

# VPLYV ZMRAZOVANIA NA METABOLIZMUS A AKTÍVNY POHYB BAKTÉRIÍ

JÁN ARPAI, MARTA BÁNHEGYIOVÁ

Výskum vplyvu nízkych teplôt na mikroorganizmy ukázal, že spôsob nízko-teplotnej expozície, ako aj oteplenia, t. j. sklon teplotného spádu a dĺžka doby pôsobenia chladu vytvárajú spolu s vlastnosťami média podmienky, ktoré v závislosti od fyziologického stavu, rastovej fázy a fenotypických vlastností kultúry určujú povahu výsledného efektu chladu. Tento efekt sa môže prejaviť ako letálne alebo neletálne fyziologické poškodenie buniek. Kým odumieranie mikroorganizmov v dôsledku zmrazovania sa sledovalo už v mnohých prácach a je už do istej miery tak z hľadiska mechanizmu, ako aj z hľadiska kinetiky objasnené (Haines, 1938; Waiser a Osterud, 1945; Arpai, 1960a, 1961a), zatiaľ sa venovala pomerne malá pozornosť intermediárnym fázam poškodenia, t. j. neletálnym účinkom zmrazovania (Straka a Stokes, 1959). Touto problematikou sa zaoberá naša práca, v ktorej sa sledujú zmeny v nárokoch na výživu, ako aj v pohyblivosti mikroorganizmov po vystavení účinkom zmrazovania rôznej intenzity v rozličnom médiu.

## *Pokusná časť*

### Materiál a metódy

Poškodenie bakteriálnej bunky v dôsledku zmrazovania sme sledovali na základe zmeny metabolizmu, prejavujúcej sa v požiadavkách na výživu. Ako metabolicky poškodené sme charakterizovali baktérie, ktoré po nízko-teplotnej expozícii rástli na komplexných, obohatených živných pôdach, nie však na minimálnom médiu. Z rozdielu medzi celkovým počtom zárodkov stanovených na obohatenej pôde pred zmrazovaním a po zmrazovaní sme vypočítali kvótu usmrtených baktérií. Metodicky sme teda postupovali tak ako už v predtým uverejnených prácach (Arpai, 1961b).

Zmeny pohyblivosti baktérií sme stanovovali Shoesmithovou metódou (1960). Podstata tejto metódy je v tom, že sa pod mikroskopom ráta počet mikroorganizmov, ktoré za určitý čas prechádzajú cez malý otvor.

*Testorganizmy.* Sledovali sme typický psychrofilný kmeň *Pseudomonas fluorescens*, pôvodne izolovaný z mäsa (Arpai, 1960b), ktorý ešte dobre rástol pri teplotách okolo 0 °C, a mezofilný kmeň *Escherichia coli* B.

**Médiá.** Ako obohatenú komplexnú pôdu sme použili trypticky natrávený bujón s obsahom 1,5 % kazeínu. Pôdu sme pripravili podľa Tannerovho predpisu (1944). Minimálna pôda mala zloženie:  $K_2HPO_4 = 0,7 \%$ ;  $KH_2PO_4 = 0,3 \%$ ; natrium citrát  $\cdot 2 H_2O = 0,1 \%$ ;  $MgSO_4 \cdot 7 H_2O = 0,01 \%$ ;  $(NH_4)_2SO_4 = 0,1 \%$ ; glukóza (osobitne autoklávovaná) = 0,2%; pH upravené na 7. V prípade, že bola použitá vo vystuženom stave, pridávali sme 1,5 % agaru.

**Základné kultúry a bunkové suspenzie.** *Pseudomonas fluorescens* sme kultivovali pri 23 °C, *E. coli* pri 37 °C. Bunkové suspenzie boli pripravené z 24 hod. kultúr vyrastených na obohatenej pôde. Kmeň *Pseudomonas fluorescens* sme suspendovali do 0,1 % peptónového roztoku, aby sa počas riedenia nepoškodil, kým kmeň *E. coli* bol suspendovaný a riedený 0,0003 M fosfátovým pufrom (pH 7,2) podľa Strakovej a Stokesovej metodiky (1957). Túto základnú bakteriálnu suspenziu sme ďalej riedili médiom, v ktorom sa baktérie zmrazovali a skladovali pri nízkych teplotách. Tieto médiá sa líšili chemickým zložením a fyzikálno-chemickými vlastnosťami. To umožnilo študovať vplyvy prostredia na biologické účinky nízkych teplôt. Použili sme menovite mäsový extrakt o koncentrácii 0,5 % (Me); peptónový roztok v koncentrácii 1 % (Pr); kvasničný extrakt v koncentrácii 1 % (Ke); odstredené mlieko (Om) v koncentrácii 1 % a destilovanú vodu (Dv). Tieto zmrazovacie médiá mali pH upravené štandardne na 7,2. Vplyv aktuálnej acidity sme však sledovali osobitne v prostredí Me, ktorého pH sme prídavkom 0,04 M fosfátového tlmiaceho roztoku upravili na štyri hodnoty v rozpätí od 5 do 8. Pri zmrazovaní bola koncentrácia bunkovej suspenzie približne  $5 \cdot 10^5$  buniek/ml. Koncentráciu buniek sme sledovali platňovou metódou na pôdach už uvedených.

**Zmrazovanie a vyhodnotenie jeho účinkov.** Baktériové suspenzie objemu 10 ml boli zmrazované v troch paralelných tenkostenných skúmavkách pri  $-7^\circ$ ,  $-18^\circ$  a  $-30^\circ$  C. Po prvom, siedmom a pätnástom dni sme tri paralelky z každej pokusnej modifikácie rozmrazili pod tečúcou studenou vodou. Potom sme ich naočkovali na minimálnu a súčasne aj na komplexnú pôdu, aby sa takto stanovil fyziologický stav bakteriálnej populácie, resp. vzájomný vzťah jej poškodenej a nepoškodenej zložky. Z výsledkov paralelných pokusov sme vypočítali aritmetický priemer, ktorý sme porovnávali s príslušnými údajmi kultúry pred zmrazovaním (kontroly), na základe ktorých sme vypočítali kvótu zmrazovaním poškodených, nepoškodených a usmrtených buniek.

**Príprava suspenzie na sledovanie pohyblivosti.** Materiál na stanovenie pohyblivosti buniek bol odobratý z kolónií vyrastených pri platňovom teste. Baktérie sme opatrne stiahli z povrchu agarovej pôdy, suspendovali a potom odstredili; sadlinku sme resuspendovali do tlmiaceho roztoku obsahujúceho 0,1 M NaCl a 0,02 fosfo-

T a b u l k a 1

Zmrazovacia teplota:			-7 °C							
Suspenzné médium:			Me				Pr	Ke	Om	Dv
pH:			5	6	7	8	7,2	7,2	6,8	6,8
Výživové nepoškodené (% kontroly)	<i>Ps. fluorescens</i>	1 deň	29	41	44	36	35	47	88	22
		7 dní	30	37	40	32	17	50	85	10
		15 dní	25	30	35	29	20	39	83	2
	<i>E. coli</i>	1 deň	42	57	50	28	20	52	90	13
		7 dní	37	52	48	20	10	55	87	3
		15 dní	19	28	22	12	5	42	75	0,6
Poškodené (% kontroly)	<i>Ps. fluorescens</i>	1 deň	20	38	42	24	49	40	9	60
		7 dní	18	34	35	22	58	38	10	38
		15 dní	32	38	40	36	48	47	12	32
	<i>E. coli</i>	1 deň	18	30	33	30	46	28	3	51
		7 dní	20	21	19	28	45	22	3	21
		15 dní	24	33	35	20	66	29	8	19
Číselný ukazovateľ pohyblivosti (% kontroly)	<i>Ps. fluorescens</i>	1 deň	6	22	26	20	20	— *	33	18
		7 dní	7	18	20	14	21	—	30	16
		15 dní	6	13	24	20	30	—	28	3
	<i>E. coli</i>	1 deň	0,2	6	12	4	8	—	12	5
		7 dní	0,4	2	8	7	8	—	10	5
		15 dní	1	4	10	2	12	—	13	0,9
Obnovenie pohyblivosti v subkultúrach (Vzostup v %)	<i>Ps. fluorescens</i>	Po 1 mesiaci	—	—	1250	—	300	—	900	280
	<i>E. coli</i>	—	—	—	890	—	450	—	790	160

\* nebolo stanovené

-18 °C										-30 °C					
Me				Pr	Ke	Om	Dv	Me				Pr	Ke	Om	Dv
5	6	7	8	7,2	7,2	6,8	6,8	5	6	7	8	7,2	7,2	6,8	6,8
18	24	25	20	24	30	80	9	13	20	28	15	29	31	77	5
12	18	21	15	24	25	65	5	10	20	22	13	18	21	56	2,5
11	18	19	10	20	28	78	3	9	18	18	11	17	25	47	1,5
13	21	22	12	16	26	72	5	7	12	14	7	18	24	68	3
9	10	13	7	11	30	63	2	6	9	10	5	5	28	48	0,8
6	12	8	3	9	41	59	0,5	4	10	6	2	6	18	53	0,2
37	44	46	41	55	46	11	38	28	39	41	34	48	40	9	40
28	35	37	33	41	39	10	33	27	34	36	30	39	35	7	31
27	41	40	38	43	38	5	29	16	30	31	20	30	33	8	25
28	37	36	32	53	30	8	17	23	28	30	25	39	27	5	24
16	24	22	18	30	17	3	15	19	30	28	22	24	25	6	20
23	25	28	23	24	20	3	15	12	18	20	14	25	28	10	26
4	25	31	20	23	—	42	20	1	9	14	11	8	—	20	10
4	10	20	17	20	—	30	13	0,7	4	12	7	5	—	17	4
0,2	5	16	16	20	—	31	0,8	3	14	14	5	13	—	19	4
0,5	10	16	3	11	—	19	7	1	4	5	0,8	3	—	11	3
1	3	15	6	6	—	19	4	0,1	2	8	0,7	0,6	—	8	0,5
0,3	1	13	10	5	—	18	0,8	0,8	0,8	5	2	0,5	—	10	0,1
—	—	1150	—	700	—	1620	330	—	—	—	—	—	—	—	—
—	—	1500	—	550	—	1250	480	—	—	—	—	—	—	—	—

rečnan sodný, pH 7,2. Bakteriálnu suspenziu sme malým kompresorom nepretržite prevzdušňovali.

*Mikroskopické pozorovanie.* Malé množstvá jednotlivých bakteriálnych suspenzií sme natiahli do kapilár dlhých 50 mm, pripravených zo sklenených rúrok, a to metódou, ktorú podrobnejšie opísali Wright a Colebrook (1921). Kapiláry sme zatavili, uložili medzi mikroskopické sklíčka a pozorovali pod imerzným objektívom fázovou kontrastnou mikroskopiou.

*Meranie pohyblivosti.* Pohyblivosť sme stanovovali rátaním množstva baktérií, ktoré prešlo zorné pole o ploche ca 0,1 mm<sup>2</sup>. Priemer zorného poľa bol 0,125 mm. Použitú bakterioskopickú metódu priameho počítania buniek podrobne opísali Arpai a Janotková (1958). Počítali sme vždy za 1 min. a počítanie sme opakovali na dvoch rôznych miestach kapiláry. Zo stanovených hodnôt sme vypočítali aritmetický priemer. Zdroje chýb, ktorými by mohlo byť rozmnožovanie buniek a chemotaktické vplyvy, do značnej miery vylúčila použitá pracovná technika (Shoesmith, 1960). Osobitnú pozornosť sme venovali tomu, aby zorné pole pri počítaní ležalo pod hladinou styčnej plochy tekutiny a skla. Pri počítaní v blízkosti stien kapiláry sme získali málo reprodukovateľné výsledky so širokým variačným rozpätím. Bolo to spôsobené tým, že baktérie mali tendenciu zoskupovať sa v blízkosti sklenej steny, ako na to už upozornili Clowes, Furness a Rowley, (1955), ako aj Baracchini a Sherris, (1959).

*Koncentrácia baktérií.* Počet pohyblivých baktérií je ovplyvnený koncentráciou buniek (Sherris a spol. 1957), preto bolo potrebné koncentráciu testorganizmov štandardizovať vo všetkých suspenziách. Celkový počet buniek pre výpočet ukazovateľa pohyblivosti sme stanovovali v Bürkerovej počítacej komôrke, pričom vhodné riedenie sme pripravili pridaním 0,25 % formaldehydu. Výpočet sme robili fázovou kontrastnou mikroskopiou, rátajúc zhľuky vždy za jednotku. Bakteriálne suspenzie sme štandardizovali podľa zákalu fotokolorimetricky.

*Ukazovateľ pohyblivosti.* Výsledky stanovovania počtu pohyblivých buniek sme vyjadrili „ukazovateľom pohyblivosti“, ktorý sme vypočítali podľa Shoesmithovho návodu (1960). Táto veličina závisí od plochy vyšetrovaného zorného poľa a od koncentrácie baktérií, ktoré musia byť štandardné. Prítomnosť nepohyblivých buniek suspenzií znižuje ukazovateľa pohyblivosti. Pomer pohyblivých buniek k bunkám nepohyblivým vyplynul z priameho počítania v niekoľkých zorných

poliach a z ich výsledkov sme vypočítavali priemer. Za predpokladu, že koncentrácia kultúry bola konštantná, je ukazovateľ pohyblivosti proporcionálny priemernému počtu buniek v suspenzii. Ukazovateľ pohyblivosti sme stanovovali

v suspenzii o koncentrácii približne  $5 \times 10^9$  buniek/ml. Z výsledkov sme odpočítali numerickú konštantu o hodnote 3, čím sme podľa Shoesmithových výpočtov korigovali chybu, ktorá vznikla z Brownovho pohybu. Výsledky stanovenia ukazovateľa pohyblivosti v kultúrach poškodených mrazom sme vyjadrili percentuálne vo vzťahu k ukazovateľovi pohyblivosti buniek u kontroly.

*Sledovanie obnovy pohyblivosti.* Poškodené kultúry sme uchovávali v natrávenom bujóne pri inkubačnej teplote a týždenne sme ich preočkovali. Po mesiaci sa v subkultúre znova stanovovala pohyblivosť buniek, resp. ukazovateľ pohyblivosti. Prípadné zvýšenie pohyblivosti sme vyjadrili v percentách.

*Štatistické metódy.* Významnosť rozdielov medzi skupinami pokusných výsledkov sme vypočítali podľa t-testu podľa Studenta. Vzťahy medzi výsledkami sme zisťovali výpočtom korelačných koeficientov (označovaný „r“) dvojíc pokusných výsledkov; postupovali sme podľa Snedecorovho vzorca (1948) a použili sme základnú rovnicu o kovariancii, kde  $xy = \sqrt{\text{variancia } x \cdot \text{variancia } y}$ . Reprodukateľnosť výsledkov, resp. chybu metodiky sme vypočítali podľa Weberovej (1957), pričom výsledky, opierajúce sa o priemer 5 paraleliiek, mali maximálnu chybu 10 %.

## Výsledky a vyhodnotenie

*Účinky podmienok zmrazovania na usmrtenie a poškodenie buniek.* Pokusné výsledky zachytáva tab. č. 1, štatistické vyhodnotenie významnosti vzťahov a variácií medzi sledovanými činiteľmi uvádza tab. 2. Z údajov prvej tabuľky vidieť, že teplota zmrazovania, dĺžka trvania zmrazovania, vlastnosti suspenzného média, najmä jeho pH, majú zjavný vplyv na prežívanie a na rozsah poškodenia baktérií

Tabuľka 2

Vzťahy	Významnosť rozdielov	Korelačný koeficient	Pravdepodobná chyba
medzi kvótou poškodenia <i>Ps. fluorescens</i> a <i>E. coli</i>	vysoko signifikantná ( $P \leq 1 \%$ )	—	—
medzi kvótou nepoškodených vo vodnom a inom zmrazovacom prostredí	veľmi vysoko signifikantná ( $P \leq 0,1 \%$ )	—	—
medzi zmenami v nárokoch na živiny a ukazovateľom pohyblivosti	$P \leq 1 \%$	významný ( $r = 0,38$ )	$\pm 0,08$



ako aj na pohyblivosť prežívajúcich buniek. Zistili sme tiež, že medzi psychrofilnou kultúrou *Ps. fluorescens* a mezofilnou *E. coli* sú v prežívaní a miere poškodenia v dôsledku zmrazovania nápadné rozdiely, a to v tom, že psychrofilná kultúra bola rezistentnejšia než mezofilná. Ukázalo sa tiež, že pokles počtu nepoškodených baktérií pri nízkych teplotách je u kmeňa *E. coli* pri všetkých skladovacích časoch omnoho pomalší pri  $-18^{\circ}\text{C}$  a  $-30^{\circ}\text{C}$  ako pri  $-7^{\circ}\text{C}$ . Tento zjav bol už predtým opísaný (Straka a Stokes, 1959), dosiaľ sa však nezistilo, že k tomu dochádza iba v prípadoch, keď sa zmrazujú bunky málo rezistentnej kultúry vo vodnom prostredí, ako o tom svedčia výsledky našich pokusov. Z nich vidno, že pri použití rôznych suspenzných tekutín kvóta usmrtených buniek kryorezistentnej kultúry vzrastá, ak sa zmrazovacia teplota zníži z  $-7^{\circ}\text{C}$  na  $-18^{\circ}\text{C}$ .

Podmienky, ktoré z hľadiska poškodenia buniek limitujú účinky nízkych teplôt, sú v mnohých prípadoch tie isté ako podmienky vplyvajúce na kvótu usmrtenia. Naopak, v niektorých prípadoch v podmienkach, ktoré zvyšujú kvótu usmrtených buniek, klesá kvóta poškodených buniek. K tejto druhej alternatíve dochádza najmä vtedy, keď len malá časť kultúry prežíva zmrazovanie. Medzi účinkami zmrazovania pri  $-18^{\circ}\text{C}$  a  $-30^{\circ}\text{C}$  sa napokon neukázali väčšie rozdiely.

Predĺžením mraziarenského skladovania sa zvýšil podiel poškodených i usmrtených buniek. Toto zvýšenie bolo na začiatku nízkoteplotného pôsobenia výraznejšie ako v jeho ďalšom priebehu. Predchádzajúce práce ukázali, že krivka odumierania má exponenciálny charakter, kým tieto výsledky podporujú náhľad, že poškodenie a odumieranie baktérií pre nízke teploty sú korelovanými zložkami pokračujúceho procesu (Arpai, 1961d).

Časť pokusov sme venovali sledovaniu vplyvu pH. V kyslom prostredí bol počet nepoškodených buniek nižší, v tomto ohľade bol zvlášť citlivý kmeň *Ps. fluorescens*. Naproti tomu u *E. coli* pH 8 zjavne znižoval počet nepoškodených buniek. Tieto výsledky sa potvrdili aj v inej práci (Arpai a kolektív, 1960), čím sa potvrdila závislosť baktérií od pH zmrazovacieho prostredia vo vzťahu k ich individuálnej citlivosti voči kyselinám.

Ako prvý základný poznatok z tejto práce, ktorým sa súčasne potvrdzujú predchádzajúce výsledky, vyplýva, že psychrofilné druhy baktérií odolávajú chladu a mrazu. Zdá sa, že je zbytočné natoľko vyzdvihovať tento poznatok; dosiaľ však platil skôr opačný názor, vyslovený Strakom a Stokesom (1959), resp. Ingrahamom a Stokesom (1959), podľa ktorých jedinou charakteristickou vlastnosťou psychrofilov je schopnosť dobre rásť pri teplotách okolo  $0^{\circ}\text{C}$ .

Účinok zmrazovania na pohyblivosť baktérií a jej vzťah k metabolickému poškodeniu. Medzi pohyblivosťou a poškodením metabolizmu testorganizmov sme zistili zaujímavý vzťah. Rôzne podmienky zmrazovania pôsobia skoro rovnakou mierou tak na neletálne poškodenie metabolizmu, ako aj na pohyblivosť baktérií. Ukazovateľ pohyblivosti bol obdobne ako kvóta metabolického poškodenia zmrazovaním podstatne menej ovplyvnený u psychrofilov než u mezofilov.

*Obnovenie pohyblivosti.* Charakter pokusného materiálu a podmienky zmrazovania spôsobili niektoré rozdiely v obnovení pohyblivosti buniek, ku ktorej došlo počas dlhšie trvajúcej inkubácie po zmrazovaní. Hoci táto práca neobjasňuje otázku reštitúcie pohyblivosti, možno uviesť, že výsledky, ako vidno na tabuľke 1, jednoznačne ukazujú zvýšenú kvótu reštitúcie v prípadoch, kde sme baktérie zmrazovali v médiu s ochranným účinkom.

*Morfologický vzhľad poškodených buniek.* Kultúry, ktoré zmrazovanie vo väčšom rozsahu metabolicky poškodilo, t. j. kultúry s kvótou prežívajúcich  $< 5\%$  vyšetrovali sme mikroskopicky. Bežnou technikou fázovej kontrastnej mikroskopie sme nenašli významné rozdiely, treba však poznamenať, že sme nevyfarbili a tak ani nepozorovali bičiky.

## S ú h r n

Sledovali sme niektoré vplyvy podmienok zmrazovania na uhynutie a metabolické poškodenie psychofilnej a mezofilnej kultúry s osobitným zreteľom na zmeny v pohyblivosti buniek. Zistili sme, že medzi rozsahom neletálneho metabolického poškodenia a zmenami pohyblivosti je významný vzťah, podmienený teplotou a dĺžkou času zmrazovania, ako aj vlastnosťami, menovite pH suspenznej tekutiny. Testorganizmy — pokiaľ ide o ich odolnosť proti zmrazovaniu — ukazujú zjavné rozdiely: mezofilný kmeň je citlivejší. Treba poznamenať, že ukazovateľ pohyblivosti u chladuvzdornej kultúry *Ps. fluorescens* klesal pri nízko-teplotnej expozícii pomalšie ako u mezofilnej kultúry *E. coli*. Reštitúcia pohyblivosti počas subkultivácie závisela od podmienok zmrazovania; najnižšia bola vtedy, keď sa kultúry zmrazovali vo vodnom prostredí.

## L i t e r a t ú r a

1. Arpai J., 1960a, Názory na mechanizmus a kinetiku účinkov nízkych teplôt na mikroorganizmy. *Biológia* 15, s. 461.
2. Arpai J., 1960b, Identifikačné práce na vyše dvesto mikróbných kultúrach izolovaných z mrazeného mäsa. I. Kokovité baktérie a gramnegatívne tyčinky. *Veterinársky časopis* 9, s. 186.
3. Arpai J., 1961a, Zur Problematik der baktericiden Wirkung von Antibiotica bei tiefen Temperaturen. *Arch. Mikrobiol.* 39, s. 195.
4. Arpai J., 1961b, Kälteeinfluss und Peptidase-Aktivität von Bakterien, *Experientia* 17, s. 170.
5. Arpai J., 1961c, Vplyv zmrazovacej teploty na kvótu odumierania a fyziologického poškodenia mikroorganizmov. *Biológia* 16, s. 31.
6. Arpai J., 1961d, Über die Mutationsauslösung bei *Serratia marcescens* durch Frosteinfluss, *Die Naturwissenschaften* 48, s. 438.
7. Arpai J., Janotková O., 1958, Mikroskopické hodnotenie mikrobiologickej čistoty zeleninových pretlakov. *Průmysl potravin* 9, s. 30.



8. Arpai J. a spolupracovníci, 1960, Závěrečná zpráva výskumnej úlohy 20.01 riešenej na mikrobiologickom odd. VÚM, Bratislava.
9. Baracchini O., Sherris J. C., 1959, The chemotactic effect of oxygen on bacteria. J. Path. Bact. 77, s. 565.
10. Butterfield C. T., 1932, The selection of dilution water for bacteriological examinations. J. Bacteriol. 23, s. 355.
11. Clowes R. C., Furness G., Rowley D., 1955, The measurement of speeds of motility in *Escherichia coli*, J. gen. Microbiol. 13, s. 1.
12. Ingraham J. L., Stokes J. L., Psychrophilic bacteria. 1959, Bact. Rev. 23, s. 97.
13. Haines R. B., 1938, The effect of freezing on bacteria. Proc. Roy. Soc. 124 B, s. 451 (London).
14. Tanner F. W., The microbiology of foods. 1944, Gerrard Press, Champaign.
15. Sherris J. C., Preston N. W., Shoesmith J. G., 1957, The Influence of oxygen and arginine on the motility of strain of *Pseudomonas* sp., J. gen. Microbiol. 16, s. 86.
16. Shoesmith J. G., 1960, The measurement of bacterial motility. J. gen. Microbiol. 22, s. 528.
17. Snedecor G. W., 1948, Statistical methods, Iowa State College Press, Ames, Iowa.
18. Straka R. P., Stokes J. L., 1957, Rapid destruction of bacteria in commonly used diluents and its elimination. Appl. Microbiol. 5, s. 21.
19. Weber E., 1957, Grundriss der biologischen Statistik, Fischer Verlag, Jena.
20. Weiser R. S., Osterud C. M., 1945, Studies on the death at low temperatures. I. The influence of the intensity of the freezing temperature, repeated fluctuations of temperature, and the period of exposure to freezing temperatures on the mortality of *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 50, s. 413.
21. Wright A. E., Colebrook L., 1921, Technique of the Teat and Capillary glass tube, Ed. Constable, London.

## FROSTEINFLUSS AUF DEN STOFFWECHSEL UND DIE BEWEGLICHKEIT VON BAKTERIEN

### Zusammenfassung

Es wurden die Bedingungen des Gefrierens auf das Absterben und die Stoffwechselbeschädigung von psychophilen und mesophilen Bakterien beobachtet, unter besonderer Berücksichtigung der Veränderungen bezugs aktiver Beweglichkeit. Es konnte festgestellt werden, dass zwischen dem Ausmass der nichtlethalen Beschädigung und den Veränderungen der Beweglichkeit eine signifikante Korrelation besteht. Diese ist von der Temperatur und der Dauer des Gefrierens, wie auch von den Eigenschaften, insbesondere von pH der Suspensionsflüssigkeit abhängig. Zwischen den Testorganismen war ein signifikanter Unterschied betreffs Resistenz, indem die Absinken zeigte, als es dies bei *Escherichia coli* der Fall war. Die Restitution der Beweglichkeit koefizient bei der psychophilen Kultur *Ps. fluorescens* unter Frosteinfluss ein langsames Absinken zeigte, als es dies bei *Escherichia coli* der Fall war. Die Restitution der Beweglichkeit während der Subkultivation war von den Bedingungen des Gefrierens abhängig. Sie erreichte das kleinste Ausmass bei Wasser als Gefriermedium.