

# Kvantitatívne sledovanie vplyvu nízkych teplôt na baktérie

J. ARPAI, M. BÂNHEGYIOVÁ, M. GRÓFOVÁ, D. LONGAUEROVÁ

V predchádzajúcich štúdiách [Arpai \* 1960 a, 1964 a] sme podali prehľad nejednotných a často si protirečiacich názorov na mechanizmus a kinetiku účinkov nízkych teplôt na mikroorganizmy. Tento stav — alebo lepšie — nedostatok v tejto oblasti priamo nabádal k experimentálnym prácam. Prístupovali sme k nim tak, že sme si najprv vypracovali metódy [\* 1959, 1960 b, c, 1961 a] a vymedzili činitele, ktoré určujúcim spôsobom vplývajú na účinnosť nízkych teplôt na mikrobiálnu bunku [\* 1961 b, 1962 a].

## Základné faktory

Účinky nízkych teplôt na živú bunku rozdeľujeme na biologické, fyzikálne a chemické.

Do prvej skupiny zaraďujeme druhové a typové vlastnosti mikróbnjej populácie, a to tak konštitutívnej, ako aj adaptívnej povahy. Sem patrí aj vplyv koncentrácie mikróbnnych buniek, ich stária a fyziologického stavu, ktorý je v priamej závislosti od životných podmienok pred a po nízkoteplotnej expozícii, resp. od fyzikálno-chemického zloženia média, v ktorom sa kultúra nachádza v čase pôsobenia nízkej teploty [\* 1960 d, 1961 d, 1962 b]. Na poslednom mieste uvedené vplyvy zaraďujeme však, pokiaľ sú fyzikálnej povahy, do druhej skupiny. Ostatne do tejto skupiny počítame vplyvy intenzity a priebehu nízkoteplotného účinku, ako sú rýchlosť poklesu teploty, jej hĺbka, dĺžka doby pôsobenia chladu, rýchlosť rozmrazovania a prípadné teplotné výkyvy [Arpai a Lifková 1961, Arpai, Behúň a Lifková 1961, \* 1963 a]. Do tretej skupiny patria chemické vplyvy prostredia, z nich niektoré znižujú, kým iné zosilňujú účinky nízkych teplôt. Ochranné látky sú predovšetkým bielkovinnej alebo lipidickej povahy. Aj niektoré cukry zvyšujú rezistenciu mikroorganizmov, a to nielen na základe zníženia eutektického bodu média, ale aj cestou metabolizmu. Za podmienok dobre vybilancovaných výživových nárokov sa totiž zvyšuje chladuvzdornosť organizmov. Na tomto sa zakladá aj ochranný účinok akcesorických látok, menovite vitamínov skupiny B-komplexu u dependentných organizmov [\* 1964 b]. Medzi látky zvyšujúce biologické účinky nízkych teplôt patria rôzne elektrolyty, resp. soli, ako aj mnohé nefyziologicky pôsobiace látky. Tieto účinkujú synergicky so zmrazovaním často už v podprahových koncentráciách. Do tejto skupiny treba ešte počítať

aj vplyvy aktuálnej acidity, hypertónie ako aj hypotónie média (\* 1961 c, 1964 c). Uvedené činitele, alebo aspoň niektoré z nich, pôsobia nielen pred a počas nízkoteplotnej expozície, ale ešte aj po rozmrazení a preto sa tieto môžu označiť ako faktory podmieňujúce reaktiváciu poškodených buniek, alebo reverzibilitu hypotermickej traumy (\* 1963 b, 1964 d, e). Otázky kryorezistencia sa metodicky sledovali až na úrovni nukleových kyselín mikróbných buniek, pričom sa študovali rozdielne reakcie mezofilných a psychrofilných organizmov so zameraním zistiť prípadné špecifické odpovede chladomilných organizmov (Arpai, Lešková, Longauerová 1964, 1965).

Z materiálov kryomikrobiologického výskumu, ktorý sme robili na tunajšom pracovisku od roku 1958, vyberáme nasledovnú kvantitatívnu štúdiu.

### Pokusná časť

Ako pokusné organizmy sa použili jednak baktérie vyskytujúce sa v mrazených potravinách, jednak také, ktoré sú morfológicky, fyziologicky resp. biochemicky dobre prebádané a dobre sa hodia pre kvantitatívne stanovenia, pričom sa charakteristickým spôsobom vzájomne rozlišujú.

V tabuľke 1 sú zostavené účinky jednorázového zmrazovania uskutočneného štandardným spôsobom pri teplotách  $-4$ ,  $-7$ ,  $-18$ ,  $-26$ ,  $-30$  a  $-78$  °C na bunkových suspenziách baktériálnych kultúr nachádzajúcich sa v pokročilejšom štádiu exponenciálnej fázy rastu. Príslušná pracovná technika bola už predchádzajúce podrobne napísaná (\* 1961 a). Štatistické vyhodnotenie výsledkov sa robilo so zameraním, aby sa zistila významnosť rozdielov jednak medzi priemernou rezistenciou sledovaných testorganizmov voči účinkom zmrazovania, jednak medzi priemernou účinnosťou aplikovaných zmrazovacích teplôt. To znamená, že pri výpočte t-hodnoty boli štatistické súbory v prvom prípade reprezentované číslami nachádzajúcimi sa v jednotlivých riadkoch tab. 1 ( $N = 11$ ), kým v druhom prípade sa podobným spôsobom vyhodnotili čísla nachádzajúce sa nad sebou v jednotlivých stĺpcoch tab. 1 ( $N = 15$ ). Týmto spôsobom vypočítaná pravdepodobnosť zhodnosti mrazuvzdornosti jednotlivých testorganizmov je v príslušných koreláciách zostavená v tab. 2.

Výsledky zhrnuté do tab. 1 možno vyhodnotiť v tom zmysle, že za metodicky daných pokusných podmienok možno testorganizmy z hľadiska ich mrazuvzdornosti zaradiť do štyroch skupín.

Do prvej skupiny sme zaradili testorganizmy, ktoré boli najcitlivejšie na germicídny účinok mrazu. Sem patria baktérie tyčinkového tvaru, t. j. baktérie v užšom slova zmysle, s výnimkou vyslovene psychrofilných druhov. Najmenšiu odolnosť ukázali kultúry *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa* a vegetatívne formy *Bacillus megatherium*. V tomto poradí citlivosti nasledovala nevysporulovaná kultúra *Clostridium sporogenes*. Medzi uvedenými testorganizmami nebola štatisticky dokázaná významná rozdielnosť v mrazuvzdornosti, ako to vidieť z tab. 2.

Osobitnú, t. j. druhú skupinu medzi testorganizmami tvorili extrémne psychrofilné tyčinky *Achromobacter album* a *Pseudomonas fluorescens*. Tieto druhy sa ukázali totiž odolnejšie ako ostatné tyčinky, čo sa pri štatistickom vyhodnotení vyjadrilo tým, že P hodnota pre vzťah rezistencie *Pseudomonas fluorescens* voči kultúre *Escherichia coli* je 0,05 a rozdiel v korelácii medzi

Tabuľka 1

Č.	Test — mikróby	% — podiel mrazom											
		poškodených buniek pri						usmrtených buniek pri					
		-4 °C	-7 °C	-18 °C	-26 °C	-30 °C	-78 °C	-4 °C	-7 °C	-18 °C	-26 °C	-30 °C	-78 °C
I.	<i>Micrococcus percitreus</i>	15	10	32	25	30	43	6	18	48	44	39	23
II.	<i>Micrococcus cinnabareus</i>	10	22	40	34	18	35	10	15	37	40	41	34
III.	<i>Sarcina lutea</i>	2	18	31	27	29	21	0	8	12	26	36	17
IV.	<i>Streptococcus faecalis</i>	5	25	10	8	15	11	2	14	25	35	29	20
V.	<i>Escherichia coli</i>	50	41	11	13	5	24	21	52	84	79	89	69
VI.	<i>Serratia marcescens</i>	32	22	12	10	11	22	10	70	82	88	84	75
VII.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	25	33	12	12	20	25	18	63	85	83	76	68
VIII.	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	17	30	25	19	30	38	5	38	53	58	45	43
IX.	<i>Achromobacter album</i>	5	16	34	26	33	38	0	12	38	50	59	52
X.	<i>Bacillus megatherium</i>	38	50	17	8	13	30	26	36	78	89	80	67
XI.	<i>Clostridium sporogenes</i>	15	33	5	10	2	14	8	44	88	83	91	80

odolnosťou kultúry *Achromobacter album* a kultúry *Escherichia coli* je až 0,01. Podobne významná rozdielnosť je aj medzi odolnosťou *Achromobacter album* a *Bacillus megatherium*, ktorá je zaistená v hraniciach  $P = 0,02$ .

Na tomto mieste treba ukázať, že podľa údajov v tabuľke 1 sa javí istá rozdielnosť medzi kvótou odumierania u *Pseudomonas fluorescens* a *Pseudomonas aeruginosa*. Táto rozdielnosť nie je však štatisticky dostatočne zaistená, ako to vyplýva z tabuľky 2. Bez zaujímavosti nie je ani nízka mrazuvzdornosť vegetatívnych foriem sporulujúcich tyčíniek.

Tretiu skupinu predstavovali kokoforné testmikróby, ktoré sa ukázali najodolnejšie proti mrazu. Na základe hodnôt v tabuľke 1 je ich poradie začínajúc najodolnejším druhom toto: *Streptococcus faecalis*, *Sarcina lutea*, *Micrococcus cinnabareus* a *Micrococcus percitreus*. Uvedený sled však nie je štatisticky zabezpečený ( $P > 0,1$ ). Naproti tomu rozdiely v mrazuvzdornosti medzi kokovitými a tyčinkovitými baktériami dosahovali až najvyššiu štatistickú významnosť ( $P < 0,001$ ).

V spojitosti so sledovaním mrazuvzdornosti kokoforných baktérií treba znovu spomenúť častejšie pozorovaný zjav, že zmrazovaním dôjde k „stúpnutiu“ počtu kokovitých mikroorganizmov. Pri čistých kultúrach možno tento zjav vysvetliť jedine tým, že pri zmrazovaní praskajú, resp. sa rozpadajú bunkové zhľuky, a to sa pri kvantitatívnom stanovovaní zárodkov najmä platňovou metódou, javí ako zvýšenie počtu vyrastených kolónií, t. j. zdanlivým rozmnožovaním kokov. V zmesových kultúrach, resp. v mikróbnom spoločenstve pri-

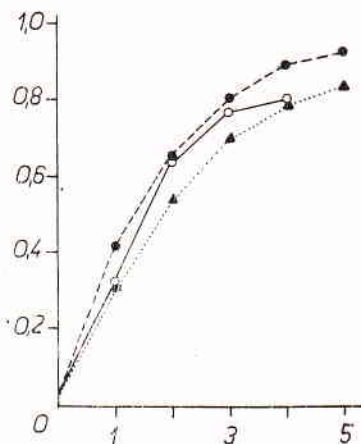
Tabuľka 2

I.											
II.	0,1										
III.	0,1	0,1									
IV.	0,1	0,1	0,1								
V.	0,001	0,001	0,001	0,001							
VI.	0,05	0,05	0,001	0,001	0,1						
VII.	0,05	0,02	0,001	0,001	0,001	0,1					
VIII.	0,1	0,1	0,1	0,1	0,05	0,1	0,1				
IX.	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1			
X.	0,01	0,01	0,001	0,001	0,1	0,1	0,1	0,1	0,02		
XI.	0,1	0,1	0,1	0,05	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	

Označenie kultúry I. II. III. IV. V. VI. VII. VIII. IX. X. XI.

Hranica významnosti rozdielov v mrazuvzdornosti medzi jednotlivými druhmi sledovaných baktérií, vyjadrená pravdepodobnosťou zhodnosti výsledkov ( $P$  — hodnoty).

stupuje k tomu aj možnosť, že sa rezistentné koky pri zmrazovaní zbavujú konkurujúcej, na mráz citlivej mikroflóry, čo umožňuje rast aj takým bunkám, ktoré by sa v hustej kultúre, zatlačované ostatnou mikroflórou, neboli rozmnožovali. Uvedený činiteľ sa však dá eliminovať tým, že sa kvantitatívne stanovenie robí, resp. že sa kolónie počítajú len pri vyššom riedení. Prvý činiteľ, t. j. vplyv dezagregácie, snažili sme sa objasniť sledovaním 2 typov kokiformných testorganizmov. Prvý typ reprezentovali kultúry *Micrococcus percitreus*, *Micrococcus cinnabareus*, ktoré sme zvolili za testorganizmy preto, že za daných kultivačných podmienok rástli vo forme ojedinelých buniek, zriedkavo zoskupené po 2 až 3. Sledovanie sa robilo na natívnom preparáte pomocou fázovej kontrastnej mikroskopie. Druhý typ predstavovali kultúry *Sarcina lutea* a *Streptococcus faecalis*, ktoré za tých istých podmienok rástli v zhľukovaných reťazcoch, resp. oktetoch. Pretože výsledky nasvedčujú, že u kokovitých mikróbov, vytvárajúcich mikrokolónie, je percentuálny podiel odumierania nižší ako u kokov v malej miere sa asociujúcich, predpokladáme, že sme týmto nepriamo potvrdili už vyslovenú domnienku. Aj ďalšia okolnosť poukazuje na to, že následkom mrazovej dezagregácie mikrokolónií možno vysvetliť relatívne vysoké kvantitatívne nálezy kokovitých baktérií po zmrazovaní. To je rozdiel medzi výsledkami stanovenia celkového počtu zárodkov nefelometrickou metódou a počítaním kolónií vyrastených na agarových platinách. V každom prípade sme zistili pomocou nefelometrie vyššie percento odumierania po zmrazovaní ako platňovou metódou. Vysvetľovali sme si to tým, že dezagregácia baktériových zhľukov skresľuje v menšej miere výsledky nefelometrického merania. Zdôrazňujeme, že „v menšej miere“, pretože aj pri tomto princípe sa dezagregácia a ňou vyvolaná zvýšená disperzia prejavuje v intenzite Tyndalovho efektu.



Obr. 1. Znázornenie germicidného účinku opätovného zmrazovania na mikrokoky. Plná čiara spája pokusne získané hodnoty, prerušované čiary spájajú vypočítané hodnoty, a to spodná zodpovedá hodnote  $d = d_1$ , kým vrchná  $d = 1 - (1 - d_1)^{1/2}$ .

Na osi úsečiek = počet zmrazovaní, na osi poradníc = kvóta odumierania.

Možno tu ešte poznamenať, že aj u tyčinkových baktérií sa do istej, hoci štatisticky bezvýznamnej miery javili rozdiely v percentuálnom podiele prežívajúcich buniek v súlade s mierou agregácie mikróbných buniek.

V prípade opätovného zmrazovania sa zvyšuje kvóta odumierania exponenciálnym spôsobom, ako to vidieť z grafov na obraze 1 resp. 2. Matematické vyjadrenie priebehu odumierania môže vychádzať z výrazu pre jednorázové resp. prvé zmrazovanie:

$$d_1 = D_1/N,$$

kde  $d_1$  je spozorované odumieranie po prvom zmrazovaní,

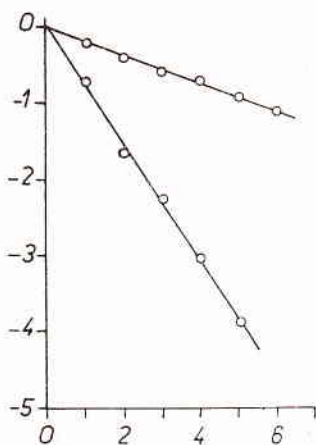
$D_1$  skutočne usmrtené bunky,

$N$  celkový počet buniek.

Poznamenáva sa, že pojem zdánlivé odumieranie následkom zmrazovania má vyjadrovať tú skutočnosť, že k odumieraniu buniek dochádza v sledovanom čase aj bez účinku nízkych teplôt. Keď sa dosadí namiesto vzťahu počtu prežívajúcich k celkovému počtu buniek, t. j. za výraz  $P/N$  hodnota  $a$ , potom platí  $d_1 = (1 - a_1)$  pre prvé zmrazovanie. Pri ďalších zmrazovaniach ( $n$ ) potom kvóta prežívajúcich sa dá vyjadriť nasledovne:

$$d_n = \sum_{i=1}^n d_i \cdot a^{n-i} = \frac{d (a^n - 1)}{a - 1} = 1 - a^n$$

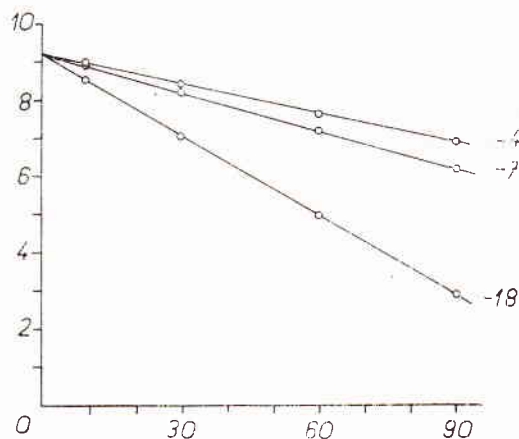
Na obraze 1 sú vykreslené krivky odumierania zodpovedajúce pokusne nájdeným hodnotám  $d$ , ako aj teoreticky vypočítaným, keď  $d = d_1$ , resp. keď  $d = 1 - (1 - d_2)^{\frac{1}{2}}$ . Experimentálne hodnoty sú výsledky pokusov s opätovným zmrazovaním mikrokokov v tekutom dusíku ( $-198^\circ\text{C}$ ). Výsledky uka-



Obr. 2. Pokles kvóty prežívajúcich u *Pseudomonas fluorescens* a *Escherichia coli* pri opakovanom zmrazovaní. Na osi úsečiek = počet zmrazovaní, na osi poradníc = log počtu prežívajúcich po zmrazovaní / počet živých buniek pred zmrazovaním.

zujú, že kvóta odumierania nie je konštantná, ale vzrastá spočiatku počtom opakovaných zmrazovaní. Dá sa to vysvetliť tým, že pri prvom a každom ďalšom zmrazovaní dochádza k oslabeniu bakteriálnych buniek, čím baktérie sice ešte neodumrú, avšak stávajú sa citlivejšími na účinky nasledujúcich nízkoteplotných expozícií. Po väčšom počte opakovaného zmrazovania, v danom prípade sa to javí už po štvrtom zmrazovaní, sa znižuje kvóta odumierania. Tento jav je v súlade s našou predstavou o selekčnom oddelení buniek vyznačujúcich sa zvýšenou mrazuvzdornosťou. Fyziologická charakteristika takto vyselektovaných baktérií bola uvedená v osobitnej štúdii (\* 1963 b).

Kvantitatívne výsledky stanovovania germicidnosti sa vyhodnotili vo vzťahu k morfológii bunky v snahe zistiť matematickú koreláciu medzi mrazuvzdornosťou bunky a jej dĺžkoširokovým koeficientom. Rozbor výsledkov mikroskopických meraní nasvedčuje, že baktérie zaradené z hľadiska ich citlivosti na účinky zmrazovania do prvej skupiny majú dĺžkoširokový koeficient 2 až 6. V druhej skupine, do ktorej sme zaradili pokusné organizmy s relatívne menšou citlivosťou, vychádza príslušný dĺžkoširokový pomer na 1,1 až 3. V tretej skupine, kde boli zaradené kukoformné bunky s najvyššou odolnosťou voči mrazu, sa korelačné koeficienty buniek rovnali alebo sa približovali k hodnote 1, ktorá by prislúchala ideálne guľatým kokom. Poznomenáva sa, že hodnoty koeficientov 4 až 6 zodpovedajú koliformným typom s rozmermi  $0,5 \times 2 - 3 \mu$ .



Obr. 3. Pribeh odumierania buniek *Micrococcus perditreus* v závislosti od času a teploty zmrazovania. Na osi úsečiek = čas v dňoch, na osi poradnic = log počtu prežívajúcich baktérií.

Súhrnne sa dá povedať, že sa všeobecne javí akoby bunky guľatého tvaru boli odolnejšie než pozdĺžne, čo je v zrejmom súlade s fyzikálnymi zákonmi o pevnosti telies. Podľa toho odolnosť guľovitej bunky voči mechanickému poškodeniu, vyvolanému tlakom rozpinavosti vody pri zmrazovaní, bude väčšia ako bunky valcovitého tvaru. Aj v tomto prípade, že by sa germicidnosť nízkych teplôt vysvetľovala na základe chemických procesov, obostojí naša



domnienka. Vo vzťahu k množstvu bunkovej hmoty je totiž plocha povrchu u tyčinkových mikróbov väčšia ako u kokov a tak aj vymrazovanie vody z bunkových štiav môže u tyčínok intenzívnejšie prebiehať ako u kokov. Tým dochádza rýchlejšie k zahusteniu obsahu bunkovej šťavy, ktorá môže mať autointoxikačný vplyv. Aj ostatné, v našich predchádzajúcich štúdiách (\* 1960 a, 1964 a) prediskutované mechanizmy poškodzovania mikróbovej bunky mrazom sa dajú uviesť do súladu s našou predstavou o limitujúcom vplyve korelácií množstva bunkovej hmoty k veľkosti povrchu. Oproti námietke, že tvar mikróbných buniek je veľmi premenlivý a vo vysokej miere závislý od životných podmienok, resp. od fyziologického stavu kultúry, môžeme znova poukázať na naše práce, z ktorých vyplýva, že aj mrazuvzdornosť závisí vlastne od tých istých podmienok. Pri podrobnejšom rozbere činiteľov, vplyvujúcich na tvar mikróbovej bunky z jednej strany a na jej mrazuvzdornosť zo strany druhej zisťujeme s prekvapením nápadnú súbežnosť. Napríklad v prípadoch, keď následkom zvýšenej kultivačnej teploty dôjde u niektorých baktérií k abnormálnemu predĺženiu baktérievej bunky, mohli sme spozorovať aj zníženú odolnosť kultúry voči účinkom zmrazovania. Práve tak aj bunky v štádiu delenia, keď mali pretiahnutejší tvar, boli citlivejšie na mráz ako v pokojnej fáze. To samozrejme neznamená, že citlivosť, alebo naopak odolnosť voči mrazu je výlučne podmienená tvarom bunky. Je známe, že biologické efekty nikdy nepodmieňuje výlučne jeden faktor. Nepodceňujeme mnohostranné závislosti germicídnosti mrazu. Vyslovujeme tým len domnienku, že uvedený vzťah je jedným z činiteľov podmieňujúcich rezistenciu mikroorganizmov proti mrazu, ktorý sa nám za zvolených pokusných podmienok výrazne prejavil.

Pri vyhodnotení vplyvu druhého premenného činiteľa, t. j. zmrazovacej teploty, zisťujeme, že najväčší germicídny efekt sa dosiahol pri  $-26^{\circ}\text{C}$ . Pri ďalších o niečo vyšších resp. nižších teplotách, t. j.  $-18^{\circ}\text{C}$ , resp.  $-30^{\circ}\text{C}$  a  $-78^{\circ}\text{C}$ , bola kvóta odumierania len omálo menšia. Zistené rozdiely nedosahovali v nijakom prípade konvenčné hranice významnosti, t. j.  $P = 0,05$ . Tieto výsledky sú v rozpore s názormi, podľa ktorých majú teploty málo pod bodom mrazu vyššiu, resp. najvyššiu germicídnosť. To je však nepravdepodobné už aj z toho dôvodu, že bunkové šťavy, vďaka obsahu cukrov a iným, hydroxylové skupiny obsahujúcim zlúčeninám, majú hlboko znížený bod mrazu, ktorý leží najčastejšie pri  $-2^{\circ}\text{C}$  až  $-4^{\circ}\text{C}$ , v niektorých prípadoch až pri  $-8^{\circ}\text{C}$ . To znamená, že pri relatívne vyšších teplotách ani nemôže dôjsť u mikroorganizmov k tým zmenám, ktoré podmieňujú ireverzibilné poškodenie protoplazmy mrazom.

Nakoniec sa poznamenáva, že s dĺžkou doby pôsobenia nízkej teploty proporcionálne klesá počet prežívajúcich mikrobiálnych buniek, pričom limitujúce faktory účinnosti zmrazovania sa uplatňujú rovnako ako pri jednorázovej nízko-templotnej expozícii. Exponenciálny priebeh typických kriviek odumierania baktérií zmrazovaných pri rôznych teplotách vidieť z obrazu 3, ktorý svedčí aj o tom, že kinetika porady odumierania leží pri nepretržitom zmrazovaní podstatne nižšie ako pri opakovanom (\* 1963 b).



Z dlhoročného výskumu vplyvu nízkych teplôt na mikroorganizmy, ktorého základné poznatky sú rekapitulované v úvode, sa vychádza pri klasifikácii prvoradých činiteľov podmieňujúcich mikrobicidnosť zmrazovania, z nich sa vybrali na kvantitatívne vyhodnotenie výsledky pokusov sledujúcich menovite:

druhové vlastnosti (11 druhov baktérii),  
zmrazovacie teploty ( $-4$ ,  $-7$ ,  $-18$ ,  $-30$ ,  $-70$  a  $-198$  °C),  
vplyv opakovaného zmrazovania a dĺžky jeho trvania (6 násobné zmrazovanie a 90 denná expozícia).

Štatistické vyhodnotenie výsledkov ukazuje na signifikantné rozdiely v mrazuvzdornosti sledovaných druhov baktérií. Kvóta odumierania bola u mrazuvzdornejších organizmov najvyššia pri teplotách  $-18$  až  $-26$  °C, kým skupina baktérií, ktorá sa dá označiť ako na chlad citlivejšia, vykázala najvyššiu kvótu odumierania pri  $-7$  °C. Extrémne nízke teploty v žiadnom prípade nepôsobili zvlášť mikrobicidne.

Sledovaním vzťahu medzi tvarom a mrazuvzdornosťou baktérii sa došlo k názoru, že vyššej hodnote dĺžko-šírkového pomeru zodpovedá úmerne vyššia citlivosť na nízke teploty.

Z typických kriviek odumierania baktérii pri dlhodobom a opätovnom zmrazovaní, ktoré sa aj matematicky charakterizuje, vidieť rozdielnú účinnosť oboch procesov.

## L i t e r a t ú r a

- Arpai J., Hodnotenie pracovných postupov na stanovenie mikroflóry mäsa s osobitným zreteľom na mäso zmrazené. Veterinársky časopis 9 : 379, 1959.
- Arpai J., Názory na mechanizmus a kinetiku účinkov nízkych teplôt na mikroorganizmy. Biológia 15 : 461, 1960a.
- Arpai J., Identifikačné práce na vyše dvesto mikróbných kultúrach izolovaných z mrazeného mäsa. I. Kokovité baktérie a gramnegatívne tyčinky. Veterinársky časopis 9 : 186, 1960b.
- Arpai J., Identifikačné práce na vyše dvesto mikróbných kultúrach izolovaných z mrazeného mäsa. II. Grampozitívne tyčinky, aktinomycéty, kvasinky a plesne. Veterinársky časopis 9 : 270, 1960c.
- Arpai J., Sledovanie aktivity proteolytických enzýmov u mikroorganizmov izolovaných z mrazeného mäsa (I). Mimobunkové a vnútrobunkové dipeptidázy. Kinetika pri 40 °C, 30 °C a 20 °C. Chem. zvesti 14 : 148, 1960d.
- Arpai J., Nová pracovná technika na sedimentačnú frakcionáciu mikróbných buniek. Biológia 16 : 503, 1961a.
- Arpai J., Kälteeinfluss und Petidase - Aktivität von Bakterien. Experientia 17 : 170, 1961b.
- Arpai J., Zur Problematik der bactericiden Wirkung von Antibiotica bei tiefen Temperaturen. Archiv f. Mikrobiologie 39 : 195, 1961c.
- Arpai J., Vplyv zmrazovacej teploty na kvótu odumierania a fyziologického poškodenia mikroorganizmov. Biológia 16 : 31, 1961d.

- Arpai J. a Lifková Zd., Sledovanie aktivity proteolytických enzýmov u mikroorganizmov izolovaných z mrazeného mäsa (II). Manometrické stanovenie aktivity a  $Q_{10}$  peptidáz na diglycinovom a triglycinovom substráte. Chem. zvesti 15 : 218, 1961.
- Arpai J., Behúň M. a Lifková Zd., Sledovanie aktivity proteolytických enzýmov u mikroorganizmov izolovaných z mrazeného mäsa (III). Chromatografické štúdium vplyvu zmrazovania na peptidázy. Chem. zvesti 15 : 360, 1961.
- Arpai J., Vplyv zmrazovania na elektrickú vodivosť suspenzie baktérií. Biológia 17 : 861, 1962a.
- Arpai J., Nonlethal freezing injury on metabolism and motility of *Pseudomonas fluorescens* and *Escherichia coli*. Applied Microbiol. 10 : 297, 1962b.
- Arpai J., The kinetics of freezing inactivation of proteolytic enzymes of *Bacillus subtilis*. Bulletin de l'Institut International du Froid 3 : 36, 1963a.
- Arpai J., Selective effect of freezing as reflected in growth curves. Folia Microbiol. 8 : 18, 1963b.
- Arpai J., Über die biologische Wirkung der Kälte insbesondere auf Mikroorganismen. Die Kälte 17 : 485, 1964a.
- Arpai J., On the recovery of bacteria from freezing. Zeitschrift für Allg. Mikrobiologie 4 : 105, 1964b.
- Arpai J., Vplyv suspenzného média na neletálne poškodenie baktérií zmrazovaním. Biológia 19 : 171, 1964c.
- Arpai J., The effect of freezing on the induction of streptomycin resistance by chemical agents and irradiation in *Escherichia coli*. Folia Microbiol. 9 : 180, 1964d.
- Arpai J., Sledovanie aktivity proteolytických enzýmov u mikroorganizmov izolovaných z mrazeného mäsa (IV). Závislosť od pH prostredia. Chem. zvesti 18 : 117, 1964e.
- Arpai J., Lešková Z. a Longauerová D., Vplyv zníženej inkubačnej teploty na syntézu nukleových kyselín a bielkoviny u mezofilných a psychofilných baktérií. Bulletin VÜKP 3 : 183, 1964.
- Arpai J., Lešková Z., Longauerová D., The effect of lowered incubation temperatures on the nucleic acid and protein synthesis of a mesophylic and psychrophilic bacterium. Folia Microbiol. 10 : 168, 1965.

## Количественный учет влияния низких температур на бактерии

### Резюме

При классификации важнейших факторов, обуславливающих микробицидность замораживания, исходят из результатов многолетних исследований влияния низких температур на микроорганизмы, (основные данные этих исследований приведены, в сжатой форме, во введении статьи), и из этих исследований выбрали для количественной оценки — результаты опытов на следующие темы:

родовые (штаммовые) свойства (11 родов бактерий), температуры замораживания ( $-4$ ,  $-7$ ,  $-18$ ,  $-30$ ,  $-78$  и  $-198$  °C), влияние повторного замораживания и его продолжительность, (6-ти кратное замораживание и 90-дневная экспозиция).

Статистический пересмотр результатов показывает на существенную разницу

в морозостойкости наблюдаемых видов бактерий. Доля отмирания была у морозостойких организмов самая высокая при температурах  $-18$  по  $-26^{\circ}\text{C}$ , тогда как группа бактерий, которую можно считать более чувствительной к холоду, имела наивысшую долю отмирания при  $-7^{\circ}\text{C}$ . Крайне низкие температуры, в любом случае, не проявлялись особенной микробицидностью.

Наблюдая за соотношением между формой и морозостойкостью бактерий, автор пришел к убеждению, что высшему показателю соотношения — длина-ширина, отвечает соразмерно высшая чувствительность к низким температурам.

На типичных кривых отмирания бактерий, при продолжительном и повторном замораживании, что выражается и математически, ясно видно различное действие обоих процессов.

## Quantitative Untersuchungen über den Einfluss niedriger Temperaturen auf Bakterien

### Zusammenfassung

Ausgehend aus den Erfahrungen langjähriger Forschungsarbeit auf dem Gebiete der Kryomikrobiologie dessen Ergebnisse eingangs besprochen wurden, wird eine Klassifikation der die abtötenden Kälteeinflüsse limitierenden Faktoren erstellt.

Es wurden namentlich quantitative Versuche betreffs der Kälteeinwirkung in Abhängigkeit von:

den Arteigenschaften (an 11 Bakterienarten),

den Gefriertemperaturen ( $-4$ ,  $-7$ ,  $-18$ ,  $-30$ ,  $-78$  und  $-198^{\circ}\text{C}$ ),

der Gefrierdauer und deren Wiederholung (bis 90 tägige Expositionsdauer und bis 6 malige Wiederholung der Gefrierung) ausgewertet.

Dabei wurden statistisch gesicherte Unterschiede zwischen der Kälteresistenz einzelner Bakterienarten nachgewiesen. Die Absterbequote war bei widerstandsfähigeren Organismen bei Gefriertemperaturen zwischen  $-18$  und  $-26^{\circ}\text{C}$  die höchste. Dem gegenüber kam es bei kälteempfindlichen Bakterien schon bei einer Temperatur von  $-18^{\circ}\text{C}$  zum höchsten Grad der Devitalisierung. Bei extrem niedrigen Temperaturen kam es in keinem Fall zu besonders starker Abtötung der Zellen.

Eine Auswertung der Korrelation von Zellform und Kälteresistenz gab Grund zur Annahme, dass die Kälteempfindlichkeit der Bakterien mit dem Wert des Breite-Längenkoeffizienten der Zelle proportional ansteigt.

Auf Grund der typischen Absterbekurven für Bakterien, die der Frostwirkung auf lange Dauer einerseits und zum wiederholten Male andererseits ausgesetzt wurden, konnten die Resistenz-Unterschiede auch mathematisch ausgedrückt werden.