

# O špecifickom účinku zmrazovania tekutým dusíkom na mikroorganizmy

J. ARPAI, J. TOMIŠOVÁ

Poškodenie a usmrtenie mikroorganizmov vplyvom nízkych teplôt sa už sledovalo v mnohých prácach, ktorých výsledky sa dajú zhrnúť do poznatku, že poškodenie bunky nastáva v čase zmrazovania, počas pôsobenia chladu, pri rozmrazovaní a niekedy doznieva poškodenie ešte aj na začiatku obnovenia metabolickej činnosti. Účinok týchto činiteľov je limitovaný konštruktívnymi a adaptívnymi vlastnosťami organizmov, ich fyziologickým stavom, vyrovnanosťou výživy pred a po nízkoteplotnej expozícii, ako aj chemizmom prostredia, v ktorom sa zmrazuje. Komplexný účinok uvedených faktorov, ktoré pôsobia prostredníctvom rozmanitých mechanizmov, má svoj odraz v širokej škále reakcií organizmov, ktorá siaha od irreverzibilného poškodenia po totálnu rezistenciu, ako to vyplýva zo záverov kryobiologickej štúdie (Arpai, 1964). Vo svetle tejto štúdie sa javí, že spoločným menovateľom, na ktorom sa zakladajú všetky mechanizmy poškodenia bunky, je pohyb a prípadná zmena skupenstva vody, nech už jej migrácia má za následok mechanické alebo chemické efekty. Keďže kinetiku tejto migrácie určuje rýchlosť zmrazovania, zdá sa, že to je základný faktor, na ktorý treba vzťahovať ostatné faktory podmienujúce výsledný účinok zmrazovania. Pritom si zasluhuje osobitnú pozornosť ultrarýchle znižovanie teploty, s ktorým je spojený pokles pohybu vody na mieru, ktorá znamená prakticky jej ustrnutie na mieste čiže v amorfnom stave. Teoreticky by sa malo týmto vylúčiť poškodenie bunky za predpokladu, že aj devitrifikácia prebieha tak rýchlo, že sa neprejavuje škodlivý vplyv kryštalizačnej teploty. Pokusy, o ktorých sa tu referuje, slúžili nielen preverovaniu uvedeného teoretického predpokladu, ale aj na porovnávanie biologických účinkov rôznej rýchlosti zmrazovania.

## Materiál a metódy

Organizmy. Kmene *Escherichia coli* B a *Pseudomonas fluorescens*, ktoré sa použili na pokusy, boli tie isté ako pri predchádzajúcich kryobiologických prácach, v rámci ktorých sa spresnili ich rastové a niektoré metabolické charakteristiky pri nízkoteplotnej expozícii (Arpai, 1963, Arpai, Lešková, Longauerová, 1965); ďalej sa pribral k pokusom mikrokokový kmeň zaradený do zbierky pod označením *Micrococcus varians* CCM 188, vyznačujúci sa

tým, že jeho bunky za štandardných kultivačných podmienok sa nezhluovali do mikrokolónií, ako aj vysokou kryorezistenciou (Arpai, 1961).

Médiá. Základná minerálna pôda (ZMP) obsahovala: 2 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 2 g  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ ; 2 g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; 0,2 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,5 g Na-citrát; 0,01 g  $\text{CaCl}_2$ ; 0,005 g  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  na 1000 ml deionizovanej vody. Pri použití ZMP ako predexpozície kultivačnej pôdy sa sterilne pridávala glukóza (0,3 %), ktorá sa autoklávovala oddelene, obdobne ako aj  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ . Úprava pH na 7,2 sa robila lúhom sodným. ZMP sa použila aj ako základné suspenzné médium pri zmrazovaní, ako aj na riedenie, v týchto prípadoch však bez prísady glukózy.

Na stanovovanie počtu prežívajúcich baktérií sa použila obohatená pôda ZMP s prísadou 20 mg kvasničného extraktu, čím podľa skúsenosti z predchádzajúcich prác sa dosiahla vysoká kvóta reaktívacie buniek po zmrazovaní (Arpai, 1964).

### Kultivačná technika a príprava mikrobiálnej suspenzie

Po 18 hod. kultivácii pri 30 °C sa použila bakteriálna suspenzia príslušného testovacieho organizmu na štandardnú inokuláciu ZMP, v ktorej vyrástli kultúry, z nich sa odobral materiál na zmrazovanie vo fáze, keď ich optická hustota, meraná pri 420 nm dosahovala 0,35 absorbancie. Ostatné metodické podmienky prípravy materiálu na zmrazovanie sa zachovali ako v už poslednej citovanej práci.

### Zmrazovanie a rozmrazovanie

a) Veľmi rýchle zmrazovanie sa dosiahlo tým spôsobom, že sa bakteriálne suspenzie (20 ml) v hliníkových nádobkách ponorili do tekutého dusíka v prikrytej Dewarovej nádobe (−196 °C). Touto metódou, prevzatou od Smitha (1961) je zaručený teplotný spád o rýchlosti asi 100 °C/sec.

b) Rýchle zmrazovanie sa robilo obdobne, ponáraním materiálu do acetónového roztoku suchého ľadu (−78 °C). Rýchlosť tohto spôsobu zmrazovania podľa merania Packera, Ingrahama a Schera (1965) dosahovala 15 °C/sec.

c) Pomalému zmrazovaniu zodpovedal ten spôsob, ktorým sa zmrazovalo aj pri predchádzajúcich pokusoch (Arpai, 1961), t. j. v doskovom zmrazovači o teplote −30 °C. V týchto prípadoch teplotný spád sa pohyboval okolo 1 °C/sec.

A. Rýchle rozmrazovanie sa dosiahlo tým spôsobom, že sa hliníková nádobka zohrievala prúdom teplej tekúcej vody (asi 50 °C).

B. Pomalšie rozmrazovanie sa robilo prúdom obyčajnej vodovodnej vody, ktorej teplota bola asi 11–12 °C.

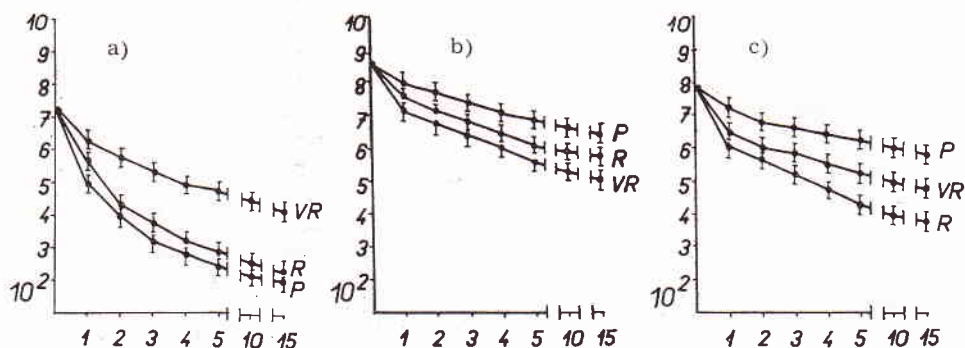
C. Pomalým spôsobom sa rozmrazovalo v chladničke (asi 4 °C).

Jednorázove zmrazovanie trvalo do 30 min, tesne po rozmrazovaní nasledovalo opätovné zmrazovanie, čo sa opakovalo až 15 krát.

### Výsledky a vyhodnotenie

Vplyv rýchlosti zmrazovania pri 1–15 násobnej expozícii na odumieranie sledovaných troch druhov baktérií rozdielnej odolnosti voči mrazu, za štan-

dardných pokusných podmienok, pri pomalom spôsobe rozmrazovania, vyplýva z graficky znázornených pokusných výsledkov na obrazoch 1a, 1b, 1c. Vo všeobecnosti sa dajú vyhodnocovať v tom zmysle, že počet prežívajúcich buniek klesá s počtom cyklov zmrazovania a rozmrazovania. Linearita tohto vzťahu sa však podľa našich výsledkov nejaví ako konštantná. Na rozdiel od prác niektorých iných autorov (Harrison a Cerroni, 1956, Packer, Ingraham a Scher, 1965), nasvedčujú naše pokusy tomu, že kvóta odumierania pri opätovnom zmrazovaní sa mení a to tak, že po prvom až treťom,



Obr. 1. Vplyv rýchlosti zmrazovania, pri jedno až pätnásťnásobnej expozícii, na prežívanie troch druhov baktérií rozdielnej mrazuvzdornosti. — 1a = testovací organizmus *Escherichia coli*, 1b = *Pseudomonas fluorescens* (vyznačujúci sa väčšou mrazuvzdornosťou), 1c = *Micrococcus varians* (vyznačujúci sa veľkou mrazuvzdornosťou). — Označenie kriviek: P = pomalé zmrazovanie, R = rýchle zmrazovanie, VR = veľmi rýchle zmrazovanie. Na osi úsečík počet zmrazovacích cyklov; na osi poradnic počet reaktivovaných buniek v ml.

prípadne aj štvrtom zmrazovaní sa postupne, ale výrazne znižuje baktericidný účinok nízkoteplotnej expozície.

Tieto výsledky sú v zhode s predstavou o nerovnakej mrazuvzdornosti buniek mikrobiálnej populácie a o selekčnom účinku zmrazovania, následkom ktorého ostávajú v kultúre bunky so zvýšenou mrazuvzdornosťou (Arpai, 1963, Arpai, Bánhegyiová, Grófová, Longauerová, 1965).

Rýchlosť zmrazovania nevystupuje vo svetle našich pokusných výsledkov ako činiteľ, ktorý nezávisle podmieňuje baktericidnosť nízkej teploty, ale sa javí naopak vo výraznej závislosti od konštitutívnej mrazuvzdornosti organizmu. Cielený výber testovacích organizmov odlišnej mrazuvzdornosti umožnil demonštrovať významne diferencované reakcie na rýchlosť zmrazovania. Ako vidieť z obrazu 1a odumierajú baktérie *E. coli* najviac pri pomalom zmrazovaní a najmenej pri veľmi rýchlom. Podobné pomery sme zistili aj u iných na zmrazovanie citlivých baktérií v predošlých prácach (Arpai, 1961). Nie nový je aj záver vyplývajúci z výsledkov znázornených na obraze 1b, podľa ktorého psychrotolerantné baktérie *Ps. fluorescens* odumierajú najväčším podielom pri rýchlom a dostatočne hlbokom teplotnom spáde, kým pomalé zmrazovanie sa vyznačuje len malým baktericidným efektom. Veľmi mrazuvzdorné mikróby sú naproti tomu najviac poškodzované pri extrémne rýchlom, resp. hlbokom teplotnom spáde, ako to ukazuje obraz 1c.

Na vysvetlenie diferencovaného efektu zmrazovacej rýchlosti v jeho korelácii k zmrazuvzdornosti organizmu treba poukázať na základný mechanizmus poškodenia bunky mrazom, ktorý sa zakladá na tvorbe ľadu. Táto je podmienená morfológicko-štruktúrnymi vlastnosťami bunky, ako aj chemizmom bunkovej šľavy, ktorým je podmienený jej eutektický bod. Voda viazaná na hydrofilné koloidy alebo v koloidnom mycelu plazmy nezamrzá buď vôbec, alebo len pri extrémne nízkych teplotách. Následkom toho nevzniká jej migrácia a dehydratácia, na ktorej sa zakladajú fyzikálno-chemické procesy vyvolávajúce poškodenie bunky, siahajúce až po hranicu irreverzibility. Organizmy o vyššej mrazuvzdornosti sa vyznačujú zrejme takými vlastnosťami, ktoré jednak morfológicky a jednak fyziologicky zabrahujú vykryštalizácii vody, menovite tým, že jej hladinu metabolicky znižujú a ju fyzikálne alebo chemicky imobilizujú. Čím silnejšie budú tieto väzby vody, resp. adhézne sily plazmy bakteriálnej bunky, o to väčšie musia byť kohézne sily medzi vodnými dipólmi na to, aby sa usporiadali molekuly do mriežky kryštálu, t. j. o to nižšia musí byť zmrazovacia teplota. Táto pracovná hypotéza vysvetľuje nielen uvedené výsledky, ale je aj v súlade s poznatkami nášho mnohoročného výskumu pôsobenia nízkych teplôt na mikrobiálne bunky.

Fyziologický účinok teplotného spádu pri zmrazovaní nemožno sledovať oddelene od analogických vplyvov rozmrazovania, iba ak aplikáciou nepriamych postupov. Zvolili sme si diferenciačnú metódu, pri ktorej sme vyhodnocovali účinky zmrazovania a rôznej rýchlosti v kombinácii s rôznou rýchlosťou rozmrazovania. Z výsledkov týchto pokusov bol zostavený diagram na obraze 2, ktorý ukazuje relatívne rozdiely v prežívaní jednotlivých druhov testovacích organizmov, pri rôznych kombináciách rýchlosti zmrazovania a rozmrazovania. Ukazuje sa:

1. Že po pomalom zmrazovaní je u všetkých typov testovacích organizmov z hľadiska zachovávania životaschopnosti najvhodnejšie pomalé rozmrazovanie.

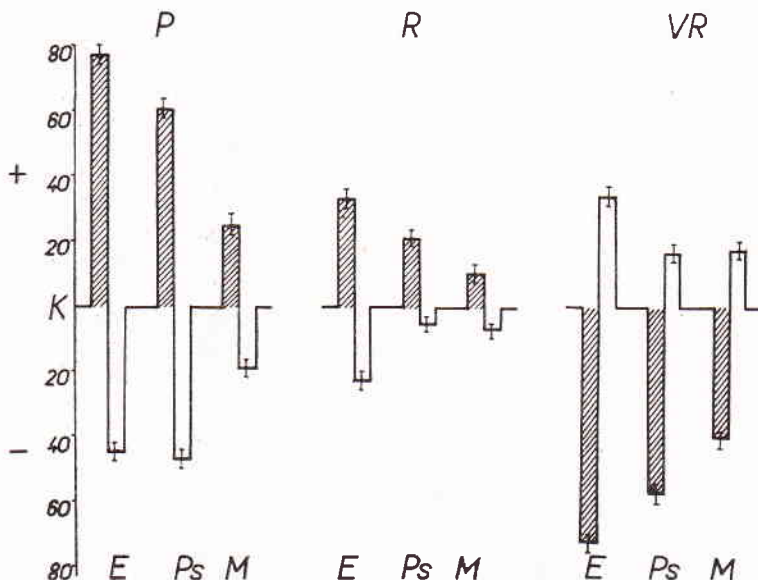
2. Že po rýchlom zmrazovaní sa prejavuje obdobný vzťah ako pod 1, i keď je oveľa menej výrazný; pričom je všeobecným javom, že vplyv spôsobu rozmrazovania je tým menší, čím je mrazuvzdornosť organizmu vyššia.

3. Že po veľmi rýchlom zmrazovaní je účinok rozmrazovania v opačnom vzťahu ako pod 1 a 2, t. j. za týchto podmienok sa pomalým spôsobom rozmrazovania zvyšuje kvóta mrazom usmrtených buniek, kým naopak rýchlym rozmrazovaním sa zvyšuje podiel prežívajúcich. Tento vzťah, ktorý bol za našich pokusov len málo a nejednoznačne podmienený genotypickou mrazuvzdornosťou organizmu, bol by asi býval ešte výraznejší, keby rozdiely v rýchlosti rozmrazovania boli dosiahli extrémnejšie hodnoty. Za daných pokusných podmienok nebol rozdiel rýchlosti rozmrazovania, najmä pomalého rozmrazovania v dost výraznom protiklade k rýchlosti rozmrazovania u kontroly (t. j. podľa spôsobu C).

Výklad pre pozorované efekty sa zakladá opäť na pohybe vody. Tento je priamo závislý od dĺžky času pôsobenia kryštalizačnej teploty, limitovanej teplotným spádom, a to tak pri zmrazovaní ako aj pri rozmrazovaní a v obrátenej závislosti od štruktúrne a fyziologicky podmieneného bunkového obsahu vody schopnej migrácie. Špecifický vzťah veľmi rýchleho zmrazovania k rýchlosti rozmrazovania, ktorý sa vlastne diametrálne líši od pomerov pri menej rýchlom teplotnom spáde, možno vysvetliť tým, že pohyb vody a tak aj biologický účinok sa sústreďuje do fázy rozmrazovania a jeho rozsah bude

podľa uvedeného o to väčší, čím bude čas trvania kryštalizačnej teploty dlhší. Naproti tomu — ako je známe — umožňuje pomalé rozmrazovanie dokonalejšiu spätnú migráciu vody vymrzenej za pomalého teplotného spádu.

Uvedenú známu závislosť mikrobicidného účinku nízkych teplôt od kinetiky cyklu zmrazovania a rozmrazovania dopĺňujú naše výsledky v tom, že poukazujú do akej veľkej miery zasahujú vlastnosti samotnej živnej bunky do



Obr. 2. Vplyv rýchlosti rozmrazovania vo vzťahu k rýchlosti zmrazovania na kvótu prežívania baktérií rôznej mrazuvzdornosti. Legenda: P, R, VR = rýchlosť zmrazovania ako na obr. 1. Biele stĺpce = výsledky pri rýchlom rozmrazovaní (spôsob A), šrafované stĺpce = pomalé rozmrazovanie (spôsob C). Stupnica vyjadruje percentuálne odchýlky ( $\pm$ ) vzťahované na kontrolu (K), ktorá sa rozmrazovala podľa spôsobu B. Testovacie organizmy *Escherichia coli* = E, *Pseudomonas fluorescens* = Ps a *Micrococcus varians* = M.

fyzikálno-chemického diania mechanizmu biologického účinku chladu, a to špecifickým spôsobom za podmienok veľmi rýchleho zmrazovania. Nepochybne určuje ešte rad ďalších činiteľov biologický efekt extrémne nízkych teplôt, pričom doterajšie poznatky nenasvedčujú tomu, že sa tieto musia prejavovať takým spôsobom ako pri pomalom zmrazovaní. Výskum pokračuje na objasnení tejto otázky.

### S ú h r n

Porovnával sa mikrobicidný účinok pomalého, rýchleho a extrémne rýchleho zmrazovania (1, 15, 100 °C/sec), vo vzťahu k rôznej rýchlosti rozmrazovania. Pokusy sa robili na testovacích mikroorganizmoch, ktoré sa výrazne líšili po stránke mrazuvzdornosti a opakovali sa až 15 krát za sebou.

Výsledky ukázali signifikantnú závislosť nízkoteplotného účinku, limitovaného rýchlosťou zmrazovania a rozmrazovania, od konštitatívnej odolnosti organizmov, ako aj špecifický efekt extrémne rýchleho zmrazovania v tekutom dusiku, ktorý sa zakladá na procesoch podmienených rýchlosťou rozmrazovania.

#### Literatúra

- Arpai J., Vplyv zmrazovacej teploty na kvótu odumierania a fyziologického poškodenia mikroorganizmov. *Biológia* 16:31, 1961
- Arpai J., Selective effect of freezing as reflected in growth curves. *Fol. microbiol.* 8:18, 1963
- Arpai J., Über die biologische Wirkung der Kälte insbesondere auf Mikroorganismen. *Die Kälte* 17:485, 1964a
- Arpai J., On the recovery of bacteria from freezing. *Zeitschrift f. Allg. Mikrobiologie* 4:105, 1964b
- Arpai J., Bánhegyiová M., Grófová M., Longauerová D., Kvantitatívne sledovanie vplyvu nízkych teplôt na baktérie. *Bulletin ÚVÚPP* 4:34, 1965
- Arpai J., Lešková Z., Longauerová D., Effect of lowered incubation temperatures on nucleic acid and protein synthesis by a mesophilic and a psychrophilic bacterium. *Fol. Microbiol.* 10:168, 1965
- Harrison A. P., Cerroni R. F.: Fallacy of „crushing death“ in frozen bacterial suspension. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med* 91:577, 1956
- Packer E. L., Ingraham J. L., Scher S., Factors affecting the rate of killing of *Escherichia coli* by repeated freezing and thawing. *J. Bacteriol.* 89:718, 1965
- Smith A. V., Biological effects of freezing and Supercooling. Ed. Arnold Ltd. (London) 1961

### О специфическом действии замораживания жидким азотом на микроорганизмы

#### Выводы

Авторы сравнивали микробицидное действие медленного, быстрого и экстремно быстрого замораживания (1, 15 и 100 °C/сек) в отношении к разной скорости размораживания. Опыты были деланы на тест микроорганизмах, которые между собой отличались чувствительностью к замораживанию, и повторились 15 раз за собой.

Результаты показали показательную зависимость низкотемпературного действия, ограниченного скоростью замораживания и размораживания, от конституционной устойчивости организмов, и так же показали специфический эффект экстремно быстрого замораживания в жидком азоте, который основывается на процессах обусловленных скоростью размораживания.

### Spezifischer Einfluss des Gefrierens mit flüssigem Stickstoff auf Mikroorganismen

#### Zusammenfassung

Der mikrobizide Einfluss einer langsam, schnell und extrem schnell verlaufenden Abkühlung (1, 15, 100 °C/sec) wurde unter Bezugnahme auf verschiedene Auftaugeschwindigkeiten verglichen. Zu den Versuchen verwendete man Testorganismen, die sich betreffs Frostresistenz ausgeprägt unterschieden. Die Gefrierversuche wurden bis 15 mal in der Folge wiederholt.

Die Ergebnisse zeigten eine signifikante Abhängigkeit der Kältewirkung, die auf Grund der Gefrier- und Auftaugeschwindigkeit bestimmt war, von der konstitutiven Widerstandsfähigkeit der Organismen und erbrachten auch einen Beweis für den spezifischen Effekt der extrem schnellen Abkühlung im flüssigen Stickstoff, der jedoch von der Geschwindigkeit des Auftauprozesses abhängig ist.