

MATEMATICKO-ŠTATISTICKÝ ROZBOR ZÁVISLOSTÍ KINETIKY RASTU BAKTÉRIÍ PO ZMRAZOVANÍ

JÁN ARPAI, MARTA GRÖFOVÁ, MARTA BÂNHEGYIOVÁ

Nízke teploty účinkujú na živú bunku, resp. mikroorganizmy prostredníctvom rozmanitých fyzikálnych i chemických mechanizmov, ako sme o tom už obširnejšie písali v predchádzajúcich prácach (Arpai, 1960a, 1961a, b, c). Tu sa iba uvádza, že spôsob zmrazovania ako aj rozmrazovania, t. j. teplotný spád a dĺžka času pôsobenia chladu spolu s vlastnosťami média vytvárajú podmienky, ktoré v závislosti od fyziologického stavu, rastovej fázy a fenotypických vlastností kultúry určujú povahu výsledného efektu nízkoteplotnej expozície. Tento efekt sa môže prejaviť ako letálne alebo neletálne fyziologické poškodenie buniek. Podľa Stilleho (1950) kinetika letálneho poškodenia mikroorganizmov zmrazovaním zodpovedá exponenciálnemu procesu (Rahn, 1933). O tomto názore sa medzičasom veľa diskutovalo. Pochybovači sa opierajú najmä o skutočnosť, že krivky odumierania klesajú spočiatku rýchlo, v ďalšom priebehu však už pomalšie, takže počet nepoškodených mikroorganizmov klesá pomalšie než to zodpovedá ich proporcionálnemu ubúdaniu (Christophersen, 1955). Z toho sa vyvodzuje, že organizmy jednotnej populácie musia mať nerovnakú rezistenciu a zhoda kinetiky odumierania s monomolekulárnymi procesmi je len zdánlivá, založená na tom, že aj bunky nerovnakej rezistencie môžu v prípade rovnomernej distribúcie dať krivku odumierania, ktorej funkcia je geometrický rad. Rovnocennosť buniek čistej kultúry je všeobecne a zvlášť z hľadiska rezistencie — ako sa zdá — skôr pomôckou pracovnej hypotézy než objektívnou skutočnosťou. A naopak, rozdielne vlastnosti buniek čistej kultúry pokusne dokázal Málek (1955) a sami sme na tomto základe vypracovali a aplikovali niektoré nové selekčné postupy (Arpai, 1957, 1960b).

Aj v predloženej práci sme vychádzali z predpokladu nerovnocennosti buniek bakteriálnej populácie, pri vysvetlení mechanizmu protirečivého

zjavu, s ktorým sme sa stretávali v pokusoch ako aj v literárnych údajoch. Tento zjav spočíval v tom, že mikróbné kultúry rastú po rozmrazení niekedy pomalšie a inokedy rýchlejšie než kontrola, ktorá neprekonalala nízkoteplotnú expozíciu. Deotto (1946) zistil, že krátkodobé zmrazovanie, t. j. zmrazovanie pri -2 až -3°C trvajúce 20–40 minút spôsobuje u *E. coli* 200–500 % zvýšenie metabolizmu, sledovaného podľa spotreby kyslíka. Súhlasné výsledky získal Deotto aj s inými druhmi baktérií. Tiež Tanguay (1959), podobne ako aj Fanelli a Ayres (1959) dokázali, že v niekoľkých prípadoch bol rast kultúry po zmrazovaní výrazne stimulovaný. Hartsell (1951, 1959) spresnil tento zjav v tom zmysle, že v dĺžke času pôsobenia mrazu videl činiteľa, ktorý určuje kinetiku rastu kultúry po rozmrazení. Podľa neho a v rozpore s Deottovými výsledkami dlhodobé zmrazovanie kultúry stimuluje rast, kým krátkodobé zmrazovanie ho spomaľuje; pritom hovorí, „že z genetického hľadiska došlo k selekcii rýchlorastúcich organizmov“. Sledujúc ďalej túto myšlienku, kladie si otázku, či pred selekčným zásahom nížkej teploty obsahovala čistá kultúra „pomaly“ a „rýchle“ rastúce bunky, poznamenávajúc, že nie je jasné, aký druh genotypického výrazu prislúcha individuálnej rastovej charakteristike. Treba k tomu dodať otázku, či je prípustné rozlišovať bunky s rozdielnymi generačnými časmi v rámci čistej kultúry tak, ako možno z hľadiska generačného času rozlišovať čisté kultúry.

K prvej otázke, týkajúcej sa výskytu rozdielne rýchlo rastúcich buniek v jednotnej mikróbnjej populácii zaujmeme principiálne kladné stanovisko. Môžeme ho zdôvodniť na základe pokusných výsledkov starších prác (Arpai, 1957) a bežným poznatkom, že kolónie čistej kultúry rastú nerovnako rýchlo, čo – samozrejme – nemožno pripisovať výlučne individuálnej rastovej charakteristike jednotlivých buniek. S druhou otázkou, či individuálna rastová charakteristika je na úrovni genotypického znaku, bude sa treba vyrovnáť v ďalších prácach.

V tejto práci sa zameriavame na vysvetlenie zmien rýchlosti rastu kultúry po nízkoteplotnej expozícii tým, že sme ich uviedli do vzťahu k zmenám v zložení bakteriálnej populácie, ktoré nastali následkom a v závislosti od podmienok zmrazovania. Zložky bakteriálnej populácie sme charakterizovali na základe ich výživových nárokov.

Pokusná časť

Pracovný postup:

a) sledovali sme rast testorganizmov pred nízkoteplotnou expozíciou a po nej,

b) stanovovali sme ukazovatele fyziologického stavu inokula pred zmrazovaním a po zmrazovaní,

c) skúmali sme vzťahy medzi zmenami ukazovateľov fyziologického stavu inokula, podmienkami zmrazovania a kinetikou rastu príslušnej kultúry.

Materiál a metódy

Organizmy: Bol použitý psychrofilný kmeň *Pseudomonas fluorescens* a mezofilný kmeň *Escherichia coli*. Boli to tie isté kmene, s ktorými sme pracovali už v predchádzajúcich rokoch (Arpai 1961).

Príprava baktériovej suspenzie: Pred zmrazovaním sa organizmy kultivovali za 18 hodín v skúmavkách s 25 ml bujónu, pri inkubačnej teplote 27 °C pre *Ps. fluorescens* a 37 °C pre *E. coli*. Po tomto čase boli baktérie odstredené, premyté fyziologickým roztokom kuchynskej soli a suspendované do 0,1 % peptónu (pH upravené na 7). Toto suspenzné médium sme zvolili preto, lebo v ňom baktérie počas práce pri izbovej teplote (t. j. pred zmrazovaním a po zmrazovaní) neodumierajú natoľko ako vo fyziologickom roztoku NaCl, pritom toto médium nevplyva ochranné pri zmrazovaní, t. j. len veľmi málo znižuje jeho účinky na baktérie (Straka a Stokes, 1957). Baktériové suspenzie boli pred zmrazovaním upravené podľa zákalu na koncentráciu 10^9 buniek v ml. Použil sa k tomu štandard, ktorého celkový počet zárodkov sa stanovoval platňovou metódou (Standard Methods, 1955). Zákal kultúry sa meral Langeho kolorimetrom; model UK VII s filtrom BG 7 (644 μ) bol upravený na fotonefelometriu podľa Faguet (1935). Súčasne sa odoberala vzorka na stanovenie počtu výživovo nepoškodených (Na_0) a poškodených (Nb_0) buniek.

Zmrazovanie a rozmrazovanie: 20 ml-ové množstvá baktériových suspenzií sa zmrazovali v tenkostenných skúmavkách. Každý pokus sa robil súbežne v 3 skúmavkách. Zmrazovalo sa pri teplotách -4, -18 a -30 °C, a to pracovnou technikou podrobne opísanou v našich predošlých prácach (Arpai 1961a, b). Dĺžka času zmrazovania bola sčasti 24 hodín a sčasti 5 mesiacov. Pri rozmrazovaní sa skúmavky ponorili do vodného kúpeľa s teplotou 25 °C na čas, kým teplota suspenzie nevystúpila na 1–2 °C, čo trvalo len niekoľko minút.

Stanovenie rozsahu poškodenia buniek: Postupovalo sa zásadne podľa metodiky, ktorú vypracovali Straka a Stokes (1959). V ml. suspenzie sa stanovoval počet buniek schopných rastu na minimálnej pôde; tieto bunky sa hodnotili ako výživovo nepoškodené a označovali sa pred zmrazovaním Na_0 , po zmrazovaní Na_t . Súbežne sa

stanovoval počet kolónií na obohatenej pôde. Na základe rozdielu sa vyčíslil počet buniek v ml suspenzie, ktoré sa diferencovali zvýšenými požiadavkami na výživu. Počet týchto buniek sa označil u nezmrazenej kontroly Nb_o , po zmrazení Nb_t .

Zloženie minimálnej pôdy: $K_2HPO_4 = 0,7 \%$; $KH_2PO_4 = 0,3 \%$; Na-citrát $\cdot 2 H_2O = 0,01 \%$; $MgSO_4 \cdot 7 H_2O = 0,01 \%$; $(NH_4)_2 SO_4 = 0,1 \%$; glukóza (oddelené sterilizovaná) $= 0,2 \%$; pH upravené na 6,8.

Ako obohatená pôda sa použil enzymatický natrávený bujón, resp. MPA podľa Mottla (1958), pH 6,8.

Zo stanovených hodnôt sa vypočítal počet buniek usmrtených mrazom

$$Nc = (Na_o + Nb_o) - (Na_t + Nb_t)$$

Ďalej sa zaviedli pomerné čísla (kvóty) jednotlivých, výživove definovaných zložiek baktériovej populácie na celkovom počte buniek pred zmrazovaním (v kontrole).

Boli to:

a_o ... percentuálny podiel nepoškodených buniek v kontrole:

$$a_o = \frac{Na_o}{Na_o + Nb_o} \cdot 100$$

b_o ... percentuálny podiel poškodených buniek v kontrole:

$$b_o = \frac{Nb_o}{Na_o + Nb_o} \cdot 100$$

c ... percentuálny podiel zmrazovaním usmrtených buniek:

$$c = \frac{Nc}{Na_o + Nb_o} \cdot 100$$

a_t ... percentuálny podiel zmrazovaním nepoškodených buniek:

$$a_t = \frac{Na_t}{Na_o + Nb_o} \cdot 100 \quad (= \frac{Na_t}{Na_t + Nb_t + Nc} \cdot 100)$$

b_t ... percentuálny podiel zmrazovaním poškodených buniek:

$$b_t = \frac{Nb_t}{Na_o + Nb_o}$$

Na zvýraznenie presunov, ku ktorým došlo následkom zmrazovania medzi zložkami baktériovej populácie definovanými na základe svojich výživových vlastností slúžili pomerné čísla vzťahované na celkový podiel buniek prežívajúcich nízkoteplotnú expozíciu a na príslušnú kvótu kontroly. Boli to:

a_{tl} ... pomer kvóty nepoškodených buniek po zmrazovaní ku celkovej kvóte prežívajúcich buniek:

$$a_{tl} = \frac{a_t}{a_t + b_t} \cdot 100$$

b_{tl} ... pomer kvóty poškodených buniek po zmrazovaní ku celkovej kvóte prežívajúcich buniek:

$$b_{tl} = \frac{b_t}{a_t + b_t} \cdot 100$$

a_p ... pomer kvóty nepoškodených buniek po zmrazovaní ku príslušnej kvóte kontroly:

$$a_p = \frac{a_t}{a_o} \cdot 100$$

b_p ... pomer kvóty poškodených buniek po zmrazovaní ku príslušnej kvóte kontroly:

$$b_p = \frac{b_t}{b_o} \cdot 100$$

Vzájomný pomer oboch definovaných zložiek baktériovej populácie sa označil, resp. vypočítal u kontroly ako $P_o = \frac{a_o}{b_o} \cdot 100$, po zmrazovaní a

$P_t = \frac{a_t}{b_t} \cdot 100$. Zmenu vo vzťahu týchto pomerov, vyvolanú účinkami zmrazovania sme opäť vyjadrili ako $P_p = \frac{P_t}{P_o} \cdot 100$. Ďalšie ukazovatele,

ktoré vyplynuli z postupu vyhodnocovania výsledkov, uvádzame v časti o výsledkoch.

Sledovanie rastu. Inokulum sa pripravilo z rozmrazenej baktériovej suspenzie odstredením, usadenina sa premyla, znova odstredila a riedila pomocou tekutej pôdy:

1. minimálnej = M
2. obohatenej (natráveným bujónom) = O
3. bujónom (obyčajným) = B

Stanovoval sa počet buniek výživove nepoškodených (Na_t), i počet buniek výživove poškodených (Nb_t); koncentrácia sa upravila na celkový počet $\approx 10^6$ buniek/ml. Podobne sa upravila aj počiatočná hustota nezmrazených

zárodkov (X_0) u kontroly. Kultivačné podmienky boli také isté ako počas prípravy baktériovej suspenzie pred zmrazovaním. Rast sa sledoval v hodinových intervaloch biofotometrickou metódou, ktorú vypracovali Lambin, German a Bernard (1961). Rastové krivky sa kalibrovali na celkový počet baktérií stanovený priamym bakterioskopickým počítaním. Zo súradnicového systému, v ktorom na abscise bol vyznačený čas inkubácie a na ordinátach stupnice percentuálnej priepustnosti svetla ako aj korelované hodnoty celkového počtu buniek v ml kultúry previedli sa exponenciálne časti rastových kriviek do semi-logaritmickej sústavy, čím dostávali tvar priamok.

Pri sledovaní vplyvu zmrazovania na rýchlosť rastu testorganizmov sa vychádzalo zo stanovenia času (t) potrebného na to, aby sa kultúry z počiatočnej koncentrácie (X_0) rozmnožili na ľubovoľne zvolenú koncentráciu, ležiacu v rozsahu exponenciálnej fázy rastu (X_t), ktorú sme si zvolili ($5 \cdot 10^9$ buniek/ml). Rozdiel medzi dĺžkou času narastania kultúry po zmrazovaní a časom narastania kontroly (kultúry pred zmrazovaním) vyjadřila hodnota D v minútach. Percentuálny pomer dĺžky času narastania kultúry ku príslušnej hodnote kontroly sme označili hodnotou Q . Z toho vyplýva, že hodnota D zodpovedala súčtu všetkých parciálnych rozdielov (d) pri jednotlivých deleniach v exponenciálnej fáze. Hodnotu D bolo možno priamo odčítat tým, že sa na grafoch rastových kriviek viedla čiara paralelne s abscisou vo výške hodnoty X_t . Hodnota D je teda priamo úmerná počtu delení (n) potrebných na to, aby z počiatočnej koncentrácie buniek (X_0) vzišla koncentrácia (X_t). Podľa toho platí rovnica $D = d \cdot n$, z ktorej možno vypočítat $d = \frac{D}{n}$, keď je známe n .

K hodnote n sa možno dostať použitím základného vzorca pre výpočet intervalu medzi dvoma deleniami podľa Buchnera ($X_t = X_0 \cdot 2^n$, resp. $n = \frac{\log X_t - \log X_0}{\log 2}$). Generačný čas vyjadrený v minútach (g) sa

vypočítal podľa toho, že $n = \frac{t}{g}$, resp. $g = \frac{t}{n} = \frac{t \cdot \log 2}{\log X_t - \log X_0}$.

Štatistické vyhodnotenie

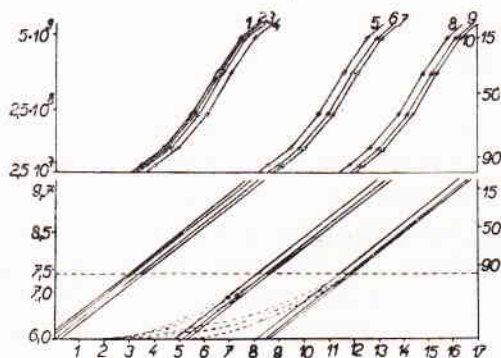
V prípadoch, že rozptyl 3 súbežných výsledkov bol štatisticky bezvýznamný, bral sa na ďalšie vyhodnotenie ich aritmetický priemer. Významnosť rozdielov a vzťahov sa štatisticky hodnotila podľa Weberovej (1957) pri konvenčnej hranici $P < 0,05$.

Výsledky a vyhodnotenie

Konformne k trom etapám pracovného postupu vyhodnocujeme výsledky v troch skupinách:

a) Vyhodnotenie rastových kriviek ukázalo, že ich možno rozdeliť zhruba na dva typy.

I. typ rastových kriviek sa vyznačoval súbežným priebehom vzhľadom na kontrolu, ako vidieť z obrazu 1 aj 2. To znamená, že im prislúchajúce kultúry mali rovnakú exponenciálnu rýchlosť rastu ako kontrola, od



1 Rastové krivky I. typu u testorganizmu *E. coli* po jednodennej expozícii pri teplote -4 , -18 , -30 °C v prostredí O, B, M.

Krivka	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Teplota	-30	-30	K	K	-18	-18	-18	-4	-4	-4
Médium	O \approx B	M	O \approx B	M	O	B	M	O	B	M

Na osi úsečiek: čas v hodinách; na osi poradníc vpravo dole: prepustnosť svetla v % na logaritmickej stupnici; vľavo dole: počet buniek v ml na logaritmickej stupnici. Na hornom grafe to isté s lineárne delenými poradnicami.

ktorej sa odlišovali len rozdielnym časom latencie. O trvaní latentnej fázy teoreticky platí, že môže byť podmienené tým, že k deleniu buniek nedochádza (skutočný lag), alebo že toto delenie v počiatočnej fáze zrýchleného rastu prebieha v metodicky nesledovateľnej oblasti (zdanlivý lag). Pri prepise I. typu rastových kriviek do semilogaritmickej sústavy sme dostali priamky navzájom rovnobežné, ktoré sú na grafoch hrubo vyznačené. Priamky prislúchajúce kultúram vyrasteným z nezmrazeného inokulu v bujóne a obohatenom médiu, napr. u *E. coli* kontroly $K_0 = K_i$, u *Ps. fluorescens* $K_0 = K_B = K_M$, po predĺžení do nemeslateľnej oblasti, ktoré sú na grafoch vyznačené tenkou čiarou, pretínajú

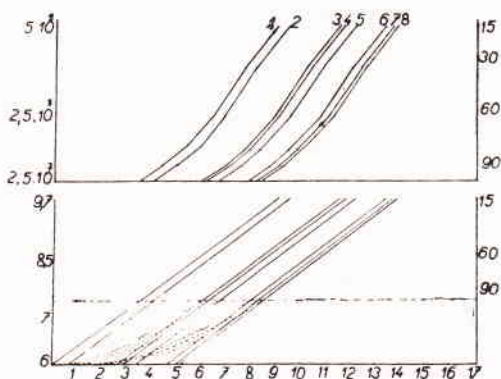
Pokusné podmienky			Ukazovatelia fyziolog. stavu inokula a jeho zmien následkom zmrazovania podľa priemerných hodnôt																
Test-organizmy	Doba zmrazovania v dňoch	Teplota zmrazovania v °C	pre kvótu buniek							pomery			„selekčné faktory“		príklady jednotlivých vel				
			nepoškodených			poškodených			mŕtvych										
			a _t	a _{b1}	a _p	b _t	b _{t1}	b _p	c	P _t	P _p	$\frac{a_{t1}}{b_{t1}} \cdot 100$ P _u = $\frac{a_{t1}}{b_{t1}}$	P _t · c	P _p · c	$\frac{P_o}{P_t \cdot a_p}$	$\frac{P_o}{P_t(a_p + b_p)}$	$\frac{a_{t1}}{a_o} \cdot 100$	$\frac{b_{t1}}{b_o} \cdot 100$	
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	
E. coli	Kontrola		a ₀ = 88,3				b ₀ = 11,7			P ₀ = 750									
	1	— 4	29,1	36,6	32,9	50,5	63,4	433,0	20,4	57,6	7,47	56,78	1 165,0	152,4	0,396	0,028	41,4	545,0	
		—18	4,7	31,1	5,3	10,4	68,9	88,8	84,9	45,5	6,06	45,1	3 865,0	514,1	3,07	0,175	35,2	413,0	
		—30	5,8	42,0	6,6	8,0	58,0	68,4	86,2	72,5	9,67	72,4	6 250,0	834,0	1,28	0,135	52,2	452,0	
	150	— 4	0,08	88,9	0,09	0,01	11,1	0,08	99,9	800,0	106,5	801,0	79 700,0	10640,0	10,4	5,36	10,5	94,0	
		—18	0,11	57,8	0,12	0,08	42,2	0,68	99,8	137,0	18,3	137,0	13 680,0	1821,2	45,6	6,845	65,4	360,5	
		—30	0,20	57,2	0,22	0,15	42,8	1,27	99,6	133,0	17,7	136,0	13 250,0	1768,3	25,6	3,98	64,8	365,5	
Ps. fluorescens	Kontrola		a ₀ = 92,6				b ₀ = 7,4			P ₀ = 1250									
	1	— 4	73,3	87,5	79,2	10,5	12,5	142,0	16,2	698,0	55,8	697,0	11 310,0	904,0	0,031	0,009	89,2	235,0	
		—18	22,4	47,2	24,2	25,1	52,8	339,0	52,5	89,2	7,14	89,3	680,0	393,0	0,58	0,036	50,6	714,0	
		—30	25,3	45,4	27,6	30,4	54,6	411,0	44,3	83,2	6,65	83,1	3 684,0	294,5	0,55	0,034	49,05	732,0	
	150	— 4	2,1	18,9	2,26	4,7	81,1	63,5	93,2	44,7	3,58	23,3	4 166,0	337,0	12,35	0,425	20,4	1095,0	
		—18	0,18	78,3	0,18	0,05	21,7	0,68	99,8	360,0	28,8	361,0	35 900,0	2870,0	19,3	4,09	84,9	293,0	
		—30	0,92	79,7	0,97	0,23	20,3	2,65	98,9	390,0	31,2	392,5	38 510,0	3082,0	3,2	1,03	86,3	274,0	
Stat. korelácia ukazovateľov fyziol. stavu a rýchlosti rastu (koeficient r)			0,32	0,04	0,24	0,33		0,31	$+\overline{-0,59}$	—0,15	0,02	—0,22	$++\overline{-0,83}$	$(++)\overline{-0,75}$	0,20	$(+)\overline{-0,38}$	—0,07	0,01	

(+) — + slabo významné (P > 5 %)

(++) — ++ významné (P ≤ 5 %)

Merania podľa priemerných hodnôt meraní:						Ukazovatelia rýchlosti rastu kultúry:						
Príklady "ory"	príklady jednotlivých veličín					Typ fyzio- logick- ého stavu inokula	Typ rasto- vej krivky kul- túry	Ø D	Q	G variač. rozpätie	\bar{g}/tga priemer	\bar{g}_{ex}/tga_{ex} priemer
$P_p \cdot c$	$\frac{P_o}{P_t \cdot a_p}$	$\frac{P_o}{P_t(a_p + b_p)}$	$\frac{a_{t1}}{a_o} \cdot 100$	$\frac{b_{t1}}{b_o} \cdot 100$	$\frac{a_{t1} \cdot b_o}{a_o \cdot b_{t1}}$							
15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25		
						a > b		510		41 — 43,5	42,5 0,7536	42,5 0,7536
152,4	0,396	0,028	41,4	545,0	7,6	c ≤ 99, a < b	I.	490	196,0	81 — 84,5	83,3 0,3574	42,5 0,7536
514,1	3,07	0,175	35,2	413,0	8,54	c ≤ 99, a < b	I.	310	160,8	65,5 — 68,5	67,5 0,4663	42,5 0,7536
834,0	1,28	0,135	52,2	452,0	11,55	c ≤ 99, a < b	I.	— 20	96,1	40 — 42	41,6 0,7813	42,5 0,7536
10640,0	10,4	5,36	10,5	94,0	11,05	c ≥ 99, a > b	II.	— 70	90,6	35,5 — 37,5	36,6 0,8541	29,4 0,8693
1821,2	45,6	6,845	65,4	360,5	18,1	c ≥ 99, a > b	II.	— 20	96,1	40,5 — 42	41,6 0,7813	23,4 1,4193
1768,3	25,6	3,98	64,8	365,5	17,7	c ≥ 99, a > b	II.	— 40	92,1	36,5 — 40	39,3 0,7885	26,0 1,197
						a > b		540		44 — 45,5	45,0 0,7310	45 0,7310
904,0	0,031	0,009	89,2	235,0	37,8	c ≤ 99, a > b	I.	30	109,2	46,5 — 48,5	47,5 0,6916	45 0,7310
393,0	0,58	0,036	50,6	714,0	7,09	c ≤ 99, a < b	I.	150	127,9	57 — 60,5	58,9 0,5832	45 0,7310
294,5	0,55	0,034	49,05	732,0	6,7	c ≤ 99, a < b	I.	270	150,0	66 — 70,5	68,3 0,4452	45 0,7310
337,0	12,35	0,425	20,4	1095,0	1,86	c ≤ 99, a < b	I.	190	135,2	60 — 61	60,8 0,5423	45 0,7310
2870,0	19,3	4,09	84,9	293,0	29,0	c ≥ 99, a > b	II.	— 40	92,6	41 — 42,5	42,3 0,7541	27,3 1,1504
3082,0	3,2	1,03	86,3	274,0	31,5	c ≤ 99, a > b	II.	— 80	85,2	37 — 39,5	38,7 0,7954	27,8 1,1436
(+ +) — 0,75	0,20	(+) — 0,38	— 0,07	0,01	— 0,02							

stupnicu ordináty v bode zodpovedajúcom hodnote počiatkovej koncentrácie kultúry: $6 (\log 10^6 \text{ buniek/ml.})$. Pri *E. coli* priamka prislúchajúca kontrole, rastúcej na minimálnej pôde (K_M), pretína ordinátu v bode 5,5, čo možno hodnotiť ako slabú signifikantnú odchýlku. To znamená, že pri sledovaných pokusoch rast kontroly prebiehal úplne od začiatku podľa kinetiky, ktorá je znázornená priamkou. Z toho vyplýva, že „latentná fáza“, ako sa javí u rastových kriviek kontroly, je zdanlivá a podmienená prahom citlivosti meracej aparatury. Možno teda konštatovať, že za daných metodických podmienok kontrola rástla bez latentnej fázy.

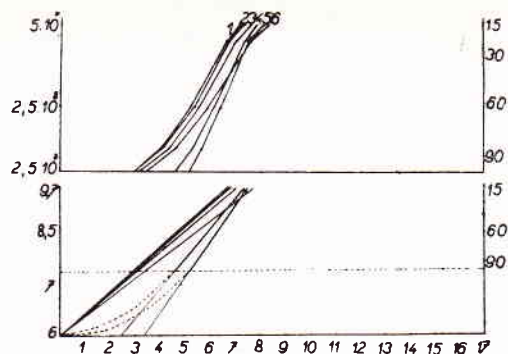


2. Rastové krivky I. typu u testorganizmu *Ps. fluorescens* po jednodennej expozícii pri teplote -4 , -18 , -30 °C a po 150 dennej expozícii pri teplote -4 °C.

Krivka	1	2	3	4	5	6	7	8
Teplota	K	-4	-18	-18	-4	-30	-30	-30
Médium	$O \approx B \approx M$	$O \approx B \approx M$	$O \approx B$	M	$O \approx B \approx M$	O	B	M

Ostatné označenia ako na obr. 1.

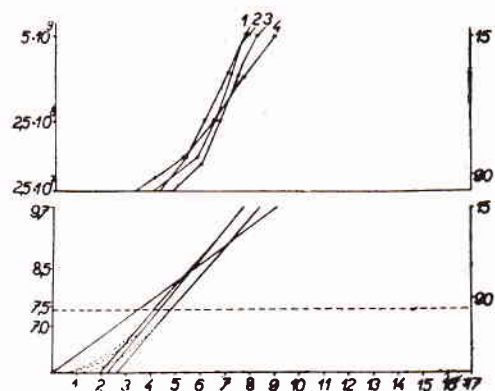
Kultúry vyrastené zo zmrazeného inokula mali rozdielne dlhé latentné fázy. Či išlo o skutočný alebo zdanlivý lag, nedalo sa použitou metodikou stanoviť. Štúdium tejto problematiky bude predmetom ďalšej práce. Tu len konštatujeme, že delenie buniek sa buď skutočne oddialilo, keďže baktérie po nízkoteplotnej expozícii sa ťažšie adaptovali, potrebujúc dlhší čas na začatie rastu a prechodu do fázy zrýchleného rozmnožovania, alebo bolo rozmnožovanie vo fáze zrýchlenia pod prahom metodickej záchytnosti výrazne pomalšie než vo vyhodnocovacom úseku rastovej krivky. Tieto dve alternatívy sú graficky znázornené na obr. 1–4. Skutočný lag vidieť z predĺženia priamky zo sledovanej oblasti rastu do nemerateľnej oblasti po priesečník s abscisou s časovou stupnicou, na



3. Rastové krivky II. typu u *E. coli* po 150 dennej expozícii pri teplote -4 , -18 , -30 °C

Médium	1	2	3	4	5	6
Teplota	-4	-4	-30	-30	-18	K
Krivka	O	$B \approx M$	$O \approx B$	M	$O \approx B \approx M$	$O \approx B \approx M$

Ostatné označenia ako na obr. 1.



4. Rastové krivky II. typu u *Ps. fluorescens* po 150 dennej expozícii pri teplote -18 a -30 °C.

Krivka	1	2	3	4
Teplota	-30	-30	-18	K
Médium	$O \approx B$	M	$O \approx B \approx M$	$O \approx B \approx M$

Ostatné označenia ako na obr. 1.

ktorej sa dá priamo odčítať dĺžka trvania lagu. Charakter zdanlivého lagu je znázornený bodkovanou čiarou. Osobitne sa treba zmieniť o prípade, keď kultúra *E. coli*, ktorá vzišla z inokula vystaveného teplote -30°C počas 1 dňa, rástla o niečo rýchlejšie ako kontrola, majú pritom tvar rastovej krivky I. typu. Podobný jav opísal už Hartsell (1959), bližšie ho však nevysvetlil. Vzhľadom na to, že skrátenie lag fázy v porovnaní s kontrolou je na základe uvedeného vylúčené, možno si polohu rastovej krivky vysvetliť iba na základe zvýšenej rýchlosti delenia v nesledovateľnom úseku počiatočnej rastovej fázy. To však predpokladá, že zmrazovanie vyvolalo zmeny vo fyziológii, resp. v zložení baktériovej populácie, z ktorej sa vyselektovali rýchlejšie rastúce organizmy. Baktérie s touto fyziologickou vlastnosťou si však pravdepodobne svoju domináciu pre výživové ťažkosti neudržali, resp. sa ďalej tak rýchlo nerozmnožovali a tak kultúra pokračovala v raste takou rýchlosťou ako kontrola.

II. typ rastových kriviek charakterizuje rozdielna exponenciálna rýchlosť vo vzťahu ku kontrole. To vyplýva už z toho, že rastové krivky, resp. ich priamočiare prepisy neprebiehali rovnobežne s kontrolou. Pritom platilo, že priamky po predĺžení uzavierali s abscisou uhol (α_{ex}), ktorý je funkciou exponenciálnej rýchlosti rastu, t. j. nepriamo úmerný generáčnemu času v sledovanom úseku rastu (g_{ex}). Táto hodnota nie je závislá od dĺžky lagu, ktorá sa u kriviek II. typu principiálne nelíšila od charakteru lagu kriviek typu I., t. j. aj v tomto prípade sa lag následkom zmrazovania mohol skutočne alebo zdanlivo zmeniť. Podľa toho g_{ex} sa za podmienok, keď kultúra rástla s lag fázou, odlišovala od hodnoty g vypočítanej podľa opísanej metodiky z úseku $X_0 \rightarrow X_1$, z čoho vyplýva, že veľkosť hodnoty g je podmienená trvaním lag fázy. Pre g prislúchal uhol α_0 , ktorý sa dal zostrojiť tým, že sa od bodu rastovej krivky ležiacej vo výške koncentrácie X_1 viedla priamka do počiatočného bodu zodpovedajúceho koncentrácii X_0 . Uvedené možno zhrnúť ako:

$$\begin{aligned} \text{tg}\alpha_{ex} &= f(g_{ex}) ; \text{nezávislý na lagu,} \\ \text{tg}\alpha_0 &= f(g) ; \text{závislý na lagu.} \end{aligned}$$

Tieto vzťahy sa použili v ďalšom pri charakterizácii rastu kultúr a sledovaní jeho závislosti na podmienkach zmrazovania a fyziologických ukazovateľov inokula. Pri štatistickom vyhodnotení tejto korelácie sa využila výhoda bezprostrednej stanovovateľnosti veľkosti uhlov oproti hodnotám g , ktoré treba vypočítavať.

Rastové krivky I. typu mali obvykle kultúry *E. coli* ako aj *Ps. fluorescens* po jednodennom zmrazovaní bez ohľadu na teplotu zmrazovania, ktorá v týchto prípadoch ovplyvňovala iba dĺžku lagu, ako vidieť z obra-

zov 1–2. Po 150-dennom zmrazovaní rástla podľa rastovej krivky I. typu iba kultúra *Ps. fluorescens*, vystavená teplote -4°C . U testorganizmov *E. coli* sa predĺžil lag najviac po zmrazovaní pri -4°C , menej pri -18°C , kým pri -30°C došlo k javu, ktorý sme už spomenuli, totiž, že kultúra rástla o niečo rýchlejšie ako kontrola. *Ps. fluorescens* reagoval všeobecne v menšej miere na vplyvy zmrazovania ako *E. coli*, čo si možno vysvetliť rozdielmi cryosenzitivít. Pomerne najdlhšie zdržanie rastu testorganizmu *Ps. fluorescens* spôsobilo jednodenné zmrazovanie pri -30°C , len o málo kratší bol lag po 150 dennom zmrazovaní pri -4°C a po jednodennom zmrazovaní pri -18°C . Krátkodobé zmrazovanie pri -4°C pôsobilo však len bezvýznamné zvýšenie hodnoty g pri nezmenenej hodnote g_{ex} ako to vo všeobecnosti zodpovedá typu I. Vplyv zloženia kultivačného média sa v prípadoch, kde bol rast charakterizovaný I. typom krivky prejavil v tom, že v pôde obohatenej hydrolyzátnymi a látkami vitamínovej povahy rástli kultúry s kratším lagom ako v pôde minimálnej. O uvedenom podrobnejšie orientujú ukazovatelia rastu v tabuľke 1.

Rastové krivky II. typu sú znázornené na obrazoch 3 a 4. Patria kultúram, ktoré vyrástli z inokúl dlhodobe zmrazovaných. V týchto prípadoch sa po zmrazovaní fáza lag zmenila, resp. aj nezmenila; exponenciálna rýchlosť rastu vzrástla však vždy. Najvýraznejšie zrýchlenie rastu spôsobilo dlhodobé zmrazovanie *E. coli* pri -4°C ako vidieť z grafu na obr. 3. Došlo tu ku skráteniu generačného času v exponenciálnej fáze (g_{ex}), pri nezmenenom, resp. nulovom lagu. Dlhodobé zmrazovanie malo aj pri ďalších teplotách za následok stimuláciu rastu kultúry *E. coli*, ktorá sa prejavila vo vzťahu ku kontrole aj napriek tomu, že kultúry vyrástli po istom trvaní lagu. *Ps. fluorescens* reagoval aj v tomto prípade s menšími výkyvmi na zmrazovanie, čo zodpovedalo našej predstave o všeobecnom význame cryorezistencie pre efekty nízkych teplôt. Ale aj pritom bolo možné zaznamenať vzostup rýchlosti rastu po dlhodobom zmrazovaní, ktorý záležal v skrátení generačného času g_{ex} pri miernom predĺžení latenčnej fázy vo vzťahu ku kontrole. Účinky zmrazovacích teplôt -18 a -30°C sa od seba významnou mierou neodlišovali.

Pri sledovaní vplyvu dlhodobého zmrazovania sme nespozorovali rozdiely v kinetike rastu v rôznych živných prostrediach, menovite nie v tom zmysle, že by rast v minimálnej pôde bol pomalší. Platí to pravda len pre kultúry rastúce podľa charakteristiky II. typu.

b) Stanovenie fyziologických ukazovateľov inokula a ich zmien následkom zmrazovania sa robilo so zameraním na pracovnú hypotézu cpierajúcu sa o výsledky predchádzajúcich prác (Arpaí, 1961a, c), ktorú možno vyjadriť takto:

ad 1. zmeny fyziologického prejavu kultúry sú späté so zmenami vzájomného pomeru zložiek fyziologicky plnohodnotných a menejcenných organizmov bakteriálnej populácie;

ad 2. že bunky bakteriálnej populácie sú nerovnako rezistentné, pričom najodolnejšie sú súčasne aj fyziologicky najaktívnejšie, resp. rastú najrýchlejšie;

ad 3. z uvedeného sa usudzuje, že fyziologická aktivita kultúry je tým vyššia, čím menší bude podiel poškodených buniek a selekčný zásah je tým účinnejším, čím bude menší podiel nepoškodené prežívajúcich organizmov, t. j. pri ideálnej, maximálne účinnej selekcii iba jedna nepoškodená bunka by mala selekčný zásah prežiť.

Pokusné práce zamerané na 1. bod vychádzali zo stanovenia počtu baktérií s normálnymi (Na_o , Na_t) a so zvyšnými nárokmi na živiny (Nb_o , Nb_t), resp. z počtu mrazom usmrtených buniek. Postupujúc podľa metodiky sme vypočítali z nameraných hodnôt ukazovatele na vyjadrenie:

a) podielu definovaných zložiek bakteriálnej populácie v celkovom počte zárodkov (a_o , b_o , c , a_t , b_t) a v kvóte buniek prežívajúcich zmrazovanie (a_u , b_u);

b) vzťahu týchto hodnôt k príslušným hodnotám kontroly (a_p , b_p).

Obdobným spôsobom sme vyčíslili aj vzájomné vzťahy oboch definovaných zložiek bakteriálnej populácie (P_o , P_t) a zmeny týchto vzťahov následkom zmrazovania (P_p).

Experimentálnemu štúdiu hypotézy vyslovenej v bodoch 2 a 3 slúžili ukazovatele, ktoré sme zostrojili na základe úvahy, že relatívne hodnoty vyjadrujúce vzájomné vzťahy definovaných zložiek a zmeny týchto vzťahov budú korelované so zmenami fyziologických prejavov kultúry len v prípade, že tie ukazovatele sa uvedú do funkčného vzťahu s kvótou selekčne vylúčených, t. j. odumretých organizmov (c). To sa dalo v primitívnej forme realizovať vynásobením hodnôt P_t alebo P_p kvótou usmrtených buniek (c).

Pokusne získané výsledky spracované do uvedených ukazovateľov sú zostavené do tabuľky 1. Z nich vidieť:

Krátkodobé zmrazovanie pôsobilo pri -4°C na *E. coli* len v malej miere letálne ($c \approx 20\%$), pričom medzi prežívajúcimi baktériami došlo k výraznému zvýšeniu podielu poškodených organizmov, vyčíslené ukazovateľom b_p na 433 %, na ktorých dominanciu v kultúre ukazuje b_u hodnotou $\approx 63\%$. Zmrazovacie teploty -18 a -30°C usmrtili za tých istých pokusných podmienok už vyše 80 % baktérií coli. Medzi prežívajúcimi baktériami aj v tomto prípade nadobudli prevahu poškodené bunky. Medzi účinkami zmrazovania pri -18 a -30°C sa javil rozdiel

v tom, že pri -18°C kvóta usmrtených buniek bola o málo nižšia, kým kvóta poškodených pomerne vyššia ako pri -30°C . Inými slovami po zmrazovaní pri -30°C pri menšom počte prežívajúcich buniek bol podiel nepoškodených buniek vyšší. Krátkodobé zmrazovanie pri -4°C vplývalo na *Ps. fluorescens* letálne v ešte menšej miere než na *E. coli* ($c \approx 16\%$), pričom sa cryorezistencia pseudomonasu výrazne prejavila v tom, že medzi prežívajúcimi organizmami si nepoškodené bunky zachovali v populácii svoju vysokú dominanciu ($a_u \approx 87\%$) keďže pokles kvóty nepoškodených buniek bol v porovnaní s kontrolou ako vidieť z hodnoty a_p nízky, t. j. činil len asi 20% . Zníženie zmrazovacej teploty na -18 , resp. -30°C spôsobilo, že asi polovica exponovaných organizmov uhynula. Medzi prežívajúcimi organizmami došlo k veľmi slabej dominancii poškodených buniek, ktoré ako vidieť z hodnôt b_u predstavovali po -18°C asi 53% a po -30°C asi 55% živých buniek.

Dlhodobé zmrazovanie pri -4°C spôsobilo u testorganizmu *E. coli* maximálne odumieranie. Medzi prežívajúcimi bunkami, ktorých celková kvóta nepresahovala $0,1\%$, bolo skoro 90% nepoškodených. Pri nižších teplotách, t. j. -18 a -30°C vystúpila celková kvóta prežívajúcich buniek na $0,2\%$, resp. $0,4\%$, pričom podiel nepoškodených buniek poklesol až na $\approx 57\%$ ako to vyplýva z hodnôt a_u . Bunky *Ps. fluorescens* zmrazované po rovnako dlhý čas pri -4°C zostali na žive v rozsahu asi 7% , súčasne došlo k presunu výživove definovaných zložiek v tom zmysle, že podiel poškodených buniek vzrástol na vyše 80% . Teplota -18°C usmrtila po 150 dňoch až $99,8\%$ buniek, medzi prežívajúcimi bunkami prevládali nepoškodené bunky, ktoré reprezentovali $\approx 78\%$ bakteriálnej populácie. Účinok teploty -30°C sa bezvýznamne odlišoval od účinkov -18°C v tom, že kvóta uhynutých buniek bola asi o 1% nižšia, kým pomer nepoškodených buniek k poškodeným bunkám bol opäť zhruba $8:2$.

c) Medzi zmenami ukazovateľov fyziologického stavu inokula, podmienok zmrazovania a kinetiky rastu sme našli tieto vzťahy:

1. *E. coli*, ako cryosenzitívny typ bol už po krátkodobom zmrazovaní do značnej miery letálne poškodený, vždy však výrazne $< 99\%$, pritom medzi prežívajúcimi organizmami prevládali viac alebo menej významne výživove poškodené bunky (charakteristika $c \leq 99$, $a < b$). Po dlhodobom pôsobení nízkych teplôt činilo odumieranie $> 99\%$, pričom medzi prežívajúcimi bunkami prevládali vždy i keď nerovnakou mierou výživove nepoškodené bunky ($c \geq 99\%$ $a > b$). *Ps. fluorescens* ako cryorezistentný typ, po krátkodobom zmrazovaní uhynul len v pomerne malej miere bez významných zmien v zložení populácie ($c \leq 99$, $a > b$). Len pri hlbších zmrazovacích teplotách sa zmenil pomer definovaných zložiek

baktériovej populácie v prospech nepoškodených buniek ($c \leq 99$, $a < b$), rovnako tomu bolo aj pri dlhšie trvajúcim zmrazovaní pri -4°C . Naproti tomu nižšie zmrazovacie teploty za týchto podmienok pôsobili na $\approx 99\%$ letálne, pričom medzi prežívajúcimi bunkami získali nepoškodené bunky prevahu ($c \geq 99$, $a > b$).

Mnohostranne podmienené vzťahy medzi pôsobením nízkych teplôt a fyziologickým stavom bakteriálnej populácie sa uvedeným spôsobom pre dané metodické podmienky pri premennej teplote a dĺžke zmrazovania, ako aj pri špecifickej cryorezistencii testorganizmov zužujú na 4 alternatívy, resp. charakteristiky:

I.: $c \leq 99$, $a < b$

Ia: $c \leq 99$, $a > b$

II.: $c \geq 99$, $a > b$

Ila: $c \geq 99$, $a < b$

z nich iba prípad Ila sa v našich pokusných podmienkach, resp. výsledkoch nevyskytol.

2. V prípadoch, keď sa na očkovanie použili bakteriálne suspenzie, ktorým po zmrazovaní prislúchala charakteristika $c \geq 99$, $a > b$ (II) kultúry mali rastové krivky II. typu. Exponenciálna rýchlosť ich rastu bola vyššia ako u kontroly. Túto stimuláciu sme si vysvetlili na základe selekcie rýchlejšie rastúcich organizmov, o ktorých predpokladáme, že patria k najviac cryorezistentnej časti kultúry. Podiel takýchto organizmov v kultúre je pravdepodobne veľmi nízky a preto aby sa nimi ovplyvnil celkový fyziologický prejav kultúry bude asi treba usmrtiť $> 99\%$ populácie.

Kvantitatívna miera stimulácie, priamo viditeľná z polohy rastových kriviek a vyčíslená ukazovateľmi rýchlosti rastu v tabuľke (D ; Q ; g_{ex} , resp. $tg\omega_{ex}$; $g_{ex}(g)$) sa štatisticky analyzovala na stupeň korelácie (Pearsonov test) s jednotlivými ukazovateľmi fyziologického stavu a zmien inokula. Ako vidieť z tabuľky pomerne najvyššia signifikantnosť korelácie sa javí s ukazovateľom $P_t \cdot c$; o niečo nižšia je s ukazovateľom $P_p \cdot c$. Zostavili sme celý rad ďalších ukazovateľov, v ktorých sme sa snažili rozlišovať váhu číselnej hodnoty definovaných zložiek kultúry ich umiestnením vo vzorci ako činiteľ, deliteľ, delenec alebo exponent a dať im špecifickú funkciu zavádzaním konštant. Hodnoty vypočítané podľa niektorých jednoduchších vzorcov sú aj v tab. 1, ďalšie hodnoty zložitejších ukazovateľov predbežne neuverejňujeme, lebo na danom štatistickom súbore neindikujú vzťah medzi charakterom rastu a fyziologickým stavom baktériovej populácie o mnoho citlivejšie ako pomerne jednoduchý vzorec $P_t \cdot c$.

V prípadoch, keď sa inokulovalo bakteriálnymi suspenziami, u ktorých sa účinky zmrazovania zúžili na charakteristiku $c \leq 99$, $a < b$, (I), resp. v jednom prípade aj $c \leq 99$, $a > b$ (Ia), vzišli kultúry rastúce ako krivky I. typu. Pri rovnakej exponenciálnej rýchlosti rastu (pozri g_{ex} , resp. α_{ex}) mali rozdielnú dĺžku lagu (pozri na grafoch pomery $\alpha_0 : \alpha_{ex}$, resp. v tabuľke 1 hodnoty pomeru $g : g_{ex}$). Súhlasne s predpokladom, že selekcia rýchlejšie rastúcich organizmov je podmienená $> 99\%$ usmrtením populácie, nedošlo v týchto prípadoch k stimulácii rastu kultúry, ale naopak k predĺženiu lagu, a to v korelácii so zvýšením kvóty poškodených baktérií. Výnimku predstavoval už spomínaný prípad, že jednodenné zmrazovanie pri teplote -30°C vyvolalo malú a v krátkom čase odznievajúcu stimuláciu rastu *E. coli*. Polohu príslušnej rastovej krivky sme už predtým rozoberali, tu už len poukazujeme na to, že relatívne ukazovatele fyziologického stavu P_c , resp. P_p . c majú v tomto prípade významne vyššie hodnoty, ako pre ostatné inokulá charakteristiky $c \leq 99$, $a < b$, resp. rastové krivky typu I. Naopak nápadne sa blížia k hodnotám príslušných ukazovateľov krivky typu II.

Tu treba poznamenať, že aj keď sa na danom štatistickom súbore podarilo vyhľadať pomerne jednoduchú matematickú diferenciaciu pre dva alternatívne efekty, je zrejmé, že ich nemožno oddeliť ostrou hranicou. Kinetika rastu, ako aj ostatné životné prejavy sú fenotypicky podmienené a len vo zvláštnych prípadoch dôjde k jednoznačnej dominancii istého fyziologického mechanizmu, aký by sa dal pripísať napr. negenetickému adaptácii pre zmeny rastových kriviek podľa I. typu a genotypickej selekcii pre prípady zhrnuté pod II. typ rastových kriviek. Tu treba poznamenať, že nemožno zásadne vylúčiť ani to, že za istých podmienok sa zmrazovaním vyselektujú aj pomaly rastúce organizmy, čo by sa muselo prejavovať vo forme kriviek II. typu s exponenciálnou rýchlosťou rastu nižšou ako u kontrolnej vzorky. Hartsell (1951, 1959) niečo podobného zachytil, zatiaľ však nemáme preto dôkazy.

Diskusia

O tom, že problematiku inhibície a stimulácie nesledujeme len z jednostranného prístupu opísaného v tejto práci, svedčí už séria uverejnených prác, v ktorých sme u väčšieho počtu mikroorganizmov stanovovali vplyv zmrazovania na peptidázovú aktivitu a jej zmeny. Ako zo súborného spracovania dosiahnutých výsledkov vyplýva (Arpai 1961d), boli mnohé poznatky týchto prác, týkajúce sa najmä selekčného efektu zmrazovania, v plnom súlade so závermi predloženej práce. Zistili sme tiež, že nízke teploty môžu vyvolať zmeny u baktérií, ktoré majú cha-

rakter mutácie (Arpai 1961c). Lom v prvej tretine exponenciálneho priebehu rastovej krivky zmrazovanej kultúry v minimálnej pôde sme skúmali aj z hľadiska možnej parasexuálnej interakcie medzi mrazom poškodenými „auxotrofmi“, vyznačujúcimi sa pomalým rastom a mrazom nepoškodenými „prototrofmi“, vyznačujúcimi sa rýchlym rastom. Tieto pokusy ešte nevedli k publikovateľným výsledkom. Predkladáme však prácu, ktorou sme potvrdili pozorovania citovaných autorov o kladnom i zápornom vplyve zmrazovania na rast mikroorganizmov, a súčasne sme prispeli k objasneniu ich protirečivých výsledkov na základe výkladu o závislosti fyziologického prejavu kultúry od selekčného efektu zmrazovania. Súčasne sa však poukazuje na širokú stupnicu fyziologickej aktivity mikroorganizmov a miery jej poškodenia, ktorú bude treba kvantitatívne stanovovať, aby sa spresnili vzťahy, ktoré sa manifestujú práve pri pôsobení nízkych teplôt. Je to pravdepodobne preto, že pomalý antimikrobiálny účinok zmrazovania umožňuje pomerne selektívne rozlíšiť fázy poškodenia kultúry. To však neznamená, že u rýchlejšie účinkujúcich agensov sa vylučuje uplatnenie analogických efektov.

S ú h r n

Rýchlosť rastu bakteriálnej kultúry sa po zmrazovaní vo väčšine prípadov mení v zmysle zápornom (inhibícia) alebo aj kladnom (stimulácia). Sledovali sme limitujúce závislosti týchto zmien k výkladu ich mechanizmu. Mezofilný a cryosenzitívny testorganizmus *E-coli*, ako aj psychofilný a cryorezistentný kmeň *Ps. fluorescens* sa krátkodobe (1 deň) a dlhodobe (150 dní) zmrazovali pri -4 , -18 a -30°C . Pred zmrazovaním a po expozícii bakteriálneho materiálu sa stanovila kvóta buniek schopných rastu na minimálnej živnej pôde (výživove nepoškodené), ako aj vyžadujúcich si k rastu obohatenej pôdy (výživove poškodených). Zistila sa tiež kvóta mrazom usmrtených buniek. Tieto údaje slúžili ako základné ukazovatele fyziologického stavu bakteriálnych suspenzií, ktoré sa použili ako inokulum pre kultivačné testy na stanovovanie rýchlosti rastu. Biofotometrickou metódou sa namerali hodnoty rastových kriviek, bakterioskopicky kalibrované na celkový počet buniek. Skúmali sme vzťahy medzi podmienkami zmrazovania, zmenami ukazovateľov fyziologického stavu inokula a kinetikou rastu príslušných kultúr.

Zistilo sa, že za podmienok, pri ktorých malo zmrazovanie vysokú baktericidnú účinnosť ($> 99\%$ uhynutie buniek), pričom medzi prežívajúcimi organizmami inokula prevládali výživove nepoškodené bunky, sa zvýšila exponenciálna rýchlosť rastu kultúr. K takémuto efektu došlo obvykle až po dlhodobom zmrazovaní a to pri cryosenzitívnom testorga-

nizme už pri zmrazovacej teplote -4°C , u cryorezistentného organizmu však až pri hlbších teplotách.

Opačne, keď následkom zmrazovania sa prejavila dominancia, resp. zvýšenie kvóty výživove poškodených organizmov, došlo k spomaleniu rastu kultúry, ktorá záležala v predĺžení lag-fázy pri nezmenenej rýchlosti rastu vo fáze exponenciálnej. Takýto účinok malo obvykle krátkodobé zmrazovanie, ale na cryorezistentný testorganizmus takto pôsobilo aj dlhodobé zmrazovanie pri -4°C .

Medzi uvedenými dvoma typickými alternatívnymi reakciami v raste testorganizmov na podmienky zmrazovania boli niektoré medzistupne. Avšak pre hodnoty týchto medzistupňov rovnako ako pre celý štatistický súbor platilo, že fyziologický stav inokula, empiricky vyjadrený súčinom kvóty usmrtených organizmov a podielu kvóty nepoškodených buniek s kvótou buniek poškodených, je v signifikantnom vzťahu k rýchlosti rastu kultúr. V práci sa podrobnejšie vysvetľuje princíp postupu, ktorým sa našiel tento vzťah.

Spozorované efekty sa vysvetľujú v prípadoch stimulácie, prejavujúce sa zvýšenou exponenciálnou rýchlosťou rastu, na základe mrazovej selekcie rýchlejšie rastúcich organizmov, o ktorých sa predpokladá, že patria k najviac cryorezistentnej zložke bakteriálnej populácie. Naproti tomu inhibícia, na základe predĺženia lag-fázy je vysvetliteľná spomalenou adaptáciou zmrazovaním poškodených buniek. Selektčné a adaptačné procesy sa vzájomne nevylučujú, resp. sa predpokladá, že sa môžu súčasne uplatniť.

V diskusii sa hovorí o možnostiach spresnenia a širšieho uplatnenia spoznaných vzťahov medzi zmenami fyziologických prejavov a zmenami metabolicky definovaných zložiek kultúry, opierajúc sa pritom aj o výsledky predtým uverejnených prác.

Literatúra

- Arpai J., Frakciovanie spór pri selekcii producentov itakónovej kyseliny. Biologické práce SAV, Bratislava 1957.
- Arpai J., Názory na mechanizmus a kinetiku účinkov nízkych teplôt na mikroorganizmy. *Biológia* 15 : 461, 1960a.
- Arpai J., Veränderungen im Biotin-Anspruch der Hefe nach Ultraviolettbestrahlung. *Ztb. Bakt. II. Abt.* 113 : 202, 1960b.
- Arpai J., Vplyv zmrazovacej teploty na kvótu odumierania a fyziologického poškodenia mikroorganizmov. *Biológia* 16 : 31, 1961a.
- Arpai J., Zur Problematik der baktericiden Wirkung von Antibiotica bei tiefen Temperaturen. *Arch. Mikrobiol.* 39 : 195, 1961b.

- Arpai J., Über die Mutationsauslösung bei *Serratia marcescens* durch Frosteinfluss. Die Naturwissenschaften 48 : 438, 1961c.
- Arpai J., Kälteeinfluss und Peptidase-Aktivität von Bakterien. Experientia 17 : 170, 1961d.
- Deotto R., L'azione del freddo sulla respirazione batterica. Atti della Accad. Naz. dei Lincei, Ser 8., 1 : 241, 1946.
- Faguet M., Une nouvelle method d'étude de la multiplication microbienne. C. r. Soc. Biol. (Paris) 194 : 1763, 1935.
- Fanelli M. J., Ayres J. C., Methods of detection and affect of freezing on the microflora of chicken pies. Food Technol. 13 : 294, 1959.
- Gorrill R. H., Mc Neil E. M., The effect of cold diluent on the viable count of *Pseudomonas pyocyanea*. J. gen. Microbiol. 22 : 437, 1960.
- Hartsell S. E., The growth initiation of bacteria in defrosted eggs. Food Research 16 : 97, 1951.
- Hartsell S. E., Symposium on initiation of bacterial growth. Introduction. Bact. Rev. 23 : 250, 1959.
- Christophersen J., in: Temperatur und Leben od H. Precht, J. Christophersen a H. Hensel, Springer Verlag, Berlin 1955.
- Lambin S., German A., Bernard J., Étude des modalités d'action de quelques substances bactériostatiques a l'égard de *Staphylococcus Aureus* par la méthode des courbes de croissance. Ann. Inst. Pasteur 100 : 427, 1961.
- Málek I., O množení a pěstování mikroorganismů, zvláště bakterií, Praha 1955.
- Rahn O., Order of death of organismus larger than bacteria. J. Gen. Physiol 14 : 315, 1931.
- Rahn O., Barnes M. N., An experimental comparison of differant criteria of death in yeast. J. Gen. Physiol. 16 : 579, 1933.
- Standard methods for the examination of water, sewage, and industrial wastes (10 th. ed.). New-York, American Public Health Association, 1955.
- Stille B., Untersuchungen über den Kältetod von Mikroorganismen. Arch. Mikrobiol. 14 : 554, 1950.
- Straka R. P., Stokes J. L., Rapid destruction of bacteria in commonly used diluents and its elimination. Appl. Microbiol. 5 : 21, 1957.
- Straka R. P., Stokes J. L., Metabolic injury to bacteria at low temperatures. J. Bacteriol. 78 : 181, 1959.
- Tanguay A. E., Preservation of microbiological assay organismus by direct freezing. Appl. Microbiol. 7 : 84, 1959.

MATHEMATISCH-STATISTISCHE ANALYSE DER ABHÄNGIGKEIT DER WACHSTUMSKINETIK VON BAKTERIEN NACH FROSTEINFLUSS

Zusammenfassung

Die Vermehrungsgeschwindigkeit von Bakterienkulturen verändert sich zumeist nach Frosteinfluss. Wir untersuchten die Abhängigkeit und den Mechanismus dieser Veränderungen. Zu den Versuchen nahmen wir einen mesophilen und cryosensitiven Stamm *Escherichia coli* und einen psychophilen und cryoresistenten Stamm *Pseudomonas fluorescens*. Die Kulturen der Testorganismen wurden kurzfristig, d. h. 1 Tag

und langfristig, d. h. 150 Tage bei -4 , -18 und -30°C der Frostwirkung ausgesetzt. Vor dem Gefrieren und nach dem Auftauen bestimmten wir den Anteil der Bakterienzellen, die zum Wachstum auf Minimalnährböden fähig waren. Diese bezeichneten wir als physiologisch, bzw. vom Standpunkt des Ernährungsanspruchs als unbeschädigte Bakterien. Jener Anteil der Bakterienpopulation, der zu seinem Wachstum einen komplexen, angereicherten Nährboden erforderte, konnte als entsprechend beschädigte Bakterien bezeichnet werden. Der Anteil der durch Frost abgetöteten Zellen wurde gleichfalls bestimmt. Bakterienkulturen die auf angeführte Weise charakterisiert waren, verwendeten wir als Inokula zu Vermehrungsgeschwindigkeitsbestimmungen. Die Vermehrungskurven wurden mittels biophotometrischen Trübungsmessungen ermittelt und anhand bakterioskopischer Zählungen kalibriert. Wir untersuchten die Beziehungen zwischen der Gefrierweise, den Veränderungen in der physiologisch unterschiedenen Zusammensetzung der Bakterienpopulation und der Vermehrungskinetik während der Kultivation.

Es konnte festgestellt werden, dass unter den Bedingungen, da das Gefrieren stark baktericid wirkte, das heisst ein Absterben von über 99 % zur Folge hatte, wobei die überlebenden Bakterien zum überwiegenden Teil physiologisch unbeschädigt waren, es zu einer Erhöhung der Vermehrungsgeschwindigkeit während des exponentiellen Wachstums kam. Dieser Effekt konnte zumeist nach einem langandauernden Gefrieren von cryosensitiven Bakterien -4°C und bei cryoresistenten Bakterien bei tieferen Temperaturen beobachtet werden.

Im gegengesetzten Fällen, wenn es unter Gefriereinfluss zu einer Dominanz beschädigter kam, konnte ein verlangsamtes Wachstum der Kulturen festgestellt werden. Diese beruhte in einer Verlängerung der lag-Phase bei unveränderter Vermehrungsgeschwindigkeit in der exponentieller Phase. Dieser Effekt war zumeist die Folge kurzfristigen Gefrierens, doch bei cryoresistenten Testorganismen auch nach langfristigem Gefrieren bei -4°C .

Zwischen den angeführten typischen Reaktionsalternativen der Wachstumsveränderungen nach dem Gefrieren, gab es auch verschiedene Übergangsformen. Es wurde eine statistisch gesicherte Korrelation zwischen der Vermehrungsrate und einer physiologischen Charakterisation der zur Beimpfung verwendeten Bakterienpopulation gefunden. Dies wird im Text eingehend erläutert und eine hypothetische Erklärung der Wirkung der Frostselektion erbracht.