

Štúdium vplyvu zmrazovania na vznik bakteriálnej rezistencie

J. ARPAI, M. BÁNHEGYIOVÁ, M. GRÓFOVÁ, J. TOMIŠOVÁ

Synergické pôsobenie nízkych teplôt a bakteriostatických resp. baktericidných prostriedkov sme študovali na základe reverzibilného a letálneho poškodenia mikroorganizmov (Arpai 1961a, 1962a). Pokračovali sme sledovaním takto vyvolaných fyziologických a genetických zmien u mikroorganizmov (Arpai 1961b, 1963). Teraz predkladáme zprávu o pokusoch, ktorými sme skúmali vplyv nízkoteplotnej expozície na účinnosť mutagénnych faktorov na baktérie. V prvej časti sme použili chemické látky, a to menovite niektoré deriváty purínu a pyrimidínu, o ktorých je známe nielen to, že indukujú mierne zvýšenie mutačnej kvóty mikroorganizmov, ale aj ich synergizmus s mutagénnou účinnosťou rôznych druhov žiarenia, najmä ultrafialového svetla (Navick a Szilard 1951, Witkin 1958, Lieb 1961, Shankel a Wyss 1961, Shankel 1961, 1962). Zameranie našej práce bolo podmienené tým, že sme predtým zistili určitú analógiu medzi účinkami žiarenia a zmrazovania na mikrobiálnu bunku (Arpai 1964). Mutačný prejav sa zistil na základe streptomycínovej rezistencie, vzhľadom na to, že tento znak sa zvolil aj v citovaných prácach a jeho variabilitu možno metodicky dobre sledovať (Sedliaková 1961a, b).

Materiál a metódy

Mikroorganizmus. K pokusom sa použil kmeň *Escherichia coli* B (1375), ktorý sa uschovával v lyofilizovanom stave. Počas pokusov sa udržiaval dvojtýždenným preočkovaním na šikmom agare s minerálno-glukózovou pôdou. Pred každým pokusom sa overovala citlivosť na streptomycín podľa Otte a Köhlera (1958) a kmeň bol priebežne lyzotypizovaný fágom T₇.

Štandardná bakteriálna suspenzia sa pripravila naočkovaním tekutej minimálnej pôdy, ktorá obsahovala také množstvo glukózy, aby sa ním limitoval rast kultúry, t. j. 0,02 ‰. Zloženie minimálnej pôdy bolo rovnaké ako v predošlej práci a tiež v tých prípadoch, keď sa použila kompletná pôda na báze trypticky natráveného bujónu (Arpai 1961a). Inkubácia pri 37 °C na mechanickej trepačke trvala 15 hodín. Kultúra dosiahla medzi 6. a 7. hodinou inkubácie maximálnu koncentráciu, ktorá obnášala približne $5 \cdot 10^8$ buniek v ml.

Druhý polčas kultivácie slúžil na vyčerpanie endogénnych živín. Vyhladované bunky sa dvakrát za sebou premyli neutrálnym fosfátovým tlmivým roztokom a resuspendovali znova na koncentráciu 5.10^8 buniek v ml. Aj táto bakteriálna suspenzia sa ešte ochudobnila o vnútrobunkové živiny tým, že sa ešte dve hodiny inkubovala za mechanického pretrepávania pri teplote 37°C , až potom sa vystavila vplyvu mutagénnych faktorov, resp. zmrazovaniu.

Expozícia bakteriálnej suspenzie účinkom kofeínu, teobromínu a teofylínu, ktoré sa v množstve 0,5 mg pridávali na ml média, trvala 2 hodiny pri teplote 37°C (generačná doba $g = 25$ minút resp. špecifická rastová konštanta $k = 0,0287 \text{ min}^{-1}$) a úmerne sa predlžovala na 7 hodín pri 25°C ($g = 90$ min, $k = 0,0078 \text{ min}^{-1}$) a na 30 hodín pri 15°C ($g = 380$ min, $k = 0,0015 \text{ min}^{-1}$), t. j. expozičný čas trval pri jednotlivých teplotách vždy približný sedemnásobok generačnej doby. Hodnoty g a k sa vypočítali ako uvedené nasledujúce.

Rast kultúry sa sledoval periodickým meraním zákalu kultúry pomocou Zeissovhovho spektrofotometra pri vlnovej dĺžke $644 \text{ m}\mu$. Spôsob výpočtu generačnej doby (g) sme už uviedli (A r p a i 1963) a špecifickú rastovú konštantu (k) sme počítali zo vzorca

$$k = \frac{dx}{xdt} = \frac{2.303 (\log_{10} x_2 - \log_{10} x_1)}{t_2 - t_1}$$

kde x_1 a x_2 znamenajú počet baktérií v čase t_1 a t_2 , t. j. na začiatku rastu pri štandardnom inokulu o koncentrácii 10^6 buniek v ml a po čase, keď hustota kultúry dosahovala zaokrúhlene 5.10^8 buniek v ml.

Zmrazovanie ako prostriedok predexpozičnej senzibilizácie bakteriálnych buniek sa robilo tým spôsobom, že 20 ml-ové množstvá suspenzie sa zmrazovalo v tenkostenných skúmavkách v mrazničke pri -7 a -18°C . Rozmrazovanie sa dialo pod tečúcou vodovodnou vodou a trvalo tak dlho, kým teplota suspenzie nevystúpila na teplotu vodného prostredia. Pri tomto spôsobe rozmrazovania sa bunky výraznejšie nepoškodili. Nizkoteplotný účinok mal až 90 denné trvanie.

Rezistencia na streptomycín sa stanovovala platňovou metódou obdobne ako to publikovala Sedliaková (1961a, b), pričom sa použili už uvedené glukózo-minerálne pôdy ako minimálne a enzymaticky natrávené bielkovinné pôdy ako kompletné. Prísada 1 mg síranu dehydrostreptomycínu „Spofa“ na 1 ml kultivačnej pôdy slúžila na vyselektovanie resp. zisťovanie vysokorezistentných mutantov, ktoré mali schopnosť sa prejavíť tvorbou kolónií pri optimálnej inkubačnej teplote do 3 dní. Za suboptimálnych teplôt sa inkubačná doba predĺžila primerane k zníženej rýchlosti rastu. To znamená, že pri 25°C trvala postexpozičná inkubácia 10–11 dní a pri 15°C až 43 dní. Sterilným prívodom vlhkosti do Petriho misky cez prúžok filtračného papiera sa zabránilo počas dlhodobej inkubácie vysychaniu pôdy.

Štabilizácia rezistencie na streptomycín sa dosahovala predĺženou expozíciou, ktorá trvala 4 hodiny pri 37°C , 14 hodín pri 25°C a 60 hodín pri

15 °C. Základná dĺžka doby postexpozičnej citlivosti sa prevzala z prác S h a n k e l a (1962), táto sa prepočítala pre pokusné teploty na základe dĺžky generáčnej doby.

Reštitúcia citlivosti na streptomycín sa sledovala na bakteriálnom materiáli vyrastenom na súbežne naočkovanych pôdach bez prísady kofeínu, teobromínu alebo teofylínu. Postupovalo sa tým spôsobom, že z kolónií vyrastených na pôdach so streptomycínom sa naočkovali tekuté pôdy, ktoré sa ponechali na trepačke pri 37 °C na 30 hodín, potom sa preočkovali na čerstvú pôdu rovnakého zloženia a po ďalších 30 hodinách sa skúšala citlivosť kultúry na streptomycín. Strata odolnosti sa sledovala priebehom 10 dennej kultivácie po každom druhom preočkovaní, t. j. v 60 hodinových intervaloch.

Kontroly sa robili na streptomycínovú citlivosť a identitu, t. j. fagotyp pokusného organizmu; stanovovanie spontánneho výskytu proti streptomycínu rezistentných organizmov sprevádzalo každý pokus.

Štatistické vyhodnotenie výsledkov slúžilo na stanovenie významnosti rozdielov medzi jednotlivými chemickými agensmi, teplotami a spôsobmi zmrazovania resp. významnosti rozdielov medzi počtom proti streptomycínu rezistentných organizmov v pokuse a v kontrole. Výsledky pokusov sa považovali za signifikantné, keď pravdepodobnosť, že by hodnoty pokusné boli zhodné s hodnotami kontrolnými, bola menšia ako 5:100 ($P < 0,05$). Výpočet sa robil pomocou Studentovho testu podľa návodu Weberovej (1957).

Výsledky a vyhodnotenia

Zo základných pokusov vyplýva predovšetkým, že v pôvodnej kultúre bolo len veľmi málo proti streptomycínu rezistentných (Stm⁻) buniek, ich počet nepresahoval v priemere pomer 1:10⁸ celkového počtu organizmov. Na streptomycínovej pôde obohatenej živinami vyrástlo spravidla viac kolónií ako na minimálnej pôde s obsahom streptomycínu, čo je v súlade s predstavou, že vznik rezistencie je sprevádzaný takou zmenou v chode metabolizmu, ktorou sa zvyšujú výživové nároky organizmu. Vplyv inkubačnej teploty sa však prejavil opačným spôsobom, a to tak, že pri optimálnej teplote sa na pôde so streptomycínom vyvinulo spravidla najmenej kolónií, kým pri suboptimálnych inkubačných teplotách sa výskyt rezistentných foriem zvýšil.

Zmrazovaním došlo k výraznej diferenciacii bakteriálnej populácie, a to v závislosti od podmienok zmrazovania. Vzhľadom na to, že poškodenie bunky zmrazovaním je pokračujúcim procesom, ktorého rýchlosť určuje predovšetkým vzťah medzi zmrazovacou teplotou a eutektickým bodom biologického systému, spôsobili vyššie teploty (—7) prevažne len reverzibilné poškodenia, prejavujúce sa zvýšenými nárokmi na živiny čiže neschopnosť rastu na minimálnych pôdach, kým hlbšie teploty (—18) vplývali už vo zvýšenom rozsahu letálne, t. j. bunky nerástli ani na kompletných pôdach. Postupný prechod od zvratnej formy poškodenia k nezvratnej, ktorým sa vyznačuje špecifický účinok zmrazovania na bunky, sa ukázal vo výsledkoch našich pokusov na stúpajúcej kvóte odumretých organizmov pri predĺžení doby zmrazovania, sprevádzanej súbež-

ným poklesom kvóty výživove poškodených buniek za podmienok intenzívneho zmrazovania (—18). Tento zjav, ktorý sme opisali už aj v predošlých kryomikrobiologických štúdiách, označujeme ako pozitívnu mrazovú selekciu, ktorej produktom sú extrémne kryorezistentné bakteriálne bunky, ktorých podstatnou charakteristikou je, že neutrpejú zmrazovaním fyziologické poškodenie prejavujúce sa zvýšenými nárokmi na výživu, t. j. rastú aj na minimálnych pôdach. Takto selektované bunky prejavujú niektoré fyziologické plusvarianty ako napríklad rýchlejší rast (A r p a i, 1963).

Pokles koncentrácie živých buniek v suspenzii, ku ktorému došlo následkom zmrazovania, sa vyrovnal zahustením. Robilo sa to pomocou odstredenia bakteriálnej suspenzie a resuspendovaním do média o rovnakom zložení, avšak o primerane redukovanom objeme, aby sa tým zachovala štandardná hustota buniek — jedna zo základných podmienok porovnateľnosti faktorov ovplyvňujúcich zmenu rezistencie.

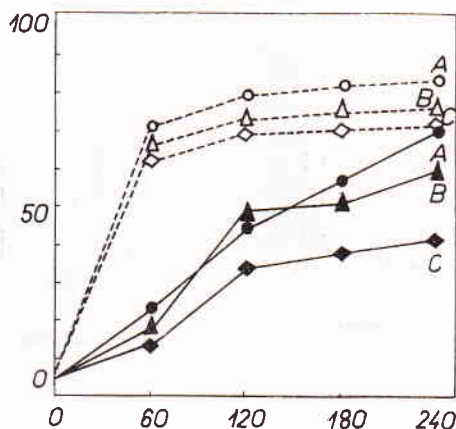
Z pokusných výsledkov sa zisťuje, že po krátkodobom zmrazovaní počet výskytu rezistentných organizmov u kontrolnej suspenzie slabo klesá, kým po dlhodobom zmrazovaní stúpa. Štatistické vyhodnotenie výsledkov stanovovania počtu rezistentných baktérií u kontroly nasvedčuje tomu, že rozdiely medzi výskytom rezistentných organizmov po krátkodobom a dlhodobom zmrazovaní sú v rámci rovnakej teploty bezvýznamné ($P > 0,05$) a len vo vzťahu medzi vyššou a nižšou zmrazovacou teplotou slabo signifikantné. Keď zosúladiť výsledky stanovovania účinnosti zmrazovania na poškodenie buniek a na výskyt rezistentov, dochádza sa k záveru, že takýto spôsob zmrazovania, ktorý z prevažnej miery len poškodzuje, ale neusmrcuje baktérie, má za následok zníženie kvóty rezistentných organizmov. Táto kvóta sa však zvýši pod vplyvom pozitívnej mrazovej selekcie.

Expozíciou bakteriálnych buniek účinkom kofeínu, teobromínu alebo teofylínu sa zvýšil počet rezistentných organizmov v kultúre, a to za niektorých pokusných podmienok aj 4 až 5 násobne. Pri tom sa jednotlivé pokusné modifikácie prejavili opäť tak, že na obohatenej pôde vždy a pri nižšej inkubačnej teplote poväčšinou vyrástol väčší počet *Stm*[—] kolónií. Teplota počas expozície mala však opačný vplyv, t. j. po expozícii pri vyššej teplote sa zjavil vyšší počet *Stm*[—] organizmov. Medzi účinnosťou kofeínu a teobromínu bol menší rozdiel, teofylín bol najúčinnnejší.

Zmrazovaním bakteriálnej suspenzie sa účinok chemických agensov výrazne zvýšil, najmä keď sa zmrazovalo kratší čas, t. j. takým spôsobom, aby nedošlo k pozitívnemu selekčnému efektu. Slabší mrazový inzult pôsobil senzibilizačne na bunky, u ktorých došlo k zvýšenej indukcií streptomycínovej rezistencie prejavujúcej sa však iba pri kultivácii na kompletnej pôde, a to aj v príčinnej súvislosti so zvýšením nárokov na živiny u baktérií reverzibilne poškodených zmrazovaním o menšej intenzite. Teplota pri expozícii chemickému agensu a počas inkubácie, t. j. v priebehu fenotypického prejavu, vplývala na rozvoj streptomycínovej rezistencie v podstate rovnakým spôsobom na bakteriálny materiál zmrazovaný ako na nezmrazenú kontrolu. To znamená, že k tomu, aby sa indukoval maximálny výskyt rezistentných baktérií bolo potrebné exponovať pri vyššej teplote, avšak kultivovať pri suboptimálnej teplote. Výklad pre mechanizmus tohto nerovnakého vzťahu treba hľadať v tak-

tiež rozdielnom teplotnom koeficiente účinnosti chemických agensov a antibiotika, resp. kinetiky výmeny látkovej alebo vývinu rezistencie.

Reštitúcia citlivosti na streptomycín má svoj priebeh graficky znázornený na obraze 1. Z výsledkov vidieť, že počas 10 denného intenzívneho rastu baktérii v prevzdušnenom prostredí silne poklesol počet rezistentných organizmov, ktorý v krajnom prípade dosiahol až 80 %. Z činiteľov ovplyvňujúcich reštitučný proces sa ukázalo ako prvoradé predexpozičné zmrazovanie. Bakteriálny materiál, ktorý bol pred expozíciou krátkodobe zmrazovaný, strácal svoju odolnosť voči streptomycínu len pomaly a významne menším podielom ako kultúry vystavené chemickým agensom bez predchádzajúceho zmrazovania. Rozdiely medzi použitými chemickými mutagénmi, ktoré sa prejavili pri indukcii, sa ukázali obdobne aj v priebehu reštitúcie. Odraz expozičnej a inkubačnej teploty na obnovu citlivosti buniek voči streptomycínu sa v rámci opísaných pokusov nesledoval, lebo tým by sa bol rozsah sledovania rozrástol do nezvláduteľnej šírky.

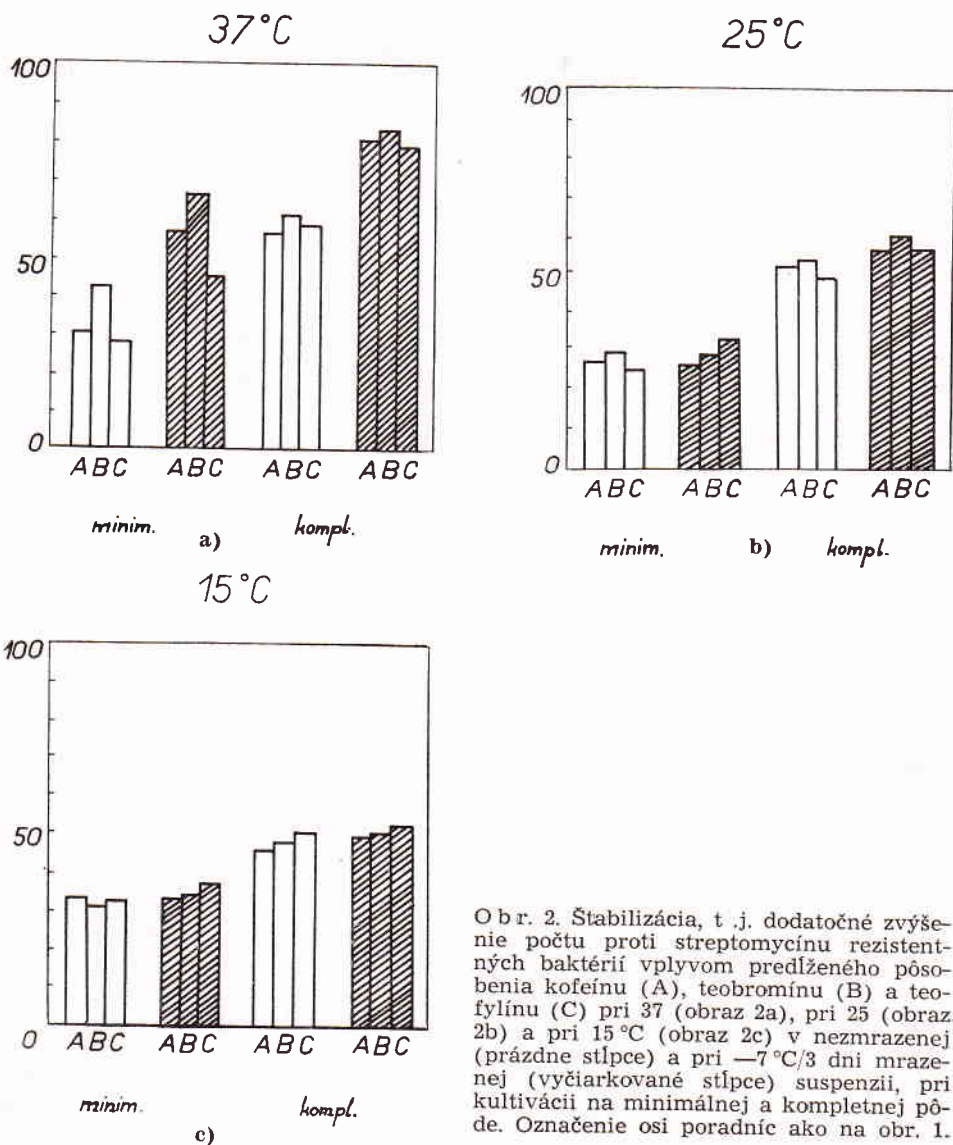


Obr. 1. Reštitúcia streptomycínovej citlivosti buniek *Escherichia coli*. Krivka A — Rezistencia po expozícii kofeínu; krivka B — rezistencia po expozícii teobromínu; krivka C — rezistencia po expozícii teofylínu. Plné krivky: zmrazované baktérie; prerušované krivky: nezmrazované baktérie. Na osi úsečík = čas v hodinách; na osi poradníc = percentuálne zvýšenie podielu na streptomycín citlivých buniek.

Štabilizácia rezistencie, čím sa v zmysle Shankela (1962) rozumie, že pod vplyvom predĺženého resp. dodatočného účinku mutagénneho agensu nastáva ďalšie zvýšenie počtu rezistentných organizmov, sa ukazuje vo výsledkoch graficky znázornených na obrazoch 2a, b, c. Poznemenáva sa, že štabilizácia rezistencie protahovaným účinkom mutagénneho faktoru sa robí v období, v ktorom sú bunky ešte pod vplyvom predchádzajúcej expozície v stave zvýšenej vnímavosti. Pri radiačnej technike, ktorú aplikoval Shankel (1962), trvá táto citlivosť asi 4 hodiny. Za našich pokusných podmienok sme trvanie stavu zvýšenej vnímavosti voči chemickým agensom nestanovili, avšak naše výsledky výrazne ukazujú, že takáto fáza existuje aj po zmrazovaní. Takýto výsledok je v súlade s viacerými súbežnosťami v účinkoch ionizujúceho

ako aj ultrafialového žiarenia a zmrazovania, i keď sú z hľadiska rýchlosti účinkov veľké rozdiely (A r p a i, 1964).

Možno očakávať, že nejednotné vplyvy zmrazovania podmienené spôsobom jeho aplikácie sa prejavujú aj na rozdielnych výsledkoch stabilizačného zásahu. Podrobnejšie sa však táto problematika ešte v rámci predloženej práce neskúmala, takisto ako sa nesledovali ani vplyvy inkubačnej teploty. Zdôvodňuje sa to nielen výskumnou kapacitou, ale aj oprávneným predpokladom, že závislosť efektu sekundárnej expozície sa nebude podstatne líšiť od primárnej. Tento názor je podložený aj tým, že vplyvy inkubačnej teploty a zloženia



kultivačnej pôdy boli zhodné s tými vplyvmi, ktoré sme zaznamenali v predchádzajúcich čiastkových sledovaniach. K reštitučným pokusom sa použil len jeden druh bakteriálneho materiálu, o ktorom sa v predošlých pokusoch dokázalo, že sa zmrazovaním uviedol do najvhodnejšieho stavu pre expozíciu chemickým agensom, t. j. ten, ktorý bol po 3 dni zmrazovaný pri -7°C .

Diskusia

Mechanizmus mutagénneho účinku sledovaných chemických agensov treba hľadať v ich vzťahu, resp. analógii k zložkám dezoxiribonukleovej kyseliny (DNA). Dá sa predpokladať, že následkom inkorporácie analogických purinových derivátov nastávajú zmeny v poradí báz, resp. podjednotiek DNA a to vedie k výskytu mutantov. Táto hypotéza sa opiera o názory, resp. pokusné výsledky niektorých autorov (Greer 1958, Shankel 1961, 1962), rozchádza sa však s údajmi iných (Koch 1956) alebo je odlišným spôsobom vysvetľovaná (Witkin 1958, Lieb 1961). Námietky sa opierajú najmä o pokusy s rádioaktívnym kofeínom, o ktorom sa dokázalo, že sa len v nepatrnej miere včlenil do DNA buniek *Escherichia coli* B. Tento argument, ktorý pochádza predovšetkým od Kocha (1956), je však oslabený tým, že sa na pokusy nezobrali vyhladovelé bunky. U takýchto buniek je totiž vtelenie analógov oveľa pravdepodobnejšie a nie je možné vylúčiť, že aj inými zásahmi sa dá zvýšiť prijímanie analógov do jadernej hmoty. Ako také zásahy sa úspešne aplikovali ionizujúce a ultrafialové žiarenia (Merz, Swanson, Cohn 1961, Shankel 1962). Najmä po ožiarení malými dávkami, ktoré ešte sami osebe nevyvolávali výraznú mutagézu, pôsobili kofeín, teobromín alebo teofylín tak silne mutagénne, že sa hovorilo o „mutačnom synergizme“.

Použitie nízkych teplôt ako činiteľa, ktorý môže prispieť k prenikaniu a inkorporácii analógov do nukleidov, sa opiera nielen o mnohé súbežné účinky zmrazovania a radiačných, resp. radiomimetických zásahov, ale aj o poznatok, že v bunkách žijúcich za nízkych teplôt prebierajú ešte metabolické procesy — i keď len veľmi pomaly, ktoré vedú k extrémnemu vyčerpaniu endogénnych živín a k zvýšenej permeabilite. Je nesporné, že uvedené zmeny v biológii buniek môžu mať obdobný význam pre zvýšenie účinnosti sledovaných chemických agensov ako radiácia.

Predložená práca upravuje ešte aj starší názor vyslovený už citovaným Witkinom (1958), podľa ktorého purínové a pyrimidínové analógy sú pri suboptimálnych teplotách mutačne neúčinné. Pozorovania autorov boli založené na nedostatočnom trvaní expozície. Pri stanovení mutagénnej účinnosti chemikálií pri zníženej teplote treba totiž prihliadať nielen na teplotný koeficient účinnosti príslušnej látky, ale aj na zníženú kinetiku metabolických procesov exponovaného organizmu.

Súhrn

Sledoval sa vplyv krátko a dlhodobého zmrazovania pri -7 a -18°C na baktérie *Escherichia coli*, u ktorých sa účinkom kofeínu, teobromínu a teofylínu indukovala rezistencia proti vysokej koncentrácii streptomycínu (1 mg/ml). K premenným pokusným veličinám patrila aj teplota, pri ktorej sa baktérie

exponovali účinkom chemických agensov, resp. sa inkubovali pri stanovení fenotypického prejavu rezistencie. Dĺžka doby inkubácie sa upravila tak, aby počet generácií bol pri všetkých sledovaných teplotách približne rovnaký (pri 37 °C = 3 dni, pri 25 °C = 10–11 dní, pri 15 °C = 43 dní). Expozícia chemickým agansom trvala pri 37 °C = 2 hodiny, pri 25 °C = 7 hodín a pri 15 °C = 30 hdn. Pri pokusoch o štabilizáciu fenotypického prejavu vzniku rezistentných buniek sa táto expozičná doba ešte dvojnásobila. Študoval sa aj priebeh reštitúcie streptomycinovej citlivosti priebehom 10 dennej kontinuálnej kultivácie.

Zistilo sa, že výskyt proti streptomycínu rezistentných organizmov sa vplyvom sledovaných chemických agensov len málo zvýši, keď sa však bakteriálna suspenzia pred expozičiou zmrazuje, veľmi výrazne stúpne podiel Stm-buniek. Zmrazovanie má tým väčšiu senzibilizačnú účinnosť, čím je podiel výživove poškodených baktérií následkom zmrazovania vyšší, ako je tomu pri krátkodobom zmrazovaní. Rozdiely v účinnosti jednotlivých chemikálií a teplôt sa prejavujú nielen pri prvotnom vyvolávaní rezistentných organizmov, ale aj pri tzv. štabilizácii a reštitúcii.

Literatúra

1. Arpai J., 1961a, Zur Problematik der baktericiden Wirkung von Antibiotica bei tiefen Temperaturen. Arch. Mikrobiol. 39, 195–208.
2. Arpai J., 1961b, Über die Mutationsauslösung bei *Serratia marcescens* durch Frosteinfluss. Naturwiss. 48, 428–439.
3. Arpai J., 1962a, Nonlethal freezing injury on metabolism and motility of *Pseudomonas fluorescens* and *Escherichia coli*. Appl. Microbiol. 10, 297–301.
4. Arpai J., 1963, Selective effect of freezing as reflected in growth curves. Fol. Microbiol. 8, 18–26.
5. Arpai J., 1964, On the recovery of bacteria from freezing. Zeitschr. f. Allg. Mikrobiol. 4, 105–113.
6. Greer S. B., 1958, Growth inhibitors and their antagonists as mutagens and antimutagens in *Escherichia coli*. J. Gen. Microbiol. 18, 543–546.
7. Koch A. L., 1956, The metabolism of methylpurines by *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. 219, 181–188.
8. Lieb M., 1961, Enhancement of ultraviolet — induced mutation in bacteria by caffeine. Z. Vererbungslehre 92, 416–429.
9. Merz T., Swanson C. P., Cohn N. S., 1961, Interaction of chromatid breaks produced by X - rays and radiomimetic compounds. Science 133, 703–705.
10. Novick A., Szilard L., 1951, Experiments on spontaneous and chemically induced mutations of bacteria growing in the chemostat. Cold Spring Harbor Symposia Quant. Biol. 16, 337–343.
11. Otte H. J., Kühler W., 1958, Die Praxis der Resistenz- und Spiegelbestimmungen zur antibiotischen Therapie. Fischer Verlag, Jena.
12. Sedliaková M., 1961a, Adaptívny typ rezistencie mikroorganizmov na streptomycín. Biológia (Bratislava) 16, 10–17.
13. Sedliaková M., 1961b, Variabilita rezistencie mikroorganizmov na streptomycín. Biológia (Bratislava) 16, 18–24.
14. Shankel D. M., Wyss O., 1961, Studies on mutation induced by nonlethal dosages of ultraviolet light. Radiation Research 14, 605–617.
15. Shankel D. M., 1962, „Mutational synergism“ of ultraviolet light and caffeine in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 84, 410–415.
16. Weber E., 1957, Grundriss der biologischen Statistik. Fischer Verlag, Jena.
17. Witkin E. M., 1958, Past — irradiation metabolism and the timing of ultraviolet — induced mutations in bacteria. Proc. Intern Congr. Genet. 10. Congr. 1, 280–299.

Изучение влияния замораживания на возникновение бактериальной резистентности

Резюме

Изучалось влияние кратковременного а также длительного замораживания при -7 и -18°C на бактерии *Escherichia coli*, у которых под влиянием кофеина, теобромина и теофиллина индуцировалась резистенция против высокой концентрации стрептомицина (1 мг/мл). К переменным экспериментальным величинам принадлежала также температура, при которой бактерии выставлялись действию химических агентов, или же инкубировались при определении фенотипического проявления резистенции. Продолжительность инкубации регулировалась так, чтобы число генерации было при всех исследованных температурах приблизительно одинаково (при $37^{\circ}\text{C} = 3$ дня, при $25^{\circ}\text{C} = 10$ дней, при $15^{\circ}\text{C} = 43$ дня). Выставление химическим агентам продолжалось при $37^{\circ}\text{C} = 2$ часа, при $25^{\circ}\text{C} = 7$ часов и при $15^{\circ}\text{C} = 30$ часов. В опытах на стабилизацию фенотипического проявления возникновения резистентных клеток продолжительность экспозиции удваивалась. Изучался также процесс восстановления стрептомициновой чувствительности в течении 10 дневной непрерывной культивации.

Было обнаружено, что встречаемость организмов, резистентных против стрептомицина, влиянием исследованных химикатов только незначительно повышается; но если перед экспозицией суспензия бактерий заморозится, это приводит к очень отчетливому повышению части *stm*-клеток. Сензбилизационное действие замораживания тем выше, чем большая часть бактерий разрушена с точки зрения питания, как это встречается при коротковременном замораживании. Разницы в действии отдельных химикатов и температур проявляются не только при первоначальном вызвании резистентных организмов, но тоже при так называемой стабилизации и реституции.

Untersuchungen über den Einfluss von Gefrieren auf die Resistenz von Bakterien

Zusammenfassung

Der kurz- und langfristige Frosteinfluss (-7 und -18°C) auf Bakterien *Escherichia coli*, die unter der Einwirkung von Coffein, Theobromin und Theophyllin zu einer Resistenz gegenüber von hohen Streptomycinkonzentrationen (1 mg/ml) induziert wurden, kam zur Untersuchung. Zu den veränderlichen Versuchsbedingungen zählte auch die Expositions- — bzw. Inkubationstemperatur, bei der die phenotypische Auswirkung der Resistenzentstehung verfolgt wurde. Die Dauer der Inkubationszeit wurde so gewählt, dass die Generationszahl unter verschiedener Temperaturbedingungen ungefähr die Gleiche blieb (bei $37^{\circ}\text{C} = 3$ Tage, bei $25^{\circ}\text{C} = 10$ bis 11 Tage, bei $15^{\circ}\text{C} = 43$ Tage). Dem Einfluss der chemischen Wirkstoffe wurden die Bakterien bei der Temperatur von $37^{\circ}\text{C} = 2$ Stunden, von $25^{\circ}\text{C} = 7$ Stunden und bei $15^{\circ}\text{C} = 30$ Stunden exponiert. Bei Versuchen, die der Stabilisation der phenotypischen Äusserung der Resistenzwandlung der Zellen dienten, wurden die angeführten Expositionszeiten verdoppelt. Die Restitution der Streptomycinempfindlichkeit wurde im Laufe einer Subkultivation in einer Dauer von 10 Tagen verfolgt.

Es konnte festgestellt werden, dass bei normaler Temperatur unter dem Einfluss der verwendeten chemischen Stoffe die Rate der streptomycinresistenten Organismen nur unbedeutend ansteigt. Falls jedoch die Bakteriensuspension vor der Exposition einem Frosteinfluss ausgesetzt wird, kommt es zu einem ausgeprägten Ansteigen der streptomycinresistenten Rate. Das Gefrieren bedingt eine umso höhere Sensibilisation, je mehr Bakterien infolge der Kälteeinwirkung eine Stoffwechselstörung erlitten, die sich durch erhöhte Ernährungsansprüche ersichtlich macht. Dies trifft im Falle von kurzfristigem Frosteinfluss zu. Die unterschiedliche Einwirkung der untersuchten chemischen Stoffe- und Temperaturen haben ihre Auswirkung nur auf die Induktion, sondern auch auf die Stabilisation der Streptomycinresistenz bzw. auf die Restitution der Streptomycinempfindlichkeit.