wielkość pałeczki:

Pożywka płynna: bakterie niebarwione:	3,49 — 5,82 x 1,40 — 1,55 μ
„ „ „ barwione błęk. met. 2':	2,33 — 4,46 x 1,16 μ
Agar, bakterie barwione błęk. met. 2' na gorąco:	2,91 — 3,88 x 0,93 — 1,16 μ
„ „ silnie zwakuolizowane na gorąco:	2,91 — 5,82 x 1,16 — 1,5 μ

Ruchliwość: na agarze lub wodzie peptonowej z cukrem ruchliwość tracą szybko, w ciągu 6 godzin po zaszczepieniu.

Spory owalne, przesunięte trochę ku jednemu końcowi pałki.

Wielkość spory: 1,40 — 1,75 x 0,93 — 1,16 μ .

Optimum kiełkowania spor: 37° C pH 7,0, kiełkowanie polarne.

Optimum rozwoju form wegetatywnych: 37° C, pH 8,0.

Maksimum rozwoju form wegetatywnych: 42° C przy pH 7,0, pH 5,0 i pH 8,0.

Aerobowe, Gram negatywne.

Na szalkach z agarem zwykłym: Kolonia szara, bezbarwna, o brzegu nierównym, utworzona jakby z wielu bardzo drobnutkich kolonii ułożonych w popłatane szeregi. Środek nieco wypukły; pod obiektywem Nr 3 ma barwę szaro srebrzystą. Na brzegu tworzy charakterystyczne rozwidłone wypustki. Kolonie wyrastają już po kilkunastu godzinach.

Agar skoszony: W środku wygląd kolonii podobny do kolonii na szalkach; w środku tworzy się nieco grubsza warstwa, brzegi nieregularne, złożone z bardzo wielu drobnych kolonii, tworzących niesymetryczne wypustki.

Agar nakłuty: Wzdłuż nakłucia rośnie słabo.

Żelatynowe szalki: Kolonia promienista, szaro-mleczna; żelatyna rozrzedzona silnie już po 24 godzinach.

Żelatyna nakłuta: Rośnie wzdłuż nakłucia, tworząc charakterystyczne korzonkowate wypustki. Na powierzchni rośnie w postaci talerzyka o falistym brzegu; żelatynę rozrzedza warstwowo; rozrzedzanie zaczyna się po 48 godz. (w temp. pokojowej), postępuje wolno.

Woda peptonowa 1%: Zmętnienie silne. Kozuszek pierścieniowy, bardzo szybko opadający na dno. Pałki zachowują ruchliwość dłużej niż na pożywce z cukrem.

Woda peptonowa Witte'go 1%: Gruby kozuszek pierścieniowy, kremowy. Indolu nie tworzy.

Mleko: Lakmus odbarwiony, strącenie kazeiny widoczne po 48 godz., równocześnie zaczyna się peptonizacja, bardzo silna po 4 dniach. Zmiany odczynu brak.

Kartofel: Wzrost dobry; śluzowata powierzchnia kremowa; mikroskopowo: dość dużo form zdeformowanych.

Azotany redukuje, wzrost nader nikły.

Żadnego cukru, alkoholu, glukozydu nie fermentuje, nie tworzy gazu.

Zakwasza: glukozę, fruktozę, galaktozę, maltozę, sacharozę, dekstrynę, glicerynę, sorbit, salicynę.

Skrobii nie hydrolizuje.

Spory wytrzymują ogrzewanie w 100° C: na agarze przy pH 7,0 : 40—41'

" " " pH 5,0 : 6—7'

" " " pH 8,0 : > 2^h 30'.

Bakterii Nr. 26 nie udało się utożsamić z opisanymi w literaturze. Nietylko nie identyczna, ale nawet nie jest zbliżona do żadnej ze znanych (Bergey, Lehmann i Neumann) bakterii sporowych, Gram negatywnych.

I. WPLYW TEMPERATURY i pH NA KIELKOWANIE SPOR.

W celu stwierdzenia, jak działa temperatura otoczenia i pH środowiska na kiełkowanie spor, przeprowadzono szereg doświadczeń w granicach temperatur 12° do 42° C oraz pH 5,0 do pH 8,0.

Używałam we wszystkich wypadkach pożywki płynnej 1¹/₂% peptonu, 2% glukozy na wodzie wodociągowej) o odpowiednim pH.

Przy czym pH było sprawdzane po 3-ej sterylizacji na potencjometrze elektrodą chinhydronową; zakwaszano pożywkę przy pomocy HCl, alkalizowano — NaOH.

Jako materiał służyły mi spory opisanych bakterii, wytworzone na agarze skoszonym (1¹/₂% agaru, 2% glukozy, 1¹/₂% peptonu, na wodzie wodociągowej), pH 7⁰, w temperaturze 30° C, przynajmniej miesięczne. Użycie tak starych hodowli zabezpieczało przed obecnością: 1° komórek wegetatywnych, 2° spor jeszcze nie dojrzałych, znajdujących się w osłonkach komórkowych.

M E T O D A.

W doświadczeniach mych posługiwałam się metodą obserwacji bezpośredniej.

Około 2 cm sztandarowej pożywki o pH 7,0, ogrzanej przez 5' we wrzącej wodzie, szczepiłam 3 igłami starych hodowli agarowych. Tę zaszczipioną próbkę ogrzewałam w ciągu 1' we wrzącej wodzie, w celu zabicia ewentualnych form wegetatywnych. Następnie przenosiłam sterylizowaną pipetą po kilka kropel tej zawiesiny spor do próbek z pożywką sztandarową o pH 5, 7, 8. Po wymieszaniu, robiłam oczkiem platynowym

krople na szkiełku przykrywkowym, które umieszczałam na szklanych pierścionkach. Pierścionki były przymocowane do szkiełek podstawowych balsamem kanadyjskim; dla zabezpieczenia kropeł przed wysychaniem na dnie pierścionka znajdowała się bibuła nasyciona wodą, brzegi pierścionka były szlifowane i pociągnięte specjalnym smarem (2 części smalcu wieprzowego, 1 część wosku pszczelego, oczyszczonego przez gotowanie w wodzie) tak, że szkiełka przykrywkowe przylegały do nich bardzo szczelnie. Tak przygotowane „hodowle kropek” sprawdzałam mikroskopowo (okular komp. 6, obiektyw immersja 18b Reicherta) dla stwierdzenia, czy w kropli jest dostateczna ilość spor i czy nie ma komórek wegetatywnych. Następnie 3 równoległe „hodowle kropek” umieszczałam w termostatach o odpowiedniej temperaturze. Obserwacje mikroskopowe przeprowadziłam w odstępach 15' do chwili rozpoczęcia się kiełkowania — a następnie co godzinę, licząc za każdym razem ilość spor i form kiełkujących lub wykiełkowanych w 10 polach widzenia. Stąd obliczamy % wykiełkowanych w stosunku do początkowej ilości spor (t. zn. % wykiełkowanych w stosunku do ilości spor obecnych + ilość wykiełkowanych w 10 polach widzenia). Przygotowanie „hodowli kropek” i dokonanie obliczeń musiały być prowadzone bardzo szybko.

Doświadczenia były powtarzane kilkakrotnie.

Wyniki szeregu doświadczeń zebrane są w tablicach, przy czym podaję czas od zaszczepienia do: 1^o pojawienia się pierwszych form kiełkujących, 2^o zakończenia procesu kiełkowania w danej kropli (pomijam wyniki obserwacji pośrednich).

Wyniki obserwacji.

A. Pałeczka № 8.

Z przytoczonej tablicy 1 (por. str. 380) i wykresów I i Ia widać, że:

1. Podwyższenie temperatury do pewnego optimum sprzyja szybkości kiełkowania spor we wszystkich 3 zbadanych pH.

2. Przyspieszenie kiełkowania przez temperaturę w odstępach 10^o aż do osiągnięcia optimum wynosi:

dla pH 7: $Q_{10^o} = 4,4$ dla początku kiełk., a 6,1 dla 100%

pH 5: $Q_{10^o} = 0,91$ „ „ „ „ 1,07 „ „

pH 8: $Q_{10^o} = 3,6$ „ „ „ „ 4,0 „ „

3. Optimum temperatury kiełkowania jest różne dla różnych pH, przy czym dla pH 7 temperatura optymalna jest niższa od temperatury optymalnej dla kiełkowania w pH 5 i pH 8 (pH 7 — 30^o C, pH 5 i pH 8 — 42^o C).

4. Najbardziej optymalne warunki dla kiełkowania spor bakterii Nr. 8 są w temperaturze 30^o C przy pH 7 (kiełkowanie zachodzi w czasie 1 godziny 50' — 3 godz. 15').

5. W pH 5 w 12^o C spory bakterii Nr. 8 nie kiełkują.

TABLICA 1.
Pałeczka Nr. 8.

Temp. °C	pH 5,0		pH 7,0		pH 8,0	
	Początek kiełkowania	Zakończenie kiełkowania	Początek kiełkowania	Zakończenie kiełkowania	Początek kiełkowania	Zakończenie kiełkowania
12°	5 dni — 0 ⁰ / ₀		16 ^h — 14 ⁰ / ₀	34 ^h — ca 100 ⁰ / ₀	22 ^h — 67,2 ⁰ / ₀	50 ^h — ca 100 ⁰ / ₀
22°	3 ^h 30' — 5,1 ⁰ / ₀	15 ^h — 97,5 ⁰ / ₀	5 ^h — 45,5 ⁰ / ₀	9 ^h — ca 100 ⁰ / ₀	3 ^h 30' — 19 ⁰ / ₀	5 ^h 30' — ca 100 ⁰ / ₀
30°	1 ^h 50' — 2,3 ⁰ / ₀	9 ^h — ca 100 ⁰ / ₀	1 ^h 50' — 58,3 ⁰ / ₀	3 ^h 15' — ca 100 ⁰ / ₀	1 ^h 50' — 5,8 ⁰ / ₀	5 ^h 15' — ca 100 ⁰ / ₀
37°	2 ^h — 10 ⁰ / ₀	8 ^h — ca 100 ⁰ / ₀	2 ^h — 5,6 ⁰ / ₀	3 ^h 30' — ca 100 ⁰ / ₀	2 ^h — 15,3 ⁰ / ₀	4 ^h 40' — ca 100 ⁰ / ₀
42°	1 ^h 50' — 1,4 ⁰ / ₀	7 ^h — ca 9,4 ⁰ / ₀	2 ^h 5' — 9,4 ⁰ / ₀	3 ^h 40' — ca 100 ⁰ / ₀	3 ^h — 64,2 ⁰ / ₀	3 ^h 40' — ca 100 ⁰ / ₀

Czas w godz

Wykres I

Bacillus №8

12°

22°

30°

37°

42°

początek kiełkowania
koniec kiełkowania

czas w godz

Wykres I

Bacillus №8

p_H 5p_H 7p_H 8początek kiełkowania
koniec kiełkowania

temperatura w °C

B. Pałeczka № 27.

Wyniki obserwacji nad przebiegiem kiełkowania spor bakterii Nr 27, bardzo podobnej do poprzedniej Nr 8, zawiera tablica 2. Z tablicy 2 (por. str. 383) i wykresów II i IIa wynika:

1. Podwyższenie temperatury aż do optymalnej sprzyja szybkości kiełkowania spor we wszystkich 3 badanych pH.

2. Przyspieszenie kiełkowania przez temperaturę w odstępach 10°C — aż do osiągnięcia temperatury optymalnej wynosi:

dla pH 7 $Q_{10^{\circ}} = 2,1$ dla początku kiełk., a $7,4$ dla 100%

pH 5 $Q_{10^{\circ}} = 7,4$ „ „ „ „ $2,4$ „ „

pH 8 $Q_{10^{\circ}} = 5,9$ „ „ „ „ $2,2$ „ „

3. Optimum temperatury kiełkowania jest różne dla różnych pH, przy czym dla pH 7 temperatura optymalna jest niższa od temperatury optymalnej dla pH 5 i pH 8 (pH 7 — 30°C , pH 8 — 37°C , pH 5 — 42°C).

4. Najszybciej kiełkowanie zachodzi w pH 7 — najwolniej w pH 5 we wszystkich temperaturach.

5. Najbardziej optymalne warunki dla kiełkowania spor bakterii Nr. 27 są w temperaturze 30°C pH 7 (kiełkowanie trwa 1 godz. 15' — 3 godz. 15').

C. Pałeczka № 26.

Wyniki obserwacji przebiegu kiełkowania bakterii Nr 26, bardzo odmiennej od poprzednich, podaje tablica 3 (por. str. 385) i wykresy III i IIIa. Z powyższej tablicy 3 widać, że:

1. Podwyższenie temperatury aż do pewnego optimum sprzyja szybkości kiełkowania spor we wszystkich badanych pH.

2. Przyspieszenie kiełkowania przez temperaturę w odstępach 10°C — aż do osiągnięcia temperatury optymalnej wynosi:

dla pH 7 $Q_{10^{\circ}} = 5,4$ dla rozpoczęcia kiełk., a $2,1$ dla 100%

pH 5 $Q_{10^{\circ}} = 1,5$ „ „ „ „ $2,3$ „ „

pH 8 $Q_{10^{\circ}} = 6,7$ „ „ „ „ $4,9$ „ „

3. Optymalna temperatura dla kiełkowania spor bakt. 26 w pożywce o pH 5 i pH 7 wynosi 37°C , dla pH 8 — 30°C .

4. W pożywce o pH 5, spory — we wszystkich temperaturach — kiełkują najwolniej.

5. Najbardziej optymalne warunki dla kiełkowania mają spory bakt. 26 w temperaturze 37°C przy pH 7.

6. W temperaturze 42°C kiełkowanie zachodzi tylko w pH 7.

T A B L I C A 2.

Pałeczka Nr. 27.

Temp. °C	pH 5,0		pH 7,0		pH 8,0	
	Początek kiełkowania	Zakończenie kiełkowania	Początek kiełkowania	Zakończenie kiełkowania	Początek kiełkowania	Zakończenie kiełkowania
12°	27 ^{h45'} — 29,6°/o	32 ^{h45'} — ca 100°/o	6 ^{h45'} — 5,2°/o	19 ^h — ca 100°/o	31 ^h — 40°/o	?
22°	40 ^{h20'} — 8°/o	45 ^h — ca 100°/o	4 ^h — 4,7°/o	7 ^h — ca 100°/o	7 ^h — 11°/o	8 ^h — ca 100°/o
30°	5 ^{h35'} — 9°/o	8 ^{h30'} — ca 100°/o	4 ^{h15'} — 2,7°/o	3 ^{h15'} — ca 100°/o	3 ^{h30'} — 75°/o	5 ^{h30'} — ca 100°/o
37°	4 ^{h50'} — 4,46°/o	7 ^{h41'} — ca 100°/o	2 ^h — 27,8°/o	4 ^h — ca 100°/o	3 ^{h10'} — 46°/o	4 ^{h10'} — ca 100°/o
42°	4 ^{h15'} — 33,8°/o	4 ^{h30'} — ca 100°/o	2 ^h — 15,0°/o	4 ^h — ca 100°/o	4 ^{h45'} — 12,5°/o	4 ^{h45'} — ca 100°/o

Czas w godz.

Wykres II

Bacillus №27

Czas w godz.

Wykres IIa

Bacillus №27

T A B L I C A 3.
Pałeczka Nr. 26.

Temp. °C	pH 5,0		pH 7,0		pH 8,0	
	Początek kiełkowania	Zakończenie kiełkowania	Początek kiełkowania	Zakończenie kiełkowania	Początek kiełkowania	Zakończenie kiełkowania
12°	3 dni — 0%		17 ^h — 50,9 ⁰ / ₀	25 ^{h30'} — ca 100 ⁰ / ₀	25 ^h — 46,4 ⁰ / ₀	32 ^h — ca 100 ⁰ / ₀
22°	6 ^{h35'} — 10,2 ⁰ / ₀	14 ^h — ca 100 ⁰ / ₀	4 ^{h30'} — 8,7 ⁰ / ₀	9 ^{h30'} — ca 100 ⁰ / ₀	4 ^{h10'} — 11,8 ⁰ / ₀	8 ^{h15'} — ca 100 ⁰ / ₀
30°	5 ^{h30'} — 57,1 ⁰ / ₀	7 ^{h30'} — ca 100 ⁰ / ₀	1 ^{h45'} — 5,9 ⁰ / ₀	6 ^{h45'} — ca 100 ⁰ / ₀	2 ^h — 1,1 ⁰ / ₀	6 ^{h25'} — ca 100 ⁰ / ₀
37°	3 ^h — 5,5 ⁰ / ₀	6 ^h — ca 100 ⁰ / ₀	2 ^h — 6,5 ⁰ / ₀	4 ^{h45'} — ca 100 ⁰ / ₀	2 ^{h40'} — 15 ⁰ / ₀	8 ^{h40'} — ca 100 ⁰ / ₀
42°	2 ^{h4} — 0%		2 ^{h4} — 0 ⁰ / ₀		7 ^h — 8,6 ⁰ / ₀	9 ^h — ca 100 ⁰ / ₀

T A B L I C A 4.

Bacillus cereus.

Temp. °C	pH 5,0		pH 7,0		pH 8,0	
	Początek kiełkowania	Zakończenie kiełkowania	Początek kiełkowania	Zakończenie kiełkowania	Początek kiełkowania	Zakończenie kiełkowania
12°	25 ^h — 54,8 ^o / _o	31 ^h — ca 100 ^o / _o	27 ^h — *)		24 ^h — 77 ^o / _o	30 ^h — ca 100 ^o / _o
22°	7 ^h — 16,6 ^o / _o	14 ^h — ca 100 ^o / _o	7 ^h 30' — 57 ^o / _o	12 ^h — ca 100 ^o / _o	8 ^h 40' — 14,2 ^o / _o	10 ^h — ca 100 ^o / _o
30°	3 ^h — 8 ^o / _o	6 ^h — ca 100 ^o / _o	4 ^h 15' — 14 ^o / _o	8 ^h 30' — ca 100 ^o / _o	3 ^h — 0,57 ^o / _o	10 ^h — ca 100 ^o / _o
37°	4 ^h 20' — 25,7 ^o / _o	6 ^h 35' — ca 100 ^o / _o	4 ^h 30' — 9,59 ^o / _o	6 ^h 50' — ca 100 ^o / _o	4 ^h — 12,19 ^o / _o	9 ^h — ca 100 ^o / _o
42°	5 ^h — 0,61 ^o / _o	14 ^h 20' — ca 100 ^o / _o	4 ^h 10' — 0,84 ^o / _o	24 ^h — ca 100 ^o / _o	7 ^h — 26,6 ^o / _o	26 ^h — ca 100 ^o / _o

*) Zaobserwowałam początek kiełkowania, ^o/_o nie liczony — próbki służyły się.

Wykres IV

Bacillus Cepae

Czas w godz

Czas w godz

Wykres IVa

Bacillus Cepae

7. W temperaturze 12° C w pożywce o pH 5 spory nie kiełkują.

Ponieważ gotowanie 1' działało bardzo hamująco na szybkość kiełkowania spor — do tego stopnia, że spory

w temp. 12° C zaczynały kiełkować po 192 godz.

„	22° C	„	„	„	70	„
„	30° C	„	„	„	22	„
„	35° C	„	„	„	64	„

badania prowadziłam bez gotowania spor, biorąc do doświadczeń hodowle conajmniej 4 miesięczne i sprawdzając bardzo skrupulatnie, czy przygotowane „hodowle kropelkowe” nie zawierają komórek wegetatywnych. Poza tym postępowałam jak uprzednio.

D. *Bacillus cepae*.

Analogiczne obserwacje co do kiełkowania spor *Bacillus cepae* zawiera tablica 4 (por. str. 387) i wykresy IV i IV a.

Z powyższej tablicy 4 widać, że:

1. Podwyższenie temperatury przyspiesza kiełkowanie spor we wszystkich 3 badanych pH.

2) Przyspieszenie kiełkowania przez temperaturę w odstępach 10° C aż do osiągnięcia optimum wynosi:

dla pH 7 $Q_{10^\circ} = 3,2$ dla pierwszych kiełków, 2,1 dla 100%

„ pH 5 $Q_{10^\circ} = 4,4$ „ „ „ 2,7 „ „

„ pH 8 $Q_{10^\circ} = 4,4$ „ „ „ 1,7 „ „

3) Temperatura optymalna dla kiełkowania spor *B. cepae* w pożywce o pH 5 i pH 8 jest jednakowa i wynosi 30° C, dla pH 7 jest wyższa, a mianowicie — 37° C.

4) Nie ma bardzo znacznych różnic w szybkości kiełkowania w różnych pH dla tej samej temperatury (odchylenie stanowi t. 42° C).

5) Najszybciej kiełkują spory *B. cepae* w warunkach następujących: temperatura 30° C przy pH 5 (3 — 6 godz.).

WNIOSKI.

Z przytoczonych wyżej doświadczeń, przeprowadzonych na sporach 4 gatunków bakterii, wynika:

1) Zarówno pH pożywki jak temperatura otoczenia mają duży wpływ na szybkość kiełkowania spor.

2) Krzywe, ilustrujące wpływ temperatury (wykres I, II, III, IV), mają przebieg charakterystyczny dla procesów fizjologicznych t. j. wykazują pewne optimum. Znamienным dla nich jest to, że początkowym zmianom temperatury (t. j. w temp. niższych od opt.) — towarzyszą bardzo duże zmiany w szybkości kiełkowania, po osiągnięciu zaś optimum — dalsze podwyższanie temperatury wpływa nieznacznie.

Przyspieszenie przez podwyższenie temp. o 10° C wyraża się w różnych granicach temperatur różnie: i tak dla pojawienia się pierwszych pałek w pożywce o pH 7 dla:

Bakt. 8.	Bakt. 27.
12° C — 22° C $Q_{10} = 3,02$	12° C — 22° C $Q_{10} = 1,7$
22° C — 30° C $Q_{10} = 3,4$	22° C — 30° C $Q_{10} = 4,0$
30° C — 42° C $Q_{10} = 0,94$	30° C — 42° C $Q_{10} = 1,3$
Bakt. 26.	<i>B. cepae.</i>
12° C — 22° C $Q_{10} = 3,7$	12° C — 22° C $Q_{10} = 3,6$
22° C — 30° C $Q_{10} = 3,2$	22° C — 30° C $Q_{10} = 2,2$
30° C — 41° C $Q_{10} = 0,95$	30° C — 42° C $Q_{10} = 0$

3) Nie można mówić oddzielnie o optymalnej temperaturze lub optymalnym pH dla kiełkowania spor. Można jednak stwierdzić, że w granicach badanych temperatur, wszystkie badane bakterie we wszystkich pH najwolniej kiełkują w temperaturze 12° C.

4) Temperatury optymalne dla 3 badanych pH mogą być różne, jak wynika to z tabl. 5.

TABLICA 5.

	pH 5,0	pH 7,0	pH 8,0
Bakt. 8	42°	30°	37°
Bakt. 27	42°	30°	37°
Bakt. 26	37°	37°	30°
<i>B. cepae</i>	30°	37°	37°

5) W granicach badanych przeze mnie temperatur, dla każdej temperatury, optymalne pH dla kiełkowania spor mogą być różne, jak to wykazuje tabl. 6.

TABLICA 6.

	12°	22°	30°	37°	42°
B. 8	pH 7	pH 8	pH 7	pH 7	pH 8 i pH 7
B. 27	pH 7	pH 7	pH 7	pH 7	pH 7
B. 26	pH 7	pH 8	pH 7 i pH 8	pH 7	Kiełkuje tylko w pH 8
B. cepae	pH 8	pH 5	pH 5	pH 5	pH 5

6) Pewien określony rozmiar zespołu czynników badanych, więc pH i temperatury, jest najkorzystniejszy dla szybkości kiełkowania spor, jak to stwierdza tabl. 7.

TABLICA 7

	Temperatura	pH		Temperatura	pH
Bakt. 8	30°	pH 7	Bakt. 26	37°	pH 7
Bakt. 27	30°	pH 7	B. cepae	30°	pH 5

7) W przytoczonych doświadczeniach nie określałam minimum i maximum temperatury, ani minimum i maximum pH dla kiełkowania spor badanych bakterii. Doświadczenia były prowadzone w pewnych ściśle z góry określonych warunkach: a więc w temp. 12° C — 42° C oraz pH 5 — 8; chodziło o prześledzenie w tych granicach wpływu tych dwóch czynników, temperatury i pH, na kiełkowanie spor. Chcąc porównać działanie tych dwóch badanych czynników muszę jeszcze raz zaznaczyć, że porównanie to dotyczy tylko pewnych wąskich granic temperatury i pH, i że te czynniki w danym wypadku, t. j. w tej pracy nie są zbadane w rozmiarach

równorzędnych. Jednak pewne ogólniejsze wnioski w danym wypadku można wyciągnąć, a mianowicie:

a) w przytoczonych doświadczeniach, w granicach temperatur $12^{\circ} - 22^{\circ} - 30^{\circ} \text{C}$, główne zmiany szybkości kiełkowania są spowodowane różnicami temperatury. W granicach temperatur $30^{\circ} - 37^{\circ} - 42^{\circ} \text{C}$ różnice w szybkości kiełkowania zachodzą głównie dzięki istniejącym różnicom pH. (Wykresy: I, Ia, II, IIa, III, IIIa, IV, IVa). Czyli w granicach pH 5 — 8 do pewnej temperatury (dopóki jedno z badanych pH nie osiągnie swej temperatury optymalnej) czynnikiem aktywującym kiełkowanie spor badanych jest temperatura — następnie dopiero większe znaczenie zaczyna mieć pH środowiska;

b) na szybkość kiełkowania badanych spor przyjętych w przeprowadzanych doświadczeniach granicach temperatur ($12^{\circ} - 42^{\circ} \text{C}$) i pH (5 — 8), większy wpływ mają zmiany temperatury niż zmiany pH. Widać to wyraźnie, gdy zestawimy różnice z jednej strony najkrótszych czasów kiełkowania w różnych pH — z drugiej — najkrótszych czasów kiełkowania w różnych temperaturach, jak to wynika z tabl. 8, 9, 10 i 11.

Bakt. Nr 8.

TABLICA 8.

Najkrótszy czas kiełkowania w danych pH	t°	Najkrótszy czas kiełkowania w danej temperaturze
pH 5 $1^{\text{h}} 50' - 7^{\text{h}}$	12°	$16^{\text{h}} - 34^{\text{h}}$
	22°	$3^{\text{h}} 30' - 5^{\text{h}} 30'$
pH 7 $1^{\text{h}} 50' - 3^{\text{h}} 15'$	30°	$1^{\text{h}} 50' - 3^{\text{h}} 15'$
	37°	$2^{\text{h}} - 3^{\text{h}} 30'$
pH 8 $2^{\text{h}} - 3^{\text{h}} 45'$	42°	$2^{\text{h}} - 3^{\text{h}} 40'$
Różnica $0^{10'} - 3^{\text{h}} 45'$		Różnica $14^{\text{h}} 10' - 30^{\text{h}} 45'$

Bakt. Nr 27.

TABLICA 9.

Najkrótszy czas kiełkowania w danych pH	t°	Najkrótszy czas kiełkowania w danej temperaturze
pH 5 $1^{\text{h}} 15' - 4^{\text{h}} 30'$	12°	$6^{\text{h}} 45' - 19^{\text{h}}$
	22°	$4^{\text{h}} - 7^{\text{h}}$
pH 7 $1^{\text{h}} 15' - 3^{\text{h}} 15'$	30°	$1^{\text{h}} 15' - 3^{\text{h}} 15'$
	37°	$2^{\text{h}} - 4^{\text{h}}$
pH 8 $1^{\text{h}} 45' - 4^{\text{h}} 45'$	42°	$1^{\text{h}} 15' - 4^{\text{h}} 30'$
Różnica $0^{30'} - 1^{\text{h}} 30'$		Różnica $5^{\text{h}} 30' - 15^{\text{h}} 45'$

Bakt. Nr 26

TABLICA 10.

Najkrótszy czas kiełkowania w danych pH		t°	Najkrótszy czas kiełkowania w danej temperaturze
pH 5	3 ^h — 6 ^h	12°	17 ^h — 25 ^h 30'
		22°	4 ^h 10' — 8 ^h 15'
pH 7	2 ^h — 4 ^h 45'	30°	2 ^h — 6 ^h 25'
		37°	2 ^h — 4 ^h 45'
pH 8	2 ^h — 6 ^h 25'	42°	
Różnica 1 ^h — 1 ^h 40'			Różnica 15 ^h — 20 ^h 45'

B. cepae

TABLICA 11.

Najkrótszy czas kiełkowania w danych pH		t°	Najkrótszy czas kiełkowania w danej temperaturze
pH 5	3 ^h — 6 ^h	12°	24 ^h — 30 ^h
		22°	8 ^h 40' — 10 ^h 40'
pH 7	4 ^h 15' — 6 ^h 50'	30°	3 ^h — 6 ^h
		37°	4 ^h 20' — 6 ^h 35'
pH 8	4 ^h — 9 ^h	42°	5 ^h — 14 ^h 20'
Różnica 1 ^h 15' — 2 ^h 10'			Różnica 21 ^h — 24 ^h

Również unaocznic to sobie można, porównując różnice czasów kiełkowania w danej temperaturze dla różnych pH z różnicami czasów kiełkowania w danych pH w różnych temperaturach, jak to przedstawiają tabl. 12, 13, 14 i 15.

Bakt. Nr 8.

TABLICA 12.

	Różnice w danej temperaturze	Różnice w danych pH, w granicach t° 12° — 42°		
		pH 5	pH 7	pH 8
12°	6 ^h — 14 ^h	}	15 ^h 10' — 30 ^h 45'	20 ^h 10' — 46 ^h 20'
22°	1 ^h 30' — 9 ^h 30'			
30°	0 — 5 ^h 45'			
37°	0 — 4 ^h 30'			
42°	0 ^h 15' — 3 ^h 20'			

Bakt. Nr 27

TABLICA 13.

	Różnice w danej temperaturze	Różnice w danych pH, w granicach t° 12° — 42°		
		pH 5	pH 7	pH 8
12°	24h 15' — 13h 45'	26h 30' — 28h 15'	5h 30' — 15h 45'	29h 15' — 27h 15'
22°	6h 30' — 8h			
30°	4h 20' — 5h 15'			
37°	2h 50' — 3h 40'			
42°	0h 45' — 0h 30'			

Bakt. Nr 26.

TABLICA 14.

	Różnice w danej temperaturze	Różnice w danych pH, w granicach t° 12° — 42°		
		pH 5	pH 7	pH 8
12°	8h — 6h 30'	3h 25' — 8h	15h 15' — 20h 45'	23h — 25h 35'
22°	2h 25' — 5h 45'			
30°	3h 45' — 2h 5'			
37°	1h — 3h 55'			
42°				

B. cepae.

TABLICA 15.

	Różnice w danej temperaturze	Różnice w danych pH, w granicach t° 12° — 42°		
		pH 5	pH 7	pH 8
12°	3h — 1h	22h — 25h	22h 30'	20h — 21h
22°	1h 40' — 3h 20'			
30°	1h 15' — 4h			
37°	0h 30' — 2h 25'			
42°	3h 5' — 11h 40'			

II. WPLYW TEMPERATURY I pH NA ROZWÓJ KOMÓREK WEGETATYWNYCH.

Pożywkę, składającą się z 1½% peptonu, 2% glukozy na wodzie wodociągowej, po doprowadzeniu do odpowiedniego pH, rozlałam do probówek po 5 cm³ (pH sprawdzałam po 3-ej sterylizacji na potencjometrze elektrodą chinchydronową) szczepiłam 3 oczkami płynnej 24 godzinnej kultury o pH 7,0 i umieszczałam w termostacie o odpowiedniej temperaturze.

Rozwój określałam ze zmętnienia, sprawdzając pierwszy raz po 3 godz. od zaszczepienia — a następnie co godzinę. Tak częste badanie było konieczne dla oznaczenia początku rozwoju (pierwszego zmętnienia), gdyż w bardzo silnie i szybko rozwijających się hodowlach różnice zacierały się prędko.

Badania prowadziłam dla bakterii Nr. 8, 27 i 26.

Wyniki poszczególnych doświadczeń są zebrane w tablicach 16, 17, 18.

TABLICA 16.

Bakt. Nr. 8.

	pH 5	pH 7	pH 8
12 ^o	—	36 ^h	36 ^h
22 ^o	—	6 ^h	7 ^h
30 ^o	24 ^h —36 ^h	4 ^h	4 ^h —5 ^h
37 ^o	24 ^h	4 ^h	4 ^h
42 ^o	—	3—4 ^h	4 ^h

TABLICA 17.

Bakt. Nr. 27.

	pH 5	pH 7	pH 8
12 ^o	—	24 ^h —30 ^h	36 ^h —48 ^h
22 ^o	—	7 ^h —8 ^h	6 ^h —7 ^h
30 ^o	24 ^h —48 ^h	> 4 ^h	4 ^h
37 ^o	36 ^h	4 ^h	4 ^h
42 ^o	—	> 3 ^h	3 ^h

TABLICA 18.

Bakt. Nr. 26.

	pH 5	pH 7	pH 8
12 ^o	—	36 ^h —48 ^h	36 ^h
22 ^o	—	7 ^h —8 ^h	7 ^h
30 ^o	36 ^h —48 ^h	5 ^h	5 ^h
37 ^o	—	4 ^h	> 4 ^h
42 ^o	—	—	12 ^h

Z przytoczonych wyżej tablic wynika:

1) Zarówno pH pożywki jak i temperatura otoczenia mają duży wpływ na szybkość rozwoju wegetatywnego badanych bakterii.

2) Dla 3 badanych pH temperatury optymalne mogą być różne (Tablica 19).

TABLICA 19.

	pH 5	pH 7	pH 8
Bakt. 8	37°	42°	37°
Bakt. 27	30°	42°	42°
Bakt. 26	30°	37°	37°

3) Dla badanych temperatur optymalne pH może być różne (Tablica 20).

TABLICA 20.

	12°	22°	30°	37°	42°
Bakt. 8	pH7 i pH8	pH 7	pH 7	pH 7	pH 7
Bakt. 27	pH 7	pH 8	pH 7	pH 7	pH 7
Bakt. 26	pH 8	pH 8	pH7 i pH8	pH 8	Kielkuje tylko w pH 8

4) Pewien zespół pH i temperatury jest najkorzystniejszy dla rozwoju komórek wegetatywnych badanych bakterii (Tablica 21).

TABLICA 21.

	Temp. w °C	pH
Bakt. 8	42°	pH 7
Bakt. 27	42°	pH 7
Bakt. 26	37°	pH 8
<i>B. cepae</i> *)	30°	pH 7

5) Nie można wprawdzie mówić oddzielnie o optymalnym pH lub optymalnej temperaturze dla rozwoju komórek wegetatywnych badanych bakterii.

Można jednak stwierdzić, że z pośród 3 badanych pH — pH 5,0 jest najmniej odpowiednim dla wzrostu. Wszystkie badane bakterie w pożywce o tym pH we wszystkich tempe-

*) *B. cepae* — dane zaczerpnięte z pracy R. Edelsztejn-Kossowej.

raturach albo nie rozwijały się zupełnie, albo rozwijały się bardzo wolno i słabo — zawsze najgorzej. Właściwie tylko w poszczególnych temperaturach mogły się bakterie rozwijać w pożywce o pH 5 (Bakt. 8 w 30° i 37° C. Bakt. 27 w 30° i 37° C, Bakt. 26 w 30° C).

6) Obniżenie temperatury do 12° C działa silnie hamująco na szybkość i na intensywność rozwoju wegetatywnego badanych bakterii.

7) Różnice w szybkości rozwoju badanych gatunków bakterii w granicach pH 7 i 8 są nieznaczne.

Przechodząc teraz do zestawienia wpływu pH i temperatury na kiełkowanie spor i na rozwój wegetatywny, muszę stwierdzić, że:

1) Najodpowiedniejsze warunki pH i temperatury dla kiełkowania spor i dla rozwoju wegetatywnego (Tablica 7 i 21)

są dla tych dwóch różnych procesów różne, jak to wykazują wykresy V i VI.

2) Kielkowanie spor w danych temperaturach zachodzi w szerszych granicach pH niż rozwój vegetatywny. W pożywce o pH 5 badane bakterie rozwijają się bardzo źle lub nie rozwijają się wcale — tymczasem dla kiełkowania spor pH 5 nie stanowi przeszkody.

3) Zarówno dla kiełkowania spor jak i dla wzrostu vegetatywnego obniżenie temperatury do 12° C ma wpływ silnie hamujący.

III. WPLYW pH ŚRODOWISKA NA ODPORNOŚĆ SPOR NA OGRZEWANIE W 100° C.

Do rozpuszczonego w próbówce przy 100° C agaru (2% agaru, 1,5% peptonu, 2% glukozy na wodzie wodociąg.) o podanym pH, szczepiono 3 igłami spory z hodowli agarowych dwumiesięcznych. Zawiesinę tę ogrzewano w 100° C (aparat

Kocha) przez różny okres czasu, począwszy od 15'. Po wyjęciu z aparatu Kocha skłócano dokładnie zawartość próbówki i wylewano z niej 3 równoległe szalki agarowe o pH 7. Szalki umieszczano w termostacie przy 30° C. Po 24^h sprawdzano wzrost na szalkach. Szalki niezarośnięte ponownie obserwowano jeszcze w ciągu trzech następnych dni.

Wyniki doświadczeń tych zestawione są w tablicy 22.

TABLICA 22.

	pH 5		pH 7		pH 8	
	„Czas *) niezabój- czy“	„Czas **) zabój- czy“	„Czas niezabój- czy“	„Czas zabój- czy“	„Czas niezabój- czy“	„Czas zabój- czy“
Bakt. 8	6 ^h		61'		2 ^h 30'	
		7 ^h		65'		
Bakt. 27.	6 ^h		60'		1 ^h 30'	
		7 ^h		65'		
Bakt. 26.	6 ^h		40'		2 ^h 30'	
		7 ^h		41'		
<i>B. cepae</i>			6'			
				7'		

Z tablicy 22 wynika, że u trzech badanych gatunków bakterii najszybciej zostały zabite spory w agarze z pożywką o pH 7 — najpóźniej w agarze o pH 5.

W obszernej literaturze, dotyczącej wytrzymałości spor na działanie wysokiej temperatury, nie spotyka się nawet wzmianki o podobnym zjawisku. Chcąc więc nieco wyświetlić sprawę osłabienia niejako działania wysokiej temperatury w agarze przez [pH] — zajęto się nią bliżej.

Przede wszystkim starano się stwierdzić, czy czynnikiem działającym było stężenie [H⁺] czy też może jony Cl⁻ (pożyw-

*) „Czas niezabójczy” — oznacza w tej tablicy najdłuższy okres czasu ogrzewania, po którym spory jeszcze kiełkowały, tworząc kolonie.

**) „Czas zabójczy” — najkrótszy okres czasu ogrzewania, po którym spory już nie tworzyły kolonii.

ka była zakwaszana HCl). Należało zatem zbadać wpływ różnych kwasów na odporność spor w 100°C przy pH 5. Przygotowano więc na wodzie destylowanej ze szkła roztwory kilku kwasów do stężenia $[\text{H}^+] = 5$ (sprawdzone na potencjometrze elektrodą chinhydronową). Użyte do doświadczeń roztwory kwasów miały pH: $\text{CH}_3\text{COOH} - 5,1$; $\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{COOH} - 5,0$; $\text{H}_3\text{PO}_4 - 5,0$; $\text{HNO}_3 - 5,0$; $\text{HCl} - 5,1$; $\text{H}_2\text{SO}_4 - 5,0$.

Rozpoczynając doświadczenie, próbkę z danym kwasem ogrzewano przez 15' w gotującej się wodzie, szczepiono ją następnie 3 igłami spor z hodowli agarowych dwumiesięcznych. Zawiesinę tę ogrzewano w 100°C (aparatus Kocha) przez różny okres czasu, począwszy od 41' (41' zostało ustalone w poprzednim doświadczeniu jako „czas zabójczy” dla badanych spor).

Po wyjęciu z aparatus Kocha skłócano dokładnie zawartość próbki i wylewano z niej trzy równoległe szalki agarowe o pH 7, z którymi postępowano jak w doświadczeniu pierwszym.

Wyniki doświadczenia podane są w tablicy 23.

Z tablicy 23 wynika, że

1^o wszystkie użyte w doświadczeniu kwasy o $\text{pH} \pm 5$ wywierają pewien hamujący wpływ na działanie wysokiej temperatury na spory badanych bakterii;

2^o między poszczególnymi kwasami istnieją różnice w natężeniu ich wpływu. (Najsłabiej zaznaczyło się to dla bakterii Nr. 8);

3^o Najsilniej działają w kierunku osłabienia wpływu wysokiej temperatury na spory badanych bakterii aniony SO_4 i Cl .

Należy więc przypuszczać, że w zjawisku zmniejszenia działania wysokiej temperatury na spory badanych bakterii w kwasach o pH 5 biorą udział obydwa komponenty — stężenie $[\text{H}^+]$ i rodzaj anionu. Doświadczenie wyżej przytoczone nie wyjaśniło jednak, który z tych dwu czynników jest decydujący.

W następnym więc doświadczeniu, przeprowadzonym już tylko dla bakterii 26, przygotowano roztwory tych samych kwasów o pH 1, 2, 3, 4. Sądzone bowiem, że przy większych stężeniach $[\text{H}^+]$ wyraźniej wystąpią różnice pomiędzy poszczególnymi kwasami.

TABLICA 23.

	H ₂ O destylow. ze szkła		CH ₃ COOH pH 5,4		CH ₃ CH(OH)COOH pH 5,0		H ₃ PO ₄ pH 5,0		HNO ₃ pH 5,0		HCl pH 5,1		H ₂ SO ₄ pH 5,0	
	Czas niezabójczy	Czas zabójczy	Czas niezabójczy	Czas zabójczy	Czas niezabójczy	Czas zabójczy	Czas niezabójczy	Czas zabójczy	Czas niezabójczy	Czas zabójczy	Czas niezabójczy	Czas zabójczy	Czas niezabójczy	Czas zabójczy
Bakteria 8	3h30'		3h30'	*	3h30'	*	3h	*	3h30'	*	3h	*	3h30'	*
		4h		4h30'		4h30'		4h30'		4h30'		4h30'		4h30'
Bakteria 27	2h30'		2h		2h30'		4h		4h		4h			
		3h		2h30'		3h		4h30'		4h30'		4h30'		4h30'
Bakteria 26	2h30'		2h		2h30'		2h	*	2h30'		4h			
		3h		2h30'		3h		3h						4h30'

[Miejsca w tablicy zaopatrzone gwiazdką * oznaczają, że w pośrednich, w odstępach 30' robionych próbach, nie było zgodności wyników — raz otrzymano wzrost na szalkach — to znów go nie było; podobne zjawisko spotyka się bardzo często w literaturze, dotyczącej wytrzymałości spor na wysoką temperaturę (Bredemann, Eckelmann, Magoon, Neide, Wahl, Williams)].

Użyte w doświadczeniu roztwory kwasów miały pH:

HCl	1,1;	2,1;	3,1;	3,9
H ₂ SO ₄	1,3;	2,1;	3,0;	3,9
HNO ₃	1,0;	1,8;	2,8;	3,8
H ₃ PO ₄	0,95;	1,9;	2,9;	4,0
CH ₃ COOH	—	2,0;	2,9;	3,9
CH ₃ CH(OH)COOH	—	1,9;	3,0;	4,0

Wyniki doświadczenia ilustruje tablica 24.

Z tablicy 24 wynika, że istotnie, w niższych pH różnice w działaniu poszczególnych kwasów wystąpiły wyraźniej, a mianowicie: przy stężeniu $[H^+] = 2$ najsilniej działały kwasy: HCl i H₂SO₄, najsłabiej — kwasy organiczne, octowy i mlekowy, oraz kwas fosforowy.

Kwas azotowy zajmował stanowisko pośrednie.

Można je więc uszeregować następująco:

Z tego wyraźnie widać, że decydujące znaczenie przy pH 2 ma nie $[H^+]$, gdyż było wszak równe dla wszystkich użytych kwasów — a aniony tych kwasów.

Z tablicy 24 wynika również, że użyte w doświadczeniu kwasy można podzielić na następujące grupy, zachowujące się różnie przy zmianach pH od 1 — 5.

I grupa: kwas octowy i mlekowy (działające słabo) w miarę podwyższania pH od 1 do 5 zwiększają swoje „ochronne działanie”.

II grupa: kwas azotowy (działający średnio) — w granicach pH od 2 do 4 zachowuje się jednakowo („czas nie zabójczy” stale = 2^h; „zabójczy” = 2^{h30'}) a dopiero w przy pH 5 działa nieco silniej (czas niezabójczy = 2^{h30'} czas zabójczy = 3^h).

III grupa: HCl i H₂SO₄ (kwasy działające bardzo silnie) ich „działanie ochronne” w granicach pH 1 — 3 pozostaje jednakowo silne, a w miarę dalszego podwyższania pH od 3 do 5 ich „działanie ochronne” nieco słabnie ¹⁾.

Wskutek tego więc, że przy zmiania pH od 1 do 5 kwasy słabo działające (I grupa) zwiększają swoje „ochronne dzia-

¹⁾ Kwas fosforowy przy zmianie pH od 1 — 5 zachowuje się bardzo nierówno, tak że nie o nim nie można powiedzieć — raczej jednak należałoby go zaliczyć do grupy I.

TABLICA 24.

pH	CH ₃ COOH		CH ₃ CH(OH)COOH		H ₃ PO ₄		HNO ₃		HCl		H ₂ SO ₄	
	Czas niezabójczy	Czas zabójczy	Czas niezabójczy	Czas zabójczy	Czas niezabójczy	Czas zabójczy	Czas niezabójczy	Czas zabójczy	Czas niezabójczy	Czas zabójczy	Czas niezabójczy	Czas zabójczy
pH 1							2h	5h30'		6h	6h	
						41'		2h30'	6h			
pH 2	60'		60'		60'		2h	5h30'		5h30'		
				1h30'		1h30'		2h30'	6h		6h	
pH 3			41'		3h30'		2h	5h30'		6h		
				60'		4h		2h30'	6h			
pH 4	2h		4h		5h		2h	5h				
					4h30'	5h30'		2h30'	5h30'		5h	
pH 5 z tabl. 23	2h		2h30'		2h		2h30'		4h			
				3h		3h		3h	4h30'		4h30'	

łanie”, kwas działający średnio (II grupa) zachowuje się jednakowo, a kwasy silnie działające (III grupa) zmniejszają swe „ochronne działanie” — w wyższych pH (n. p. w użytym w poprzednim doświadczeniu pH 5), różnice pomiędzy poszczególnymi kwasami nie są tak wyraźne.

Nawiązując do pierwszego doświadczenia, można obecnie wypowiedzieć przypuszczenie, że zmniejszenie szkodliwego działania wysokiej temperatury na spory, ogrzewane w 100°C w agarze zakwaszonym do pH 5 przy pomocy HCl, jest wynikiem wpływu następujących czynników:

1^o koncentracji $[H^+]$;

2^o wpływu anionu Cl^- ;

3^o prócz tego również musi mieć wpływ użycie środowiska koloidalnego, działającego „ochronnie” (agar), jak i dodatek pożywki — gdyż w doświadczeniu pierwszym spory w agarze z pożywką o pH 5 wytrzymywały ogrzewanie w 100°C w ciągu 7^h, zaś przy stosowaniu czystych roztworów kwasów — również o pH 5, wytrzymywały najwyżej 4^{h30'}.

STRESZCZENIE WYNIKÓW.

Z przytoczonych wyżej doświadczeń, przeprowadzonych na czterech gatunkach bakterii, wynika:

1^o temperatura otoczenia i pH środowiska mają duży wpływ zarówno na szybkość kiełkowania spor jak i na szybkość rozwoju wegetatywnego;

2^o dla kiełkowania spor i dla wzrostu badanych bakterii istnieje pewien zespół pH i temperatury najbardziej optymalny — może być on jednak różny dla tych dwóch różnych procesów;

3^o kiełkowanie spor badanych bakterii w danych temperaturach zachodzi w szerszych granicach pH niż rozwój wegetatywny. W pożywce o pH 5 spory kiełkują bez dużego opóźnienia, natomiast w tejże pożywce rozwój wegetatywny tych samych bakterii we wszystkich badanych temperaturach jest bądź zupełnie powstrzymywany bądź nader opóźniony i osłabiony;

4^o obniżenie temperatury do 12°C zmniejsza bardzo silnie szybkość zarówno kiełkowania spor jak i rozwoju wegetatywnego;

5° w przyjętych granicach temperatur (12°C — 42°C) i pH (5 — 8), silniej wpływają na szybkość kiełkowania badanych spor temperatura niż pH;

6° Fizjologicznie i morfologicznie nader bliskie formy bakterii dają się łatwo rozróżnić odmiennym działaniem temperatury i pH na szybkość rozwoju wegetatywnego i kiełkowania ich spor (tut. szczególnie szczepy Nr 8 i 27 *Bacillus anthracoides*).

7° pH środowiska, w którym spory są ogrzewane, ma wpływ na ich odporność na działanie wysokiej temperatury; gdy tym środowiskiem są kwasy — działa nie tylko $[\text{H}^+]$ lecz również anion użytego kwasu — i to w pewnych wypadkach decydująco;

8° Badane spory najodporniejsze były na działanie temperatury 100°C , gdy ogrzewano je w agarze o pH 5.

Panu Profesorowi Dr Kazimierzowi Bassalikowi, pod którego kierunkiem praca ta była wykonana w Zakładzie Fizjologii Roślin Uniwersytetu J. Piłsudskiego, składam głębokie wyrazy wdzięczności i podziękowania za Jego cenną pomoc i światłe rady.

BIBLIOGRAFIA.

1. Beechhold, H. Die Kolloide in Biologie und Medizin. 1912. I, II. Teil.
2. Blau, O. Ueber die Temperaturmaxima der Sporenkeimung und der Sporenbildung, sowie die supramaximalen Tötungszeiten der Sporen der Bakterien, auch derjenigen mit hohen Temperaturminima. C. t. Bakt. II. 15, 97, 1905.
3. Bredemann, G. Bacillus amylobacter A. M. et Bredemann in morphologischer, physiologischer und systematischer Beziehung. C. f. Bakt. II. 23, 385, 1909.
4. Buglia, G. Über die Wirkung der Wärme auf Eiweisskolloide II. Gleichgewichtsveränderungen von Muskeln bei verschiedenen Temperaturen in Koch salzlösungen, mit und ohne Zusatz von verschiedenen HCl und NaOH-Mengen. Arch. intern. de Physiologie 8, 273, 1909.
5. Darányi, J. Das Wesen der Bakteriensporenbildung und ihre Stellung im Fortpflanzungssystem. C. f. Bakt. I. O. 117, 543, 1930.
6. Dieudonné, G. Neue Beiträge zur Kenntniss der Biologie der Bakterien. Biolog. Zentrbl. 15, 103, 1895.

7. Edelsztejn Kossowa, R. Bakterioza cebuli jadalnej (*Allium cepa* L.). Acta Soc. Bot. Pol. Vol. X, Nr 4, 495, 1933.
8. Engberding, D. Vergleichende Untersuchungen über die Bakterienzahl im Ackerboden in ihrer Abhängigkeit von äusseren Einflüssen. C. f. Bakt. II. 23, 569, 1909.
9. Fehér, M. Experimentelle Untersuchungen über den Einfluss von Temperatur und Wassergehalt des Bodens auf die Lebenserscheinungen der Bodenbakterien. Arch. f. Mikrob. 4, 447, 1933.
10. Fischöder. Beiträge zur Kenntnis des Milzbrandes. C. f. Bakt. I. 54, 320, 1909.
11. Garbowski, Z. Über einem extrem verkürzten Entwicklungsgang bei zwei Bakterienspecies. Biochem. Zentrbl. 27, 717, 1907.
12. Gottheil, O. Botanische Beschreibung einiger Bodenbakterien. C. f. Bakt. II. 7, 430, 1901.
13. Holzmüller, A. Die Gruppe des *Bacillus mycoides* Flügge. C. f. Bakt. II. 23, 304, 1909.
14. Itano and Neill. Influence of temperature and hydrogen ion concentration upon the spore cycle of *Bacillus subtilis*. Journ. Gen. Phys. 1, 421, 1918—1919.
15. Janke, A. und Berau, F. Über die mikrobicide Wirkung von organischen Säuren und ihren Kupfersalzen. Arch. f. Mikrob. 4, 54, 1933.
16. Kurzweily, W. Über die Widerstandsfähigkeit trockener pflanzlicher Organismen gegen giftige Stoffe. C. f. Bakt. II. 14, 751, 1905.
17. Lafar, F. Handbuch der Technischen Mykologie. 1904 — 1907, 5. Kapitel. Dauerformen und Gonidien.
18. Lewis, I. M. Cell inclusions and endospore formation in *Bacillus mycoides*. Journ. of Bact. 28, 133, 1934.
19. Magoon, C. A. Studies upon bacterial spores. 2. Increasing resistance to heat through selection. Journ. Inf. Dis. 38, 429, 1926.
20. Meyer, A. Die Zelle der Bakterien, 1912.
21. Mencl, A. Einige Beobachtungen über die Struktur und Sporenbildung bei symbiotischen Bakterien. C. f. Bakt. II. 12, 559, 1904.
22. Neide, E. Botanische Beschreibung einiger Sporenbildenden Bakterien. C. f. Bakt. II. 12, 1904.
23. Neumann, H. Die Isolierung und Entwicklung von Anäerobiersporen: C. f. Bakt. I. O. 115, 100, 1929.
24. Ostwald, Wo. Einfluss von Elektrolyten auf die Temperaturkoagulation von Eiweisslösungen. Koll. Zeitschr. 2. O. 108 u. 138, 1907 — 1908.
25. Ostwald, Wo. Über den Einfluss von Säuren und Alkalien auf Quellung von Gelatine. Arch. f. Physiol. 108, 563, 1905.
26. Pauli, Wo. Jonisation, Hydratation und optische Drehung von Eiweiss. Koll. Zeitschr. 7, 241, 1910.
27. Pauli, Wo u. Samec, M. Über Löslichkeitsbeeinflussung von Elektrolyten durch Eiweisskörper. Biochem. Zeitschr. 17, 235, 1909.
28. Preisz, H. Untersuchungen über die Keimung von Bakteriensporen. C. f. Bakt. I. O. 82, 321, 1919.

29. Ruzicka, V. Die Cytologie der sporenbildenden Bakterien und ihr Verhältniss zur Chromidienlehre. C. f. Bakt. II. 23, 289, 1909.
30. Schumacher, J. Das Ektoplasma der Bakterien. C. f. Bakt. I. O. 107, 161, 1928.
31. Soule, M. H. Microbie dissociation. Journ. Inf. Dis. 42, 98, 1928.
32. Vahl, C. Über Verderber von Gemüsekonserven. C. f. Bakt. II. 16, 489, 1906.
33. Virtanen, A. I. u. Pulki, L. Biochemische Untersuchungen über Bakteriensporen. Arch. f. Mikrob. 4, 98, 1933.
34. Williams, O. The heat resistance of bacterial spores. Journ. Inf. Dis. 44, 421, 1929.
35. Wund, M. Feststellung der Kardinalpunkte der Sauerstoffkonzentration für Sporenkeimung und Sporenbildung einer Reihe in Luft ihren ganzen Entwicklungsgang durchführender, sporenbildenden Bakterien-species. C. f. Bakt. I. O. 42, 97, 1906.
36. Zettnow. Über ein Vorkommen von sehr widerstandsfähigen Bacillensporen. C. f. Bakt. I. O. 66, 131, 1912.
37. Eckelmann, E. Über Bakterien, welche die fraktionierte Sterilisation lebend überdauern. C. f. Bakt. II. 48, 140, 1918.

ZUSAMMENFASSUNG.

Es wurde die Temperatur- und pH- Wirkung auf Sporenkeimung und vegetatives Wachstum von vier sporenbildenden Bodenbakterien untersucht, ferner die Abtötungszeiten für die Sporen bei verschiedenem pH bestimmt.

Als Versuchsmaterial dienten Bacillen mit den Laboratoriums—№ 8 und 27, die nahezu mit *Bacillus anthracoides* Hüppe übereinstimmten, ein nicht zu bestimmender Bacillus № 26 und *Bacillus cepae* K. Bassalik et R. Edelsztein.

Als Temperaturgrenzen wurden 12—42°C gewählt sowie eine [H⁺] von 5—8 pH.

1. Die Anfangs- und Endbeobachtungen sind inbezug auf die Wirkung der zwei untersuchten Faktoren in den Tabellen 1—15 und den Kurven I—IVa dargestellt, woraus sich der optimalste Ausmaass des untersuchten Faktorenpaares (Kurven V) ergibt.

2. Die Ergebnisse der Untersuchung über die Wirkung des gleichen Faktorenpaares auf das vegetative Wachstum

sind in den Tabellen 16 — 21 zusammengestellt, während die Kurve VI den optimalsten Ausmaass von t^0 und pH wiedergibt.

3. Die Abtötungszeiten der Sporen in Abhängigkeit von der $[H^+]$ und Anionenwirkung sind in den Tabellen 22 — 24 zusammengestellt.

*Pflanzenphysiol. Institut
der J. Pilsudski-Universität in Warszawa.*