

ŠTÚDIA O VPLYVE NÍZKYCH TEPLÔT NA RAST A ROZMNOŽOVANIE
MIKROORGANIZMOV PRI NÍZKYCH TEPLÔTÁCH

M. BÂNHEGYIOVÁ, E. RUBÍNOVÁ

Rast mikroorganizmov pri nízkych teplotách je veľmi zaujímavým, základným biologickým problémom, ktorý súčasne má veľký praktický význam najmä v potravinárstve. Pri rozvoji chladiarenstva a mraziarenstva sa stále vo väčšej miere naráža na tie druhy a skupiny mikroorganizmov, ktoré svojou fyziologickou alebo enzymatickou aktivitou ohrožujú akosť a zdravotnú nezávadnosť nielen chladených, ale aj mrazených, menovite nedostatočne zmrazených potravín. (1, 2, 3)

Forster (4) bol pravdepodobne prvý, kto upozornil na rast baktérií pri teplotách mrazu, keď fosforeskujúce organizmy, izolované z rýb uskladnených v chlade rástli dobre pri 0 °C na rôznych kultivačných pôdach. Roku 1892 izoloval z rôznych vôd, potravín, odpadkov a pôdy množstvo organizmov, ktoré rástli pri tejto teplote. Zistil tiež, že takéto organizmy sa vyskytujú na tele a vo vnútornostiach mnohých sladkovodných rýb a najmä v morskej vode a morských rybách.

Fischer (5) taktiež podal zprávu o 14 rôznych druhoch mikroorganizmov izolovaných z prístavnej vody a pôdy, ktoré rástli pri 0 °C. Boli to fosforeskujúce a tiež nesvetielkujúce druhy, neidentifikovaná huba, kokoformný druh a 7 tyčinkovitých foriem, z ktorých 3 druhy boli fluoreskujúce a mali proteolytické vlastnosti. Roku 1893 ako prvý zaznamenal rast patogénnych baktérií (vibriá cholery) pri 0 °C.

Conradi a Vogt (6) zistili, že iný patogénny mikrób „proteus bacillus“ rastie pri tejto teplote pomaly.

Baur (7) a tiež Brandt (8) zistili, že *Bacterium lobatum* pri teplotách okolo 0 °C pomaly denitrifikuje nitritový bujón.

V tom istom roku Schmidt—Nielson (9) referoval o tom, že *Bacillus aquatilis fluorescens non-liquefaciens*, *B. granulosum*, *B. paracoli gasoformans anindolicum*, *B. radiatum*, *B. tarde fluorescens*, *B. pestis* a *B. proteus fluorescens* rastú pri 0 °C, tak isto ako aj kmeň *Saccharomyces pastorianus* I, červená *torula*, *Actinomyces ochraceus*, *A. carneus* a *A. ochroleucus*.

Müller (10) vyšetroval obsah rybích vnútorností, mlieko, zeleninu, záhradnú pôdu, múku a kaly. Izoloval z týchto produktov 36 rôznych kultúr, všetky rástli pri 0 °C. Z nich identifikoval 4 kmene *B. fluorescens liquefaciens*, jeden kmeň z rodu *B. fluorescens non-liquefaciens*, jeden kmeň z rodu *Micrococcus flavus tardigradus* a jeden kmeň z rodu *M. carneus*. Opísal aj 4 ďalšie nepomenované druhy baktérií. Okrem toho zahrnul do tejto skupiny jeden druh *Mucor* (*M. mucedo*) jedno *Penicillium* (*P. glaucum*), jedno *Oidium* a jeden *Blastomyces*. Zistil,

že tieto mikroorganizmy sú schopné nielen rásť pri 0 °C, ako aj rozmnožovať sa, ale že ich životné prejavy boli pri tejto teplote také isté ako pri vyšších teplotách a rozdiely boli len v intenzite (rýchlosti).

Feitel (11) študoval denitrifikačné baktérie izolované z hlbkej morskej vody, na ktorých demonštroval, že asi jedna tretina kultúr pomaly rastie ešte pri 0,3 až 0 °C. Sem zaradil aj *Bacillus actinopelte*, *B. ornatum* a *Bacterium baliticum*.

Klein (12) zistil, že *Blastomyces*, ktoré spôsobujú hnedé škvrny na hovädzine uskladnenej v chlade, sú schopné slabo, ale zreteľne vyrásť za 10 dní pri -1,11 až -2,22 °C. Nevyrastú však za tento čas pri -7,78 až -8,89 °C, ale mikroorganizmy pri tomto pokuse nezahynuli, keď sa kultúra preniesla do laboratórnych podmienok a obnovil sa po 48 hodinách normálny rast.

Tsiklinský (13) v časopise Francúzskej spoločnosti pre výskum Antarktídy uverejnil prácu, v ktorej píše o prítomnosti mnohých mikroorganizmov vo vnútornostiach rýb a v morskej vode, ktorej teplota bola -1,5 °C.

Richardson (14) konštatoval, že určité neproteolytické baktérie sa rozmnožujú na mrazenom mäse. Tieto však už nerástli na mrazenom mäse pri teplotách -9 až -12 °C, a podľa jeho mienky rozmnožovanie pri týchto teplotách je skoro nemožné. Zdôraznil tú okolnosť, že nie špecifická teplota, ale pevné skupenstvo média ohraničuje podmienky rastu a reprodukcie a oneskorenie rastu vyplýva zo zníženia teploty.

Eustace (15) v práci o skladovacích chorobách jabĺk a broskýň zaznamenal rast *Penicillium glaucum* na infikovaných jablkách, ktoré boli uskladnené pri 0 °C 2 mesiace a dlhšie, broskyne sa skazili pri tejto teplote už za 2 týždne pôsobením hnedých húb (*Sclerotinia fructigena*). *Alternaria* sp., *Glomerella rufo-maculans* (horká sneť), *Sphaeropsis malorum* (čierna pliešeň), *Cephalothecium roseum* (ružová pliešeň) a *Venturia inaequalis* pri tejto teplote nespôsobili kaženie.

Penningtonová (16) v štúdií o tzv. „čistom“ a „tržnom“ mlieku udržiavanom pri -0,55 až -1,67 °C našla veľmi markantný vzrast počtu baktérií, dokonca keď mlieko bolo napolo zmrznuté. V závere konštatovala: „Rast baktérií bol zaznamenaný ku koncu prvého týždňa aj v najčistejšom mlieku, ktoré obsahovalo asi 300 mikroorganizmov na jeden ml. Počet mikroorganizmov nepretržite rástol počas 5 alebo 6 týždňov a pri ich maxime ich bolo až na stovky miliónov. Niekedy prekročili aj miliónový počet na 1 ml. „Určité druhy baktérií, ako napr. *Bacillus formosus*, *B. solitarius* a *B. Raveneli* boli obzvlášť chladuvzdorné a boli tiež často prevládajúcimi druhmi ku koncu pokusu.

Ravenel, Hastings a Hammer (17) študovali účinok skladovania pri 0 až -9 °C na bakteriálnu flóru na 2 vzorkách mlieka. Jedna bola z najlepšieho druhu, kým druhá vzorka bola zmesou mliekárenského mlieka tržnej kvality. Pri teplotách okolo -9 °C sa v mlieku nezistil žiaden rast baktérií počas 160 až 203 dní. Zistilo sa hrudkovatenie kazeínu a tuku, stúpol obsah rozpustného dusíka a klesla acidita. V mlieku udržiavanom pri 0 °C sa však zvýšil počet baktérií, prejavujúci sa aj vo zvýšení acidity.

V sérii pokusov v zmrazených pôdach Conn (18, 19, 20) zistil rýchle rozmnožovanie baktérií. Pripisoval ho druhom, ktoré veľmi slabo rástli v početnej pôdnej mikroflore, sledovanej v letných mesiacoch.

Brown a Smith (21) získali výsledky, ktoré potvrdzujú vyššie spomenuté Connove poznatky. Zistili, že zmrznuté pôdy majú omnoho väčšiu amonikalizačnú

schopnosť ako nezmrznuté, zvýšila sa schopnosť viazať dusík v zmrznutých pôdach a denitrifikačná schopnosť klesla postupne v závislosti od podmienok zmrazovania.

Massee (22) v štúdiách o *Cladosporium herbarum*, ktoré je pôvodcom čiernych škvrn na hovädzine, dopravovanej v chladenom stave z Argentíny, zistil, že tento mikrób pomaly rastie pri 0 °C. Pri nižších teplotách bol rast viditeľný len po 1 mesiaci.

Reed a Reynolds (23) pri výskume účinku nízkych teplôt na rast a aktivitu mliečnych baktérií zistili, že pri teplotách -1 °C *Bacillus putidum*, *B. aerogenes*, *B. cyanogenes*, *B. proteus vulgaris*, *B. coli*, *B. subtilis*, *B. fluorescens liquefaciens*, *B. prodigiosus*, *Bacterium lactis acidii*, *Sarcina lutea*, *Oidium lactis*, *Microspira tyrogenera* a *M. citricus* tiež boli schopné rastu. Pri tejto teplote sa zistili dôležité zmeny v aktivite rôznych organizmov; určité z nich, napr. *Bact. lactis acidii* a iné zo skupiny kyselinotvorných, najprv sa pri skladovaní rozmnožovali, potom pri dlhšie trvajúcom skladovaní ich počet klesal. Iné, ako napr. *Microspira tyrogenera*, spočiatku rastú pomaly, ale s predlžovaním skladovacej periódy rastú rýchlejšie. Preto v mlieku, ktoré malo nízky stupeň kyslosti a považovalo sa za sladké, nastali zjavné chemické zmeny, ktoré ovplyvnili jeho kvalitu.

Brooks a Cooley (24) skúmali rast plesní spôsobujúcich hnilobu jabĺk v závislosti od teploty. Zistili, že *Alternaria sp.*, *Botrytis cinerea*, *Cephalothecium roseum*, *Neofabraea malicorticis*, *Penicillium expansum*, *Sclerotinia cinerea*, *Sphaeropsis malorum* a *Volutella fructi* rástli na infikovaných jablkách pri teplote 0 °C. Len *Fusarium radiclecola* a *Glomerella cingulata* zo všetkých sledovaných druhov nerástli pri tejto teplote. V chladniarskych pokusoch s nezrelým ovocím *P. expansum* pokračovalo vo svojom raste pri 0 °C v prípade, že sa skladovanie oddialilo (neskadované hneď po zbere), nerástlo však v prípade, že sa hneď skladovalo (za chladu). Spóry druhov *Alternaria*, *Botrytis*, *Penicillium* a *Sclerotinia* klíčili na agare s obsahom kukuričnej múky pri 0 °C ku koncu jedného mesiaca, ale spóry druhov *Aspergillus*, *Cephalothecium*, *Fusarium*, *Glomerella* a *Pestalotzia* pri tejto teplote neklíčili. Reakcia na túto teplotu bola vo veľkej miere podmienená vlastnosťami prostredia, na ktorom rástli.

Vanderleck (25) skúmal baktérie zo zmrazenej pôdy. Zistil, že baktérie sa rýchlo množili tak v zmrazenej ako aj v nezmrázenej pôde, kde bol dostatok organických látok na rozloženie, ale silné mrazy zabraňujú tomuto vývoju. Počet baktérií klesal, ak sa pôda roztápala, rast alebo pokles ich počtu sa pozoroval obyčajne pri poklese alebo stúpnutí vlhkosti. Na tieto javy upozorňoval aj Conn, Brown a Smith. V inej práci Vanderleck (26) uverejnil dôležité pozorovanie, že zmeny spôsobené baktériami v zmrazených pôdach sú závislé od druhu enzýmov nimi produkovaných, t. j. zjavný účinok intracelulárnych enzýmov závisí od rastu organizmu. Mimobunečné enzýmy môžu však účinkovať aj bez aktívneho rastu.

Monvoisin (27) skúmal plesne vyskytujúce sa na mrazenom mäse. Zistil, že plesne, ktoré pri normálnej teplote tvoria obvykle zo spór za 2 dni biele bohaté kolónie a za 5—6 dní sporujú, vyžadujú si pri teplote -9 °C k vytvoreniu kolónií 2—3 mesiace a 4—5 mesiacov na dozretie spór. Spóry, ktoré neklíčia pri teplote -6 a -9 °C, pri teplotách 12—15 °C začnú klíčiť za 24 až 33 hodín a rastú normálne. Keď tieto isté kultúry sa prekladali do nízkych teplôt, rast pokračoval, avšak bol značne spomalený. Zdôrazňoval dôležitosť vlhkosti vzduchu, ktorá ovplyvňuje rast húb pri rôznych nízkych teplotách. Huby, ktoré

sa vyskytujú na mäse uskladnenom v chlade, sú podľa dôležitosti v poradí nasledovné: *Thamnidium elegans*, *Mucor mucedo*, *Rhizopus* sp., a *Penicillium glaucum*.

Brown a Halversen (28) zistili, že počet baktérií v zmrazenej pôde vzrastá, ak je teplota nižšia a klesá pri vyššej teplote v závislosti od obsahu vlhkosti. Zistili tiež pokles počtu mikroorganizmov pri rozmrazovaní pôdy.

Vass (29) nezistil rast baktérií v zmrazenej pôde; predpokladal, že zmrazovaním sa roztrhajú zhluky mikroorganizmov a tým možno vysvetliť výsledky, získané inými autormi (t. j. zdanlivý vzrast počtu zárodkov).

Bida'ult (30) sledoval rast húb na mrazenom mäse a zistil, že kolónie *Choetostylum fresenii* a *Hormodendron cladosporioides*, uložené za podmienok plného vegetatívneho rastu do miestnosti, kde sa udržiavala teplota pri -10°C , vyrástli slabo počas 2 mesiacov. Rast bol výraznejší na konci 2 ďalších mesiacov, keď sa teplota zvýšila na -8°C . Iné plesne — *Penicillium crustaceum*, *Cladosporium herbarum*, *Botrytis rosea* — rástli v teplotnom rozmedzí od -6°C do 0°C . Mikroorganizmy vyšetrené na citlivosť voči chladu zostavil v nasledujúcom poradí: *Choetostylum fresenii*, *Hormodendron cladosporioides*, *Cladosporium herbarum*, rôzne druhy *Botrytis*, *Thamnidium elegans*, *Penicillium crustaceum*, *Torula* a kvasinkové formy. Posledné pokračovali v raste len pri teplotách v blízkosti 0°C .

Brooks a Kidd (31) sledovali rast *Cladosporium herbarum* pri teplote $-5,5^{\circ}\text{C}$. Tento organizmus spôsobuje „čiernu škvrnitosť mäsa“. Konštatovali, že teplota $-5,5^{\circ}\text{C}$ nie je teplotným minimom tohto organizmu. Dokázali tiež, že biele plesne (druhy rodov *Sporotrichum* a *Oospora*) za ďalšieho skladovania rastú pri teplotách nižších ako bod mrazu.

Stiles (32) v rozprave o ochrane potravín zmrazovaním zistil, že niektoré mikroorganizmy nie sú schopné prežiť teplotu nižšiu ako -1 až -2°C , iné zas rastú pri teplotách o mnoho nižších a nie u všetkých plesní sa rast zastavuje (znemožní) pri teplotách pod bodom mrazu.

Brooks a Hansford (33) zistili, že medzi plesňami rastúcimi na mäse, *Cladosporium herbarum* nielen že rastie, ale aj vytvára nové spóry pri teplote $-7,78^{\circ}\text{C}$; *Sporotrichum carnis*, ktorý spôsobuje biele škvrny na mäse, rastie pri tejto teplote slabo, kým pri teplote $-2,22^{\circ}\text{C}$ veľmi dobre; podobne aj *Thamnidium* sp. rastie veľmi dobre pri teplote $-2,22^{\circ}\text{C}$, avšak pri teplote $-7,78^{\circ}\text{C}$ rastie slabo; *Mucor* sp. rastie veľmi dobre pri teplote $-2,22^{\circ}\text{C}$, podobne aj príslušníci rodu *Penicillium*. Zistili tiež, že spóry *Cladosporium herbarum* klíčia pri teplote -6°C a rast bol veľmi rýchly, ak ku klíčeniu došlo pri krátkodobom vystavovaní laboratórnej teploty. Chýbajúca sporulácia u niektorých iných húb klíčiacich pri -6°C sa asi dá vysvetliť nepriaznivými vlhkostnými pomermi.

Wright (34) zistil, že v prípade, keď *Mucor mucedo* vyrástol pri teplotách od -2 po -7°C vytvorili sa čierne škvrny na mäse, aj keď sa mäso uložilo do -12 až -15°C . Podobné výsledky získal aj s plesňou *Penicillium glaucum* s tým rozdielom, že táto si vyžadovala pre rast počiatočnú teplotu okolo 4°C . Usúdil, že *Cladosporium herbarum* je len jednou z fungí, ktoré spôsobujú čierne škvrny na mäse a konštatoval, že udrzovaním teploty pod -9°C možno predchádzať rastu fungi na mrazenom mäse.

Brooks (35) v protiklade k Wrightovým prácam nechal vyrásť *Mucor mucedo* na baranine skladovanej pri -1°C , keď potom skladoval mäso 4,5 mesiacov,

pri teplote -11°C , neobjavili sa žiadne čierne škvrny. Podobné výsledky sa získali aj s druhom *Penicillium* rozrastenom pri teplote 4°C a potom uchovávanom pri teplote -11°C taký istý čas.

Fay a Olson (36) v štúdiu o bakteriológii výroby a skladovania zmrzliny zistili, že počas niekoľkých prvých dní po uskladnení v mraziarenskej miestnosti alebo zabalení do ľadu alebo ľadovej drti, obvykle dochádza k poklesu počtu baktérií od 0 až po 75 %, pokles však pokračoval omnoho pomalšie po prvom týždni. Často však po mesiaci nastalo pomalé stúpanie počtu baktérií, pravdepodobne tých, ktoré rástli aj pri nízkych teplotách.

Bardach (37) izoloval 11 rôznych druhov nesporulujúcich, hnilobných baktérií z kalov, kanálových vôd a morskej vody, ktoré sa rozmnožovali pri teplotách od 0 do 2°C . Jednoduché životné procesy prebiehali pri týchto nízkych teplotách normálne, aj keď rástli pomalšie ako pri teplotách vyšších.

Rubentschik (38) zistil, že *Urobacillus psychrocarcticus* a *Urosarcina psychrocarcticus* rástli pri teplotách $-1,25^{\circ}\text{C}$ až do $-2,5^{\circ}\text{C}$. V bujóne s 3 % obsahom močoviny posledne uvedený organizmus sa rozmnožil za 25 dní v priemere z 2870 na 28 250 000 buniek na 1 ml.

Haines (39, 40, 41, 42, 43, 44) pracoval s niektorými organizmami rastúcimi za mraziarenských podmienok. Zistil, že *Sporotrichum carnis* rastie pri teplotách od -5 a -7°C . Spodná hranica rastu tejto plesne bola v podchladenom Czapekovom agare blízko -10°C . Na zmrazenom médiu sa nikdy rast nedosiahol. Zistil okrem toho, že za priaznivých podmienok zvláštne druhy organizmov sa môžu rozmnožovať pri 0°C do takej miery, že spôsobujú skaze skladovaného mäsa v polovíčkách. Jeho nálezy nasvedčujú tomu, že „skladovanie pri -5°C spôsobujú nepretržitý pokles počtu baktérií, potom nasleduje obdobie, v ktorom je počet najnižší a neskoršie dôjde k ich rastu, čo platí najmä pre huby a kvasinky“. V žiadnom prípade nezistil viditeľný rast baktérií, kvasiniek alebo húb na baranine, uskladnenej pri -10°C alebo ešte pri nižšej teplote. Organizmy skupiny *Pseudomonas* (fluorescens) rástli pomerne dobre pri 0°C . Pokusy s rôznymi kmeňmi *Actinomyces* ukázali, že pre niektoré je minimálna teplota rastu 0°C , jeden kmeň rástol pri teplotách pod -5°C . Rôzne kvasinky a *Toruly* vyskytujúce sa obvykle na chladenom mäse rástli pomerne dobre pri -5°C .

Bonney (45) v pokusoch so zmrazeným baleným ovocím, ktoré robil v spolupráci s Bureau of Plant Industry zistil, že teplota $-1,11^{\circ}$ umožňuje rast plesní a že za určitých podmienok môžu rásť aj za značne nižších teplôt. Koncentrácia sirupu a stupeň vaku v obale za týchto podmienok sú dôležitými činiteľmi zabráňujúcimi rastu mikroorganizmov.

Lea (46) zistil, že skladovanie pri teplote -5°C nezabraňuje rastu plesní a kvaseniu na zmrazenej baranine a jahňacine, rast sa však už nedá pozorovať pri -10 alebo -20°C . Na úplne čerstvom hovädzom mäse skladovanom pri 0°C , ktoré sa pravidelne vyšetrovalo po 42 dňoch, bolo ku koncu skladovacej periódy vidieť rozsiahly rast plesní, avšak vzorky skladované za rovnakých podmienok, ale v prúdiacom vzdušnom prostredí, vo veľkej väčšine nemali na povrchu viditeľné kolónie. Na jahňacine a bravčovine, ktorá bola uskladnená za tých istých podmienok, ale s vetraním nerástli plesne ani kvasinky po 60 dňoch. Plesne, kvasinky a baktérie rástli na hovädzine za 42 dní uskladnenej pri teplote $-1,6^{\circ}\text{C}$ bez vzduchovej ventilácie.

Magoon (47) pozoroval rast mnohých plesní na pevne zmrazenom ovoci a sporuláciu týchto organizmov hlboko pod nulou (skladovanie v distribúcii okolo

—5 °C); Berry (48) zistil rast ružových kvasiniek a húb na jahodách zabalených do papierových krabičiek a uskladnených pri —2,22 °C.

Keďže je široký záujem o význam *Clostridium botulinum* v spojitosti s konzervovanými potravinami, zaoberali sa s tým mnohí autori a publikovali sa mnohé práce o raste tohto mikroorganizmu pri teplotách pod —0,55 °C. (49, 50)

Golovkin a Čižov (51) uvádzajú, že „niektoré baktérie sa rozmnožujú pri —5 °C (*Bact. fluorescens*, *flavobaktérie*, *mikrokoky*), niektoré dokonca pri —8 °C (*Flavobacterium sulfuricum*, *Bact. lactis viscosum*). Ďalej uvádzajú výsledky Čistjakova, ktorý naočkoval *Bacterium fluorescens liquefaciens* na mäsopeptónový agar s 2 a 20 % cukru. Táto baktéria sa na agare, nachádzajúcom sa v prechladenom stave pri —5 °C sa značne rozmnožovala. Za 10 dní sa v prostredí s 20 % cukru množstvo baktérií znásobilo viac než 30-krát. Po 20 dňoch rozmnožovanie skončilo a začalo sa postupné vymieranie. Rovnako však bolo množstvo baktérií ešte za 50 dní 5-krát väčšie než na začiatku. Ak sa na 38. deň prostredie previedlo z predchladeného stavu do zmrazeného, po 2 dňoch sa našlo 28,5 % pôvodného množstva, čiže 1,3 % pomnoženého množstva.

Podľa Čistjakova a Noskova (52) spóry *Cladosporium herbarum*, *Rhizopus nigricans*, *Aspergillus niger*, *Oidium lactis* rastú, pri 0 °C. *Mucor mucedo* sa vyvíja ešte pri —2 °C, *Penicillium glaucum* pri —5 °C, *Oospora* sp. izolovaná z vajecnej melanže rozvíjala sa pri —8 °C za 44 dní do makroskopických rozmerov a za ďalších 70 dní vytvorila kolónie do 12 mm.

Mathilde von Schelhorn (53) píše, že mnohé organizmy rastú pri —1 °C až 0 °C, menší počet pri —3,9 °C a niektoré formy pri teplotách takých nízkych, ako je —6,6 °C.

Diehl (54) so spolupracovníkmi stanovil, že huby rastú pomaly pri nízkych teplotách.

Tak isto Čistjakov a Botšarova (55), Panašenko a Tatarenko (56) došli k názoru, že plesne sa môžu množiť pri nižších teplotách.

Smart (57) zistil, že fermentácia kvasiniek postupuje pomaly na agare pri —8,9 °C. Niektoré výskumy ukazujú, že rast a množenie mikroorganizmov je možné pri teplotách —9,5 °C.

Tressler (58) uvádza len toľko, že „zmrazovanie a skladovanie za nízkych teplôt je účinnou cestou k zastaveniu rastu baktérií za predpokladu, že skladovacia teplota je pod —9 °C. Pri teplotách nad —9,5 °C sa môžu rozmnožovať niektoré huby a početné iné mikroorganizmy takou mierou, že by mohli spôsobiť skazu potravín. Sú dôkazy, ktoré dosvedčujú, že určité baktérie v niektorých potravinách sa môžu množiť pri takých nízkych teplotách, ako je —17,7 °C, avšak ich rast nie je taký rýchly, aby spôsobil skazu potravín.

Pennington (59) sledoval v mlieku mikroorganizmy, medzi nimi *Bact. coli* a *Bact. aerogenes*, ktoré sa vyvíjali pri —1 °C a ďalej pozoroval rozmnoženie niekoľkých mikroorganizmov v kréme, zmrazenom na —17 °C.

V našej literatúre uvádza Kořínek (60), že „psychofilné baktérie ako *B. vulgare*, *B. fluorescens*, jedna varieta *B. coli* a streptokoky mliečneho kvasenia ohrožujú naše potraviny i v chladničkách. Niektoré psychofilné baktérie môžu rásť i pod 0 °C.“

Bližšie z hľadiska úschovy potravín chladom si tejto otázky všima Kyzlink (61): „Baktériostatická alebo mykostatická účinnosť znížených teplôt — pokiaľ ide o rozličné mikróby — nie je rovnaká. *Bac. botulinus*, *Bact. coli* a *Bact. proteus*

zastavujú svoj rast pri $+2^{\circ}\text{C}$. Psychrofilné mikroorganizmy vegetujú spravidla pri 0°C ešte veľmi dobre, ale pomaly. Z najznámejších rodov baktérií sem patria napr. početní príslušníci *Pseudomonas* a *Micrococcus*, z kvasiniek okrem iných napr. *Torulopsis* a z plesní príslušníci rodu *Penicillium*, *Cladosporium* a *Macor*. Zhruba možno povedať, že vegetácia mnohých psychrofilných mikroorganizmov sa zastavuje až vtedy, keď klesne teplota prostredia na -5 až -10°C .

Schmelck (62) zistil, že voda 50 m od morského l'adovca mala 4–6 mikroorganizmov v ccm; hlavne plesne, ale tiež aj *Bact. fluorescens liquefaciens*.

Janowski (63) našiel v snehovej vode získanej pri $-7,2$ až $-12,2^{\circ}\text{C}$ do 384 kolónií/ml. Uhlčitý sneh, ktorého teplota je -80°C , je bohatý na spóry plesní a na baktérie.

Gibier (64) dokázal, že *Bact. anthracis* a *Bac. septicum* nestratili svoju virulenciu ani po 5 dňoch pri teplote -45°C .

Kurt (65) uvádza, že konzervácia 15 dní pri -15°C nemodifikuje nijako virulenciu *Bac. anthracis*.

Podľa Hessa (66) niektoré mikroorganizmy ako *Micrococcus aurantiacus*, *Bac. mesentericus* sa vyvíjajú lepšie a rýchlejšie po pobyte niekoľko mesiacov pri 0°C , ako keď neboli schladené. Rôzne morské baktérie sa rýchlo zničia pri $+37^{\circ}\text{C}$ v sterilnej morskej vode, avšak pri -3°C sa neskončovalo zníženie počtu ani po 49 dňoch, zatiaľ čo pri $-6,5^{\circ}\text{C}$ a pri -10°C odumreli na konci 42. dňa temer všetky organizmy.

Butjagin (67) uschoval agarové i bujónové kultúry do sibírskeho snehu na 3 mesiace (teplota tam, pravda, neklesala pod -4°C) a baktérie ten experiment vydržali dobre. Nechránené snehom, uložené len v krabíčke, niektoré zahynuli ako *Vibrio cholerae*, *B. dysenteriae*, iné vydržali, ako *B. typhi*, *B. anthracis*, *B. subtilis*, *B. prodigiosum*.

Kvasinky sú rovnako citlivé na pôsobenie chladu. Niektoré fermentujú pri $+30^{\circ}\text{C}$, iné pôsobia ešte pri $+3^{\circ}\text{C}$ a $+5^{\circ}\text{C}$ a Porchet (68) študoval 2 rasy eliptických kvasiniek fermentujúcich ešte pri -3°C .

Peach (69) uvádza, že mikroflóra jahôd v náleve javila pri -20°C a -10°C len klesanie, pri -2°C napred rast (6 týždňov), potom pokles (24 týždňov) a nakoniec mierne stúpanie, vlastne výdrž.

Noskova, Pek a Mojsejeva (70, 71, 72) venovali niekoľko prác štúdiu vplyvu nízkych teplôt na rozmnožovanie a biochemickú aktivitu psychrofilných druhov baktérií. Sledovali pritom počet mikroorganizmov vo vzťahu k zmenám rozpustného dusíka, prchavých kyselín a zásad, pH a iné. Zistili teplotnú závislosť generačnej doby psychrofilov v logaritmickej fáze rastu a chromatografickou analýzou aminokyselín zistili ich kvantitatívny pokles už v začiatočnej fáze chladiarenského skladovania. Rozmnožovanie mikroorganizmov pokračovalo až po hraničnú hodnotu $10^{10}/\text{g}$. Týmito prácami sa výrazne dokázalo, že znížením teploty pokračuje rast psychrofilov ako aj biochemické procesy.

V najnovšom čase sa sleduje väčšinou rast mikroorganizmov v hotových mrazených jedlách. Z tohto hľadiska je zvlášť bohatá anglosaská literatúra, v ktorej sme zachytili niekoľko sto citácií. Z nich uvádzame na tomto mieste len toľko, aby zahrnula táto rešerš okružle 100 citácií.

Súhrnom z literatúry možno povedať, že za nízkych teplôt rastú predovšetkým gramnegatívne nesporelujúce tyčinky. Najčastejšie sa identifikovali príslušníci rodov *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Achromobacter*, *Micrococcus* a *Serratia*;

zriedkavejšie niektoré druhy *Streptococcus*, *Chromobacterium*, *Gaffkya*, *Alcaligenes*, *Lactobacillus* a *Aerobacter*; niekedy *Proteus*, *Bacillus*, *Paracolobactrum*, *Escherichia*, *Salmonella* a *Corynebacterium* a ojedinele ďalšie druhy baktérií. Rôzne druhy *Streptomyces* a *Actinomyces* rastú tiež dosť často v chadiarenských miestnostiach. Najlepšie znášajú však chlad plesne a kvasinkovité mikroorganizmy, z nich menovite uvedieme v poradí častosti výskytu *Mucor*, *Rhizopus*, *Thamnidium*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Monilia*, *Greotrichum*, *Botritis*, *Torula*, *Cladosporium*, *Sporotrichum* *Trichothecium*, *Phycomyces*, *Phytophthora*, *Verticillium*, *Gleosporium*, rôzne druhy *Saccharomyces* *Wardomyces* a iné. Táto zostava nie je samozrejme ani vyčerpávajúca ani všeobecne platná, lebo aj pri veľkom počte stanovení sú výsledky závislé od druhu vyšetrovaných potravín a skladovacích podmienok.

Mikrobiologické nálezy kratší čas chladených a dlhší čas mrazených potravín sa však podstatne rozchádzajú v tom, že po zmrazovaní sa našli najčastejšie sporulujúce organizmy, grampozitívne tyčinky (najmä anaeróby) a kokovité baktérie. Z toho vidieť, že treba rozlišovať medzi psychrofilnými alebo psychrotolerantnými mikroorganizmami, ktoré rastú pri nižších teplotách a psychro- alebo správnejšie cryorezistentnými, ktoré pomerne najväčším podielom prežívajú anabiotický účinok zmrazovania. Niektoré druhy mrazuvzdorných mikróbov sú súčasne schopné aj rastu za chladu, to však neplatí vo všeobecnosti a neopravňuje, aby sa schopnosť rastu za chladu zamieňala s odolnosťou proti mrazu. V chadiarenstve hrá hlavnú úlohu mikroflóra prvého typu, kým druhý ohrozuje akosť mrazených potravín po ich rozmrazení. V oboch prípadoch sú však z technologického hľadiska rozhodujúce biochemické vlastnosti mikroorganizmov, presnejšie povedané, ich enzymatické schopnosti zamerané menovite na rozklad bielkovinových, tukových, pektínových a tiež cukornatých látok.

Aj na iných miestach sa uvádza, že niektoré extrémne psychrofilné mikróby rastú aj pri teplotách pod bodom mrazu, čo je vysvetliteľné tým, že sa tu uplatňujú podmienky, za ktorých extracelulárne aj intracelulárne tekutiny napriek nízkej teplote nezamrznú. Nebudeme vymenovávať ďalšie mikróbné druhy a opisovať podmienky, za ktorých početní autori doteraz nevymenovaní spozorovali rozmnožovanie mikroorganizmov za nízkych teplôt, konštatujeme len, že krajná teplota, pri ktorej bol ešte spozorovateľný rast, bola okolo -10°C . Pritom sa zistili často výrazne morfologické zmeny na mikróbach. Napr. Jensen (73) píše, že identifikácia psychrofilných mikroorganizmov je veľmi obťažná, pretože mikróby, najmä fungi, strácajú mnohé zo svojich typických vlastností. K podobným záverom došli napr. Grajevskij (74), Ubeľanova a Kupcov (75), ktorí študovali morfologické zmeny na bunkách *Endomyces magnusii*, alebo Guibert a Brechot (76), ktorí opísali cytologické zmeny pod vplyvom zmrazovania na *Saccharomyces cerevisiae*. Ingram (77) spozoroval, že huba *Thamnidium*, ktorá pri $+20^{\circ}\text{C}$ rástla typickým spôsobom na sladinke, nedala sa už na zmrazenom mäse identifikovať, resp. rozlišovať od *Mucora*. Pri výskumných prácach sme sa tiež často stretli s atypickou mikroflórou u mrazených potravín, ako aj u testorganizmov, vystavených účinkom mrazu. Už citovaný Jensen (73) vyslovuje názor, že vplyv nízkych teplôt sa neobmedzuje len na morfológiu, ale výrazne sa prejavuje aj vo fyziológii mikroorganizmov. Príčiny periodicity, resp. sezónnosti mnohých mikrobiologicky podmienených javov v prírode vidí v pôsobení mrazu, ktorý zaraďuje medzi činitele pôsobiace na biologické vlastnosti mikroorganizmov.

Hoci rast a metabolizmus sú si svojím chemizmom veľmi blízke, často ich ovplyvňujú nízke teploty veľmi rozdielnym spôsobom. Pod bodom mrazu prestáva rast, resp. rozmnožovanie obyčajne skôr, t. j. pri vyšších teplotách ako výmena látková. Ak skúmame výmenu látkovú na základe aktivity enzýmov, musíme zistiť, že rýchlosť enzymatických reakcií síce klesá so znižovaním teploty, ale zastavuje sa v mnohých prípadoch len hlboko pod bodom mrazu. Proteolytickú aktivitu spozorovali Balls a Lineaweaver (78) až pri -80°C a enzymatický rozklad tukov pri -30°C . Kinetiku peroxidázy stanovovali spektroskopicky Maier a Tappel (79) až po $-23,5^{\circ}\text{C}$. Na základe rozsiahlych zmrazovacích pokusov na čistých roztokoch katalázy a lipázy, ako aj na prirodzených enzymatických materiáloch došiel Kiermeier (80) k záverom, že

1. enzýmy si zachovávajú svoju účinnosť aj v zmrazenom stave a táto je sčasti vyššia ako v tekutom, podchladenom stave pri rovnakej teplote;
2. po rozmrazení majú enzýmy často vyššiu aktivitu ako pred zmrazovaním;
3. opätovné zmrazovanie poškodzuje enzýmy;
4. vplyvy zmrazovania na enzýmy sú vo veľkej miere závislé od špeciálnych podmienok zmrazovania, ktoré sa vo väčšine prípadov uplatňujú obdobným spôsobom ako na mikroorganizmoch.

Len v krátkosti spomenieme ešte selektívne účinky nízkych teplôt na enzýmy. Napr. Fedorov (81) spôsobil striedavým pôsobením tepla a mrazu na azotobaktériách selektívne poškodenie schopnosti viazať dusík. Túto selektívnu inaktiváciu sa podarilo odstrániť pod vplyvom askorbovej kyseliny alebo glutamínovej kyseliny. Aj iné práce referujú o tom, že mrazom inaktívované enzýmy možno pod vplyvom chemických látok reaktivovať. Tak napr. Mondy a Daniel (82) reaktivovali niektoré mrazom inaktívované dehydrázy pomocou dipyridínnukleotidu.

Aj základný výskum (nie potravinársky) sa zaoberal vplyvom nízkych teplôt na zmrazovanie. Zistilo sa, že mikróbné kultúry rastú po rozmrazení niekedy pomalšie a inokedy rýchlejšie než kontrola, ktorá neprekonala nízko-plotnú expozíciu. Deotto (83) zistil, že krátkodobé zmrazovanie, pri -2 až -3°C na 20–40 minút, spôsobuje u *E. coli* 200 až 500 % zvýšenie metabolizmu, sledovaného na základe spotreby kyslíka. Súhlasné výsledky získal Deotto aj s inými druhmi baktérií. Aj Tanguay (84), podobne ako aj Fanelli a Ayres (85) stanovili, že v niektorých prípadoch bol rast kultúry po zmrazovaní výrazne stimulovaný.

Hartsell (86) spresnil tento zjav v tom zmysle, že v dĺžke doby pôsobenia mrazu videl činiteľa, ktorý určuje kinetiku rastu kultúry po rozmrazení. Podľa neho a v protirečení k Deottovi má dlhodobé zmrazovanie kultúry pôsobiť stimuláciu rastu, kým krátkodobé jeho spomalenie.

Z á v e r

Na základe uvedených poznatkov pokračuje výskum s potravinárskym zameraním na mikrobiologickom oddelení Výskumného ústavu mraziarenského. Po úvodných metodologických výskumoch (87) sa zamerali práce na stanovenie mikrobiologických pomerov na mrazených potravinách (88, 89, 90, 91). Pritom sa zistilo, že mrazené potraviny majú typickú bakteriálnu mikroflóru zloženú

prevažne z kryorezistentných kokov a psychrofilných pseudomonas, achromom a flavobaktérií (92). Biochemické skúmanie týchto mikroorganizmov prinieslo zaujímavé poznatky o tom, že enzymatická aktivita baktérií pod vplyvom zmrazovania sa mení (93). Z potravinárskeho hľadiska zvlášť významné je, že za istých podmienok zmrazovania má prežívajúca časť mikroflóry vyššiu biochemickú aktivitu (94, 95). Inými slovami bol objavený proces akejsi mrazovej selekcie (96). Tento selekčný proces sa skúmal aj z genetického hľadiska (97). Nasledovala kvantitatívna štúdia vplyvu nízkych teplôt na mikroorganizmy (98) a súhrnné spracovanie poznatkov o mechanizme a kinetike nízkoteplotného účinku (99, 100) a to v tom zmysle, že sa zistilo, že chladuvzdornosť mikroorganizmov varíruje v širokých hraniciach podľa konštitutívnych a adaptívnych vlastností mikróba, v závislosti od podmienok prostredia. Zmrazovacia teplota alebo rýchlosť zmrazovania a rozmrazovania, ako aj dĺžka času zmrazovania sú dominujúcimi činiteľmi účinnosti nízkych teplôt na živú hmotu. Fyzikálne, chemické resp. koloidálne vlastnosti prostredia môžu kladne aj záporne ovplyvniť rezistenciu proti mrazu. Nízke teploty pôsobia rozdielne na rozmnožovanie a na metabolizmus mikroorganizmov. Enzymatické procesy prebiehajú ešte hlboko pod bodom mrazu, najmä v kapilárnych priestoroch, v ktorých nedochádza k tvorbe ľadu ani pri extrémne nízkych teplotách. Osvetľujú sa rôzne príčiny, ale teórie o konštitucionálnej a fyzickej smrti organizmov následkom chladu si často protirečia. Hľadá sa zákonitosť v priebehu a kinetike hynutia mikroorganizmov vystavených jednorázovému aj opätovnému účinku mrazu. Napriek nerovnakej citlivosti mikróbných jedincov má poradie odumierania kultúry exponenciálny charakter, čiže je matematicky vyjadriteľné.

Literatúra

1. Berry J. A., 1946, J. Bacteriol. 51 : 639.
2. Ingraham J. L., Stokes J. L., 1959, Bacteriol. Rev. 23 : 97.
3. Borstrom G., 1955, Advances in food research 6 : 163.
4. Forster J., 1887, Cent. Bakt. 2 : 337.
5. Fischer B., 1888, Cent. Bakt. 4 : 89.
6. Conradi H., Vogt, H., 1901, Ztsch. Hyg. 37 : 283.
7. Baur E., 1902, Wiss. Meeresuntersuchungen 6 : 9.
8. Brandt K., 1902, Wiss. Meeresuntersuchungen 6 : 23.
9. Schmidt—Nielsen S., 1902, Cent. Bakt., II. Abt., 9 : 145.
10. Müller M., 1903, Arch. f. Hyg. 47 : 127.
11. Feitel R., 1903, Wiss. Meeresuntersuchungen 7 : 91.
12. Klein E., 1907, Meat Trades Journal 26 : 56.
13. Tsiklinsky M., 1908, Cit. v Phytopatology, 1934, 24 : 780.
14. Richardson W. D., 1908, Cit. vo Phytopatology, 1934, 24 : 780.
15. Eustace H. J., 1908, Cit. vo Phytopatology, 1934, 24 : 780.
16. Pennington M. E., 1908, Jour. Biol. Chem. 4 : 353.
17. Ravenel M. P., Hastings E. G., Hammer B. W., 1910, Jour. Inf. Dis. 7 : 38.
18. Conn H. J., 1910, Cent. Bakt. Abt. 2, 28 : 422.
19. Conn H. J., 1912, Cent. Bakt. Abt. 2, 32 : 70.
20. Conn H. J., 1914, Cent. Bakt. Abt. 2, 42 : 510.
21. Brown P. E., Smith R. E., 1912, Cit. vo Phytopatology, 1934, 24 : 780.
22. Massee G., 1912, Jour. Hyg. 12 : 489.
23. Reed H. S., Reynolds R. R., 1916, Cit. vo Phytopatology, 1934, 24 : 780.
24. Brooks C., Cooley J. S., 1917, Jour. Agr. Res. 8 : 139.
25. Vanderleck J., 1917, Cit. vo Phytopatology, 1934, 24 : 780.
26. Vanderleck J., 1918, Cit. vo Phytopatology, 1934, 24 : 780.

27. Monvoisin, 1918, Recueil Méd. Vét. 94 : 306.
28. Brown P. E., Halversen W. V., 1919, ako pod 13.
29. Vass A. F., 1919, ako pod 13.
30. Bidault C., 1921, ako pod 13.
31. Brooks F. T., Kidd M. N., 1921, ako pod 13.
32. Stiles W., 1922, ako pod 13.
33. Brooks F. T., Hansford C. G., 1923, Food Inv. 17.
34. Wright A. M., 1923, Jour. Soc. Chem. Ind. 42 : 488.
35. Brooks F. T., 1923, ako pod 13.
36. Fay A. C., Olson N. E., 1924, ako pod 13.
37. Bardach I., 1924, ako pod 13.
38. Rubentschik L., 1925, Cent. Bakt., II. Abt. 64 : 166.
39. Haines R. B., 1930, ako pod 13.
40. Haines R. B., 1930, Jour. Exp. Biol. 8 : 379.
41. Haines R. B., 1931, ako pod 13.
42. Haines R. B., 1931, Jour. Soc. Chem. Ind. 50 : 223.
43. Haines R. B., 1931, Jour. Exp. Biolo. 9 : 45.
44. Haines R. B., 1932, ako pod 13.
45. Bonney V. B., ako pod 13.
46. Lea C. H., 1931, Jour. Chem. Soc. Ind. 50 : 207.
47. Magoon C. A., 1932, Ind. and Eng. Chem. 24 : 669.
48. Berry J. A., 1932, Food Industries 4 : 205.
49. Perry H., Townsend C. T., Andersen A. A., Berry J. A., 1948, Food Technol. 2 : 180.
50. Kajukova N. I., Kremer N. I., Kremer T. A., 1940, Mikrobiologija 9 : 585.
51. Golovkin N. A., Čižov G. B., 1951, *Cholodilnaja tehnologija piščevych produktov*, Piščepromizdat, Moskva.
52. Čistjakov F. M., Noskova G. L., 1938, Mikrobiologija 7 : 565.
53. Schelhorn M. von, 1951, Advances in Food Research.
54. Diehl H. C., 1945, Ice and Refrig. 108 : 49.
55. Čistjakov F. M., Botšarova Z. Z., 1938, Mikrobiologija 7 : 498.
56. Panašenko V. T., Tatarenko J. S., 1940, Mikrobiologija 9 : 579.
57. Smart H. F., Food Research 2 : 429.
58. Tressler D. K., 1945, Proc. Inst. Food Technol. pp. 146.
59. Pennington M. E., 1945, Cit. Burianková v Záv. zprávě úkolu č. 12 06 řešenej na VÚM — Bratislava, 1955.
60. Kořínek J., 1950, *Mikrobiologie*. Praha.
61. Kyzlink V., 1954, *Konservace potravin*, Praha.
62. Schmelck, ako pod 59.
63. Janowski, ako pod 59.
64. Gibier, ako pod 59.
65. Kurt, ako pod 59.
66. Hess, ako pod 59.
67. Butjagin, ako pod 59.
68. Porchet, ako pod 59.
69. Peach K., Loeser E., 1950, *Die Gefrierkonservierung von Gemüse, Obst und Fruchtsäften*.
70. Noskova G. L., Pek G., Mojsejova E., 1958, *Cholodilnaja technika*, 5 : 44.
71. Noskova G. L., Pek G., Mojsejeva E., 1956, VNICH, Otčet No 1091.
72. Noskova G., Pek G., 1958, Bulletin IIF — Moskva.
73. Jensen L. B., 1954, *Microbiology of meats*, Gerrard Press, Champaign.
74. Grajevskij E. Ja., 1946 *Issledovanija po glubokomu ochlaždeniju protoplazmy*, Diss. Leningrad.
75. Ubelanova I. M., Kupcov M. G., 1958, *Mikrobiologija* 27 : 283.
76. Guibert L., Brechot P., 1955, Ann. Inst. Pasteur 6 : 750.
77. Ingram M., 1951, Appl. Y., Bacteriol. Proc. 14 : 243.
78. Balls A. K., Lineaweaver H., 1938, Podl'a Chem. Zbl. 109 : 3405.
79. Maier V. P., Tappel A. L., 1954, Analyt. Chem. 26 : 564.
80. Kiermeier F., 1944, Biochem. Z. 318 : 275.
81. Fedorov M. V., 1953, Doklady AN SSSR, 89 : 745.
82. Mondy N. L., Daniel L., 1954, Arch. of Biochem. a. Biophysics 48 : 402.

83. Deotto R., 1946, Atti della Accad. Naz. dei Lincei 1 : 241.
84. Tanguay A. E., 1959, Appl. Microbiol. 7 : 84.
85. Fanelli M. J., Alres J. C., 1959, Food Technol. 13 : 294.
86. Hartsell S. E., 1951, Food Research 16 : 97.
87. Arpai J., Bánhegyiová M., Kapustová A., 1959, Veterinársky časopis 9 : 379.
88. Arpai J., 1959, Naša veda, 9 : 481.
89. Arpai J., Bánhegyiová M., 1959, Průmysl potravin 10 : 493.
90. Arpai J., 1960, Veterinársky časopis 9 : 186.
91. Arpai J., 1960, Veterinársky časopis 9 : 270.
92. Arpai J., Bánhegyiová M., 1960, Průmysl potravin 11 : 212.
93. Arpai J., 1960, Chemické zvesti 14 : 148.
94. Arpai J., Lifková Z., 1961, Chemické zvesti 15 : 218.
95. Arpai J. Behúň M., Lifková Z., 1961, Chemické zvesti 15 : 360.
96. Arpai J., 1961, Experientia 17 : 170.
97. Arpai J., 1961, Die Naturwissenschaften 48 : 438.
98. Arpai J., 1961, Biológia 16 : 31.
99. Arpai J., 1960, Biológia 15 : 461.
100. Arpai J., 1961, Archiv f. Mikrobiologie 39 : 195.

STUDIE ÜBER DEN EINFLUSS DER TIEFEN TEMPERATUREN AUF DAS WACHSTUM UND DIE VERMEHRUNG DER MIKROORGANISMEN BEI TIEFEN TEMPERATUREN

Zusammenfassung

Die Studie gibt eine chronologische Übersicht der Erkenntnisse von 100 Autoren über das Vorkommen und die Fortpflanzung von Bakterien, Hefepilzen und Schimmel bei Temperaturen unter dem Gefrierpunkt.