

K přítomnosti coliformních mikroorganismů nebo skupiny *Escherichia* v pivě

JOSEF URBÁNEK, OTAKAR ŠAFR, FRANTIŠEK LAŠTŮVKA, Jihomoravské pivovary, n. p. Brno

663.41
576.851.48

Po zavedení nového zpřísněného bodového hodnocení jakosti piva v r. 1966 se zaměřila Státní inspekce jakosti potravinářských výrobků při mikrobiologickém hodnocení i na stanovení coliformních mikroorganismů, které se v atestech klasifikovaly jako *Escherichia coli*.

Podle těchto pozitivních nálezů v pivě byla řada odebraných vzorků piva zařazena do III. skupiny jakosti, ačkoli ostatními chemickými, fyzikálními a smyslovými znaky odpovídala I. skupině jakosti. Tímto stanovením bylo postiženo mnoho odebraných vzorků. Mělo to vliv i na ukazatel jakosti v jednotlivých pivovarech s hmotným postihem všech pracovníků, hodnocených za jakost výrobků.

Vzhledem k aktuálnosti a složitosti při řešení tohoto problému, který se může posuzovat jako indikátor sanitační péče v technologickém postupu výroby piva, řešili jsme tuto otázku ve spolupráci ČSVTS, podnikové pobočky Jihomoravských pivovarů n. p. Brno společně s SII Brno a lékařskou fakultou J. E. Purkyně.

Toto pojednání o coliformních mikroorganismech, včetně skupiny mikroorganismů *Escherichia coli* obsahuje vlastní zkušenosti a poznatky z přednášek a uveřejněné odborné literatury a mají poskytnout všeobecnou informaci o možnostech výskytu vegetace a způsobu řešení v pivovarském průmyslu.

Systematika coliformních mikroorganismů

Při sledování výskytu coliformních mikroorganismů a zejména skupiny *Escherichia coli* v pivě se nejčastěji setkáváme se značně rozdílnými terminologickými údaji. K vyjasnění a pro vysvětlení terminologie těchto mikroorganismů z hlediska nomenklatury pro skupinu *Escherichia* považujeme za nejsprávnější systematiku, která byla uveřejněna v „*Bergeys Manual of Determinative Bacteriology*“ s tímto rozdělením:

Říše (regnum)	<i>Rostliny</i>
— kmen (phylum)	Protophyta
— třída (classis)	Schizomycetes
— řád (ordo)	Eubacterales

- Říše (regnum) Rostliny
— čeleď (genus) Enterobacteriaceae
— skupina (species) Escherichieae
- Skupina *Escherichieae* obsahuje těchto 5 rodů:
1. *Escherichia*
 - *E. coli*
 - *E. aeroscens*
 - *E. freundii*
 - *E. intermedia*
 2. *Aerobacter*
 - *A. aerogenes*
 - *A. cloacae*
 3. *Klebsiella*
 4. *Paracolobactrum*
 5. *Alginobacter*

Jak je z přehledu patrné, obsahuje skupina *Escherichieae* pět rodů. *Escherichia* obsahuje čtyři druhy mikroorganismů, *Aerobacter* dva druhy, třetí rod *Klebsiella* jsou pathogenní mikroorganismy, *Paracolobactrum* jsou nopathogenní mikroorganismy, které jsou přítomny v zažívacím traktu obratlovců a u posledního rodu *Alginobacter* jde převážně o půdní bakterie.

Protože *Escherichia coli* a *Aerobacter aerogenes* jsou typickými druhy svých rodů, používá se nyní názvu skupina Coli-aerogenes. V jednotné metodice mikrobiologických rozborů vody, používané v NSR, je tato definice [3]:

„Ke skupině coliformních bakterií patří všechny gramnegativní, nesporulující mikroorganismy, které mají schopnost při teplotě od 37 °C v rozmezí 24 až 48 hodin produkovat z laktózy a glukózy kyseliny a plyn. Mohou být fekálního původu. *E. coli* je gramnegativní, nesporulující mikroorganismus, který při 37 °C a 44 °C štěpí laktózu a glukózu v časovém rozmezí kratším nežli 48 hodin a produkuje kyseliny a plyny, v peptonové vodě vytváří indol, dává pozitivní nálezy na metylčerveň, není schopen štěpit citrát sodný jako jediný substrát na bázi uhlohydrátů a vytváří acetylmetylkarbinol. *E. coli* je fekálního původu.“

K těmto poznatkům v systematice lze ještě připomenout, že rozlišení jednotlivých druhů nevychází z genetického základu, rozlišení spočívá na odlišnosti morfologických znaků, fyziologických a biochemických funkcí, v barvicí technice a charakteristických reakcích sérologických testů, nikoli však na stanovení příbuzenských souvislostí. Proto jsou hranice mezi jednotlivými druhy značně labilní a často se mění, přitom je nutno zvláště se zmínit o použití sérologické diferenční metody podle Kaufmana a Whitta v letech 1954 až 1956. Shimwell ovšem dospěl z docela jiného důvodu ke značně skeptickému zjištění, že určování druhů u bakterií je extrémně obtížné.

Tabulka 1

Druh mikroorganismu	Indol-test			Metylčerveň-test			Acetoin-test			citr.-asim.		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
<i>E. coli</i>	+	(—)	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—
<i>E. freundii</i>	+	(—)	+	+	+	+	—	—	—	+	+	+
<i>E. aerescens</i>	+			+			—			—		
<i>E. intermedia</i>	+			+			—			+		
<i>A. aerogenes</i>	+			—	—	—	+	+	+	+	+	+
<i>A. cloacae</i>	—			—	—	—	+		+	+		+

Po těchto poznátcích při rozdělení skupiny *Escherichieae* je třeba ještě uvést vlastnosti mikroorganismů této skupiny, přitom u rodu *Escherichia* a *Aerobacter* podle *Bergeye* jde o pohyblivé či nepohyblivé krátké tyčinky. Rod *Aerobacter* vykazuje peritrichální obrvení a zkvašuje laktózu a glukózu za tvorby kyselin a plynu při 37 °C, *E. coli* rovněž, avšak také při teplotách 45 až 46 °C.

Rod *Escherichia* vytváří kysličník uhličitý a vodík ve stejném poměru, naproti tomu *Aerobacter* v poměru 2:1. Diferenciaci jednotlivých druhů rodu *Escherichia* a *Aerobacter* lze provést tzv. krátkou pestrá řadou (IMViC-testem). Je to souhrn nejcharakterističtějších testů, tj. indolového, na metylčerveň a Voges-Proskauerova a citrátového testu. Určit jednotlivé druhy umožňuje tabulka 1.

V odstavci 1 jsou uvedeny údaje podle *Bergeye*, v odstavci 2 německá zjištění podle [3] a v odstavci 3 údaje podle *Jörgensena*. Kromě těchto možností rozlišení je řada jiných, protože však nejsou jednoznačné a příliš složité, nebude o nich dále jednáno. Zatímco dříve byl výskyt coliformních mikroorganismů vázán výhradně na zažívací trakt člověka, je dnes prokázáno, že tyto bakterie se nalézají i v půdách, ve vodě a na rostlinách. Jen u druhu *Escherichia coli* je zjištěno, že je typickým mikroorganismem s výskytem v zažívacím traktu člověka. *Bergey* k tomu poznamenává:

„Nalézá se jako normální mikroorganismus v zažívacím traktu člověka a obratlovců. Je široce rozšířen v přírodě.“

U bakterií druhu *Escherichia* a *Aerobacter* platí všeobecně, že jsou neškodné, pokud jde o patologické účinky.

Dříve, než uvedeme zjišťovací a důkazové metody na colibakterie je nutno zdůraznit, že zjišťování colibakterií má mimořádný význam pro bakteriologický rozbor vody ze zdravotních hledisek jako ukazatel fekálního znečištění. Přestože typické pathogenní mikroorganismy střevního traktu, především *S. Typhi* a *S. paratyphi* nejsou běžně přítomny v lidské stolici, pozitivní zjištění coli naznačuje, že by také tyto mikroorganismy mohly být přítomny. Důkaz *E. coli* se zavedl jako kritérium fekálního znečištění, protože jeho zjištění je relativně snadné, zatímco přímý důkaz vyložených pathogennů z hlediska mikrobiologického zjištění by byl mnohem složitější.

Zjišťovací a důkazové metody

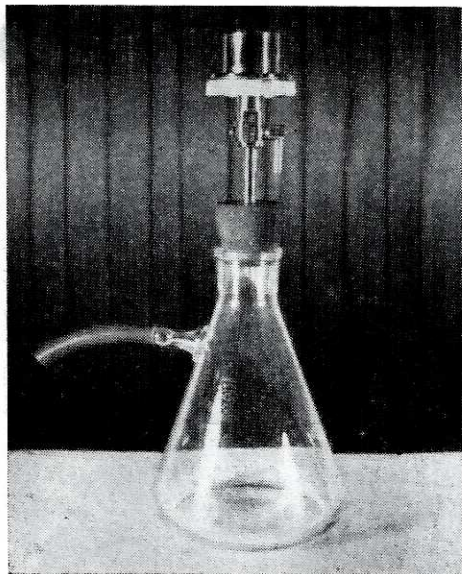
Při popisu vlastností coliformních mikroorganismů bylo jistě nápadné, že coliformní mikroorga-

nismy jsou si morfologicky i biochemicky velmi podobné a proto je otázka metody důkazu *E. coli* přece jen určitým problémem. Nejjednodušší jsou zkoušky Savageho a Eijkman-Bulřova, jimiž se dokazuje *E. coli* pouze kvalitativně (viz Praktikum tech. mikrobiologie Kocková-Kratochvílová, SNTL 1954, str. 165).

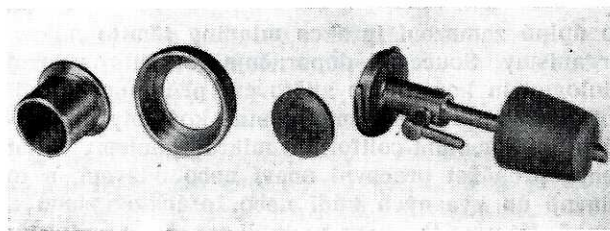
V poslední době se nejlépe uplatnila zkouška na coliformní bakterie kultivací vzorků na Endově agaru v Petriho miskách při 37 °C. Nevýhoda této zkoušky je v tom, že lze max. očkovat pouze 1 ml vzorku a to mnohdy nestačí k pozitivnímu důkazu. Proto se s úspěchem používá metody membránové filtrace, která dovoluje pracovat s větším množstvím vyšetřovaného vzorku, a to až 100 ml.

Vzorek se asepticky přefiltruje přes membránový filtr — FILTRA 50 — (obr. 1 a 2), velikostí pórů 0,3 až 0,5 mikrónů, a tím se zachytí na filtrační podložce sebedenší množství přítomných mikroorganismů. Filtrační podložka se asepticky vloží na živnou půdu — Endoagar — v Petriho misce (bez vzniku vzduchového polštáře a v obrácené poloze se inkubuje při teplotě 37 °C po dobu 20 až 22 hodin). V případě pozitivního nálezu coliformních mikroorganismů narostou červené kolonie, dávající v půdě pozitivní fuchsinový test, tj. jsou viditelné i ze dnaisky. Po odečtení počtu kolonií na mikroaditoru a provedení důkazu krátkou pestrout řadou, mohou se membránové filtry vysušit při teplotě 45 °C po dobu 17 hodin s příslušným popisem zatavit do polyetylenových sáčků a takto uskladněné sáčky mohou sloužit k trvalé dokumentaci (obr. 3).

Krátkou pestrout řadou se zkoušejí standardní podmínky vzniku indolu z peptonové vody, tvorba kyseliny zkouškou na metylčerveň, vzniku acetylmethylkarbinolu a citlivost na asimilaci citrátu. Při porovnávání výsledků na podkladě zjištění krátkou pestrout řadou je již možno dedukovat, zda jde o *E. coli* nebo jiný mikroorganismus. Výslovně podotýkáme, že alespoň bez těchto diferenčních zjištění nemůže být uznán pozitivní nález *E. coli*.



Obr. 1. Složená souprava pro membránovou filtrace



Obr. 2. Detaily přístroje Filtra 50

zleva:

nádobka pro vzorek, objímka s bajonetovým uzávěrem, porézní kovová vložka, tělo přístroje

Problematika *E. coli* z pivovarského hlediska

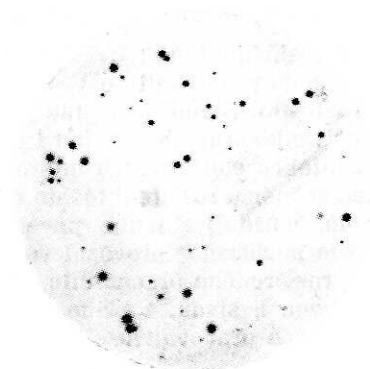
Po tomto kritickém rozboru dosud známých vědomostí o mikroorganismech, poukážeme na problém *E. coli* z hlediska pivovarského. Jørgensen uvádí [6] podrobný popis, systematiku a zjišťovací metody colibaktérií.

Tyto jsou zde uvedeny jako součást každé bakteriální flóry, kterou nazýváme termobaktérie. Jak již bylo uvedeno, jejich růstové podmínky v pivě jsou silně omezeny relativně nízkým pH v rozmezí 4,7 až 5,1 a později se úplně potlačují.

V roce 1939 zjistil Olsen při biologických zkouškách piv z evropských pivovarů ve 23 % všech zkoušek přítomnost coliformních mikroorganismů. Při dalších zkouškách stanovil jejich rychlý růst v mladíně jen při 10 °C a znatelné ovlivnění chuťových vlastností piva při infekci až v počtu 10 zárodků na 1 ml.

V pitné vodě se připouští 100 zárodků na 1 ml. Helm uveřejnil [4] velmi obsáhlou práci o problému coliformních mikroorganismů, kde při 615 vyšetřovaných a provedených zkouškách piv z evropských pivovarů našel u 38 % tvorbu plynu a kyseliny při kultivaci za teploty 37 °C a použití laktózbujónu jako kultivační půdy. Tyto zkoušky byly dále ověřovány IMViC-testem a v 95 případech zjištěno, že jde o druh *E. coli*. Všechny identifikované kmeny vytvářejí v mladíně těžko definovatelnou a měnící se celerovou příchut, která z části připomínala buď houbovou, nebo kouřovou příchut. Současně byla zjištěna souvislost mezi fenolovou příchutí a předcházejícím zjištěním gramnegativního kmene coliformních mikroorganismů.

Ze zjištění *E. coli* v mladém pivu Helm vyvozuje, že jediným prostředkem k odstranění této závady



Obr. 3. Exponovaný membránový filtr

je úplné zamezení infekce mladiny těmito mikroorganismy. Současně doporučuje rozšířit provozní biologickou kontrolu o zjišťování přítomnosti coliformních mikroorganismů, včetně kontroly pracujících, kteří mohou coliformní mikroorganismy velmi lehce přenášet pracovní obuví nebo oděvem, a to hlavně do kvasných kádí nebo ležáckých sudů a tanků. K tomu je nutno podotknout, že k podobnému názoru došel i Olsen a Poulsen [5].

Z hlediska výskytu pathogenních mikroorganismů v pívě je velmi zajímavé zjištění několika autorů (Zikes, Lentz, Sachs-Mücke [6, 7, 8]), kteří konstatují, že

„ve stočeném ležáckém pívě hynou bakterie cholery při 37 °C po 10 minutách, při 25 °C a 10 °C po 5 minutách. Bakterie tyfu hynou při 37 °C po 15 minutách, při 25 °C a po 10 °C po 5 minutách. Z těchto závěrů lze konstatovat, že normální zralé pivo je proti infikování mikroorganismy cholery a tyfu chráněno svojí teplotou a současně i bohatým obsahem kyslíčnicku uhličitého a přiměřeným množstvím alkoholu.“

Přesto však se v pívě zjišťují coliformní mikroorganismy, jak to popisuje Hompesch [9] v uveřejněné práci, kde uvádí tyto nálezy jako nutné.

Kromě zjištění, která kladou důraz hlavně na lékařsko-hygienické aspekty, vyšlo několik pojednání, zaměřených na technologii piva. R. 1957 Shimwell [11] ve své klasifikaci pivovarských mikroorganismů zahrnuje mezi ně i coliformní mikroorganismy. V r. 1962 nalezl Shenemann a Hollenbeck [12] při mikrobiologických rozborech sladu, že bakterie skupiny *Aerogenes* jsou v počtu více než 20 % z celkové mikroflóry obsaženy na sladu. Přitom zjistili 6 druhů rodu *Escherichia*, *Paracolonobacter* a *Aerobacter*.

Meilgaard [13] uveřejnil stejné poznatky, že právě vzhledem ke trendu výroby světlých, málo chmelených lehkých piv musí být sledována každá infekce, zvláště pak termobakterie skupiny *Coli-Aerogenes*, které se dosud považovaly za neškodné. Toto zjištění potvrzují i Weinfortner, Eschenbacher a Thoss [14] zjištěním, že gramnegativní bakterie, které škodí mladíně jsou z největší části ze skupiny *Coli-Aerogenes* a jsou nebezpečné tím, že mohou v případě silné infekce mladinu značně ochudit o růstové látky.

Možnosti infekce v pivovarech a ochranné prostředky k zamezení infekce

S přihlédnutím k uvedeným pracím, které byly uveřejněny a týkaly se výskytu colibakterií možno uvést toto: Stejně jako jiné potravinářské podniky, např. mlékárny, mohou být i pivovary místem zdroje infekce coliformních mikroorganismů. Vzhledem ke značnému rozšíření těchto mikroorganismů v přírodě, může být jejich původ různorodý. Infekce může pocházet z provozní vody, prachu všeho druhu, rozvířeného prachu ulic, silnic, prachu z čištění ječmene a sladu, z přinesené nečistoty nebo znečištěných pracovních oděvů a obuvi pracujících.

Infekce z těchto zdrojů může nastat v různých

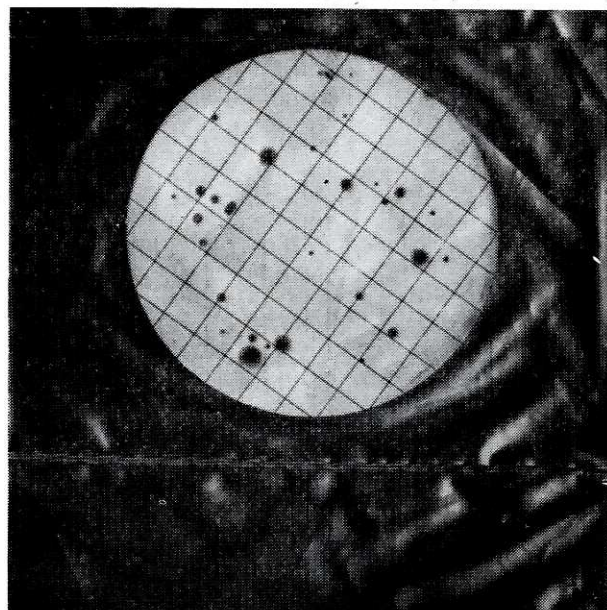
stádiích výroby, např. na chladicích aparátech, v kvasných kádích, ležáckých sudech nebo tancích a lahvích, přitom největší možnost infekce je v mladíně a kvasnicích.

U piv s nižší stupňovitostí jsou velmi nebezpečnou skupinou škodlivé mikroorganismy. Bohužel musí se s jejich výskytem, zejména u nízkostupňových piv počítat, a to proto, že tato piva jsou nedostatečně prokvašena a velmi krátkou dobu leží, takže coliformní mikroorganismy mají dobré podmínky k vegetaci. Coliformní zárodky mají při technologickém postupu, urychlovaném vyššími teplotami hlavního kvašení, větší možnosti vegetace než při konvenčním hlavnímu kvašení.

K zamezení infekce coliformními mikroorganismy je v první řadě nutno udržovat v naprosté čistotě veškeré strojní a technologické zařízení, přicházejí ve styk s mladinou i pivem. Pravidelně a pečlivě se musí dezinfikovat, ošetřovat nasadové kvasnice, dodržovat technologický postup a podle možnosti mladinu rychle spílat a okamžitě zkvasit, aby kvasnice co nejrychleji zahájily asimilační proces hlavního kvašení.

Dobré prokvašení včasným a uspokojivým poklesem pH snižuje nebezpečí vegetace coliformních mikroorganismů na minimum. Zvláště se musí zabránit vnikání prachu všeho druhu, z ulic, silnic, nádvorí, ze střech, ječného i sladového prachu do prostoru chladicích stoků a sprchových chladiců. Pracovníci, kteří pracují ve výrobních odděleních spilek, ležáckých sklepů a ve stáčírnách lahvového i sudového piva, musí dbát na zvýšenou osobní hygienu i čistotu svého pracovního oděvu a obuvi. S dobrým výsledkem se uplatnilo umístění biologických rohoží s vložkou s polyuretanu před vchodem do spilek s ležáckých sklepů, nesmí se však zapomínat pravidelně a včas vyměňovat jejich dezinfekční náplň.

V pivovarech, které mají vlastní vodní zdroj k technologickým účelům (mimo varnu), který by



Obr. 4. Vysušený zatavený membránový filtr v PE sáčku

popř. mohl být zdrojem infekce, musí se pravidelně v určitých obdobích pečlivě dezinfikovat a zejména dbát na to, aby se okolí vodního zdroje, jakož i ostatní zařízení neustále udržovalo vzorně čisté.

Dostatečně dlouhá doba ležení piva (dozrávání v ležáckých sudech) rovněž omezuje výskyt coliformních mikroorganismů v pívě. Přesto se doporučuje zavést do biologické kontroly provozu testování na vhodné živné půdě při 37 °C, nejlépe membránovou filtrací, a to buď namátkově nebo pravidelně, což závisí na velikosti provozu, na strojně technologickém zařízení a možnostech laboratoře.

Význam pozitivního nálezu coliformních mikroorganismů v pívě

Pozitivní nálezu *E. coli* v pívě by měl sloužit jako ukazatel posuzování hygieny nápoje. Podle našeho názoru je však z hlediska kvalitativního i kvantitativního dosti velkým problémem, hlavně pokud jde o identifikaci, která vyžaduje pečlivého vyšetření a zvážení všech okolností.

Podle dnešního stavu znalostí coliformních mikroorganismů je bezpodmínečně nutné při každém stanovení pečlivě diferencovat *E. coli* od dalších coliformních mikroorganismů, již proto, že vegetační možnosti těchto mikroorganismů v mladíně nebo v mladém pívě jsou jiné než ve vodě. Ve vodě se zvláště pečlivě zjišťují z hygienických a zdravotních důvodů jako indikátory fekálního znečištění s možností dlouhé doby vegetace, a to u piva není.

Při příležitostném výskytu coliformních mikroorganismů, nad max. přípustné množství podle ČSN 56 6635 — *Pivo*, musí se pátrat po původu této infekce, které lze předejít pečlivým dodržováním technologického postupu, zejména vzorným udržováním čistoty strojně technologického zařízení, správně prováděnou dezinfekcí, osobní hygienou pracovníků, důsledným sledováním vodního

hospodářství a zejména zvýšením technické úrovně strojního i výrobního zařízení.

Závěr

Z uvedených statí o *E. coli* a ostatních coliformních mikroorganismech vyplývá, že z pozitivního nálezu těchto mikroorganismů v pívě by se neměly vyvozovat takové důsledky, jako z jejich nálezů v pitné vodě, kde jsou možnosti přímého fekálního znečištění. Přesto, že se skupiny *Coli-Aerogenes* mohou v pívě vyskytnout za určitých okolností, tj. při nízké stupňovitosti, vyšším pH a krátké době ležení, musí se posuzovat v mladíně jako nežádoucí mikroorganismy z hlediska chuťového a v hotovém výrobku nelze tento problém uzavřít tím, že pivo je z hlediska biologického nevyhovující vzhledem k tomu, že nepasterované pivo v každém případě obsahuje různou mikroflóru.

V případě, že pivo trvanlivostí vyhoví požadavkům ČSN 56 6635 — *Pivo*, mělo by se také tak posuzovat i z hlediska biologického.

Literatura

- [1] GDCH — Fachgruppe Wasserchemie „Deutsche Einheitsverfahren zur Wasseruntersuchung“ 3. Auflage.
- [2] Jørgensen, A.: Die Mikroorganismen der Gärungsindustrie. Jena, 6. Auflage 1940.
- [3] Olsen, E.: Svenska Bryggareföreningens Månadsblad. 54, 61, 1939 ref. „Schw. Br. Rundseh“, 7, 11, 1949.
- [4] Helm, E.: „Schw. Br. Rundseh“, 7, 11, 1949.
- [5] Olsen, E. - Poulsen, I.: Svensk Bryggeritidskrift 63, 204, 1948; ref. „Schw. Br. Rundseh“, 7, 11, 1949.
- [6] Zikes, H.: Mitl. d. Österreich. Versuchstation f. Br. u. Mälz. Wien 11, 20, 1903; ref. „Wochenschr. f. Br.“, 1932 : 110.
- [7] Lentz, O.: Klinisches Jahrbuch, 11, 1903 : 315.
- [8] Sachs-Mücke: Klinisches Jahrbuch, 18, 1908 : 351.
- [9] Hompesch, H.: „Brauwelt“, 87, 1947 : 225; „Brauwiss.“, 2, 1949 : 17.
- [10] Weinfurter, F. - Uhl, A.: „Brauwiss.“, 5, 1952 : 145.
- [11] Shimwell, J. L.: ref. „Monatschr. f. Br.“, 13, 1960 : 40.
- [12] Shenemann, J. M. - Hollenbeck, C. M.: ref. „Monatschr. f. Br.“, 15, 1962 : 104.
- [13] Meilgaard, M.: ref. „Brauwiss.“, 16, 1963 : 27.
- [14] Weinfurter, F. - Eschenbecher, F. - Thoss, G.: „Brauwelt“, 102, 1962 : 1485.

Lektoroval: Doc. Dr. M. Polster, CSc.

Došlo do redakce 17. 3. 1967.

ЧТО ПОКАЗЫВАЕТ ПРИСУТСТВИЕ МИКРО- ОРГАНИЗМОВ ГРУППЫ *ESCHERICHIA COLI* В ВИДЕ

Обнаружение присутствия микроорганизмов группы *Escherichia coli* нельзя оценивать по таким же критериям как их присутствие в питьевой воде. Их присутствие не может считаться доказательством загрязнения фекального характера и на его основании нельзя вывести заключение о присутствии дальнейших патогенных микроорганизмов. Их присутствие, однако доказывает неудовлетворительные гигиенично-санитарные условия.

ZUR ANWENSENHEIT DER COLI- FORMEN MIKROORGANISMEN ODER DER GRUPPE *ESCHERICHIA COLI* IM BIER

Der positive Beweis der *E. coli* im Bier muss anders als das Vorkommen von *E. coli* im Trinkwasser beurteilt werden, d. h. nicht als Indikator der fekalen Verunreinigung oder der Anwesenheit anderer pathogener Mikroorganismen, sondern als Anzeiger des Niveaus der Hygiene und Sanitation in der Produktion.



WHAT CONCLUSIONS CAN BE MADE FROM THE PRESENCE OF THE *ESCHERICHIA COLI* MICROORGA- NISMS IN BEER

The presence of the *Escherichia coli* microorganisms cannot be classified by applying the same criteria as to their presence in drinking water. It does not indicate any contamination of fecal character nor the presence of other pathogenes either. On the other side their presence indicates that hygienic and sanitary conditions at the plant in question are quite unsatisfactory.