

K otázce rozlišování koliformních bakterií*)

OLGA BENDOVÁ, VĚRA KURZOVÁ, Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, Praha

V tomto sdělení chceme čtenáře seznámit s některými pohledy na otázku diferenciací koliformních bakterií. Jak známo, je výskyt zástupců této skupiny v pivovarských provozech předmětem řady diskusí a snah vyřešit tuto, do značné míry pro pivovary nepřijemnou otázku. O výsledcích našeho šetření v rozsahu výskytu těchto mikroorganismů v jednotlivých fázích provozu a o některých vlastnostech těchto bakterií, zejména se zřetelem k jejich schopnosti vyvíjet se nebo přežívat v mladíně a v pivě jsme informovali již na stránkách časopisu Kvasný průmysl [1, 2].

Při sledování množství koliformních bakterií v různých vzorcích odebraných z provozu se zjištěné zárodky zároveň blíže identifikovaly. Z celkového množství proloní na Endoagaru se namátkově vybíraly některé kolonie, které jsme hodnotili podle jejich morfologického vzhledu [velikosti, tvaru, kovového lesku, konzistence, zbarvení]. Sledovali jsme, zda je závislost mezi těmito znaky a rodovou příslušností. Z našich poznatků vyplynulo, že nelze doporučit jakoukoli, byť přibližnou identifikaci koliformních bakterií pouze na základě morfologických znaků. Baktérie zastupující jednotlivé rody, popř. druhy, projevíly značnou morfologickou nejednotnost a dokonce ani kovový lesk kolonií nebyl charakteristický pouze pro *E.coli* jak se často uvádí. V dalších zkouškách se potvrdilo, že při diagnostickém vyšetřování jednotlivých kolonií se nelze spoléhat na to, že jediná kolonie představuje populaci pomnoženou z jediné buňky. Může jít o směs bakterií a tudíž výsledky biochemických testů mohou být protichůdné a neodpovídají pak ukazatelům stanoveným pro jednotlivé rody nebo druhy. Tím si lze rovněž vysvětlit, proč morfologicky shodně vyhlížející kolonie nemusí být zástupci téhož druhu. Jde-li o směs zárodků, záleží i na kultivačních podmínkách, který druh nabude převahy. Proto je bezpodmínečně třeba pracovat při identifikačních testech s čistými kulturami, získanými několikerým střídáváním pasážováním přes bujón a masopeptonový agar a rozizolování kolonií. S takto získanými čistými kulturami lze poté provést biochemické testy. Chceme však upozornit, že krátká peštrá řada (MČT, VP-reakce, citrátový a indolový test) je pro přesnou identifikaci nedostačující, a že je třeba ji rozšířit o některé další testy. Tato krátká řada je založena na známé skutečnosti, že *E.coli* tvoří proti *Aerobacter aerogenes* více kyselin, a to kyselinu octovou a mravenčí, a tudíž se více snižuje pH kultivačního prostředí, zatímco *Aerobacter aerogenes* produkuje z glukózy, přítomné v živném médiu, acetoin. Tento metabolický děj působí pak jako neutralizační mechanismus v té fázi růstu, kdy se prostředí okysluje a je podkladem dvou diagnostických zkoušek, a to metylčerveňového testu (MČT) a Voges-Proskauerovy reakce. VP-reakce je zkouška na tvorbu acetylmethylkarbinolu. Mikroorganismy s pozitivní reakcí (*Aerobacter*) tvoří jako jeden způsob přeměny kyseliny pyrohroznové acetylmethylkarbinol (aceto n), který se na vzduchu oxiduje na diacetyl. Pozitivní VP-reakce je barevná reakce mezi diacylem a deriváty guaninu, přítomnými v peptonu. *E.coli* nedovede tvořit acetoin, a proto dává negativní VP-reakci. U metylčerveňového testu jde o barevnou změnu indikátoru pH, přidaného

k živné půdě, obohacené při kultivaci vytvořenými kyselinami (u *E.coli* pozitivní, u *Aerobacter* negativní MČT). Citrátová zkouška je založena na rozdílné schopnosti asimilovat citrát jako jediný zdroj uhlíku (pozitivní u *Aerobacter*, negativní u *E.coli*). Testem na tvorbu indolu se dokazuje jeho přítomnost v kulturách *E.coli*, kdy indol vzniká za účasti enzymového systému z tryptofanu, přítomného v kultivačním prostředí.

Jak již bylo uvedeno, je však třeba kromě těchto základních zkoušek řady dalších testů, jmenovitě jde o zkvašování glukózy, laktózy a manitolu, o asimilaci KCN, o enzymovou činnost při štěpení močoviny, aminokyselin fenylalaninu, lyzinu, ornitinu a argininu a v neposlední řadě i o důkaz tvorby sirovodíku z cysteinu. Kromě Gramovy reakce je třeba sledovat i pohyblivost vyšetřované kultury. Touto rozšířenou řadou testů jsme vyhodnotili 70 izolovaných kolonií a zjistili jsme, že se ve vzorcích odebraných v různých fázích pivovarského provozu nejčastěji vyskytují příslušníci rodu *Enterobacter* (dřívější označení *Aerobacter*), a to asi v 50 % zastoupení a dále pak *E.coli* ve 30 % celkového počtu. Ostatní zjištěné počty patřily rodům *Serratia*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Providentia* aj. zástupcům čeledi *Enterobacteriaceae*.

Ani v jediném případě nebyl identifikován vysloveně patogenní mikroorganismus, např. *Salmonella* nebo *Shigella*. Přesto však je třeba mít na zřeteli, že podmíněná patogenita zjištěných mikroorganismů je v neposlední řadě dána jejich počtem a sérotypem. Jak již bylo uvedeno, šlo při těchto zkouškách o namátkový výběr izolovaných kolonií, u nichž se provedla diagnostická diferenciací řadou zmíněných biochemických testů. Chceme-li však v pivě stanovit procentuální podíl zárodků *E.coli*, tj. typických zástupců mikroflóry fekálního původu, je třeba identifikovat všechny jednotlivé kolonie, které se vyvinuly na živné půdě (na Endo-agaru). Lze si snadno představit, že zde jde o náročnou práci při nezbytně nutném počtu testů.

Setkáváme se se snahou mít k dispozici metodu, kterou by bylo možno tuto identifikaci rychle provádět. Na tomto místě je třeba především uvést zkoušku podle Ejkmanna, který zjistil, že koliformní bakterie pocházející z fekálií teplokrevných živočichů rostou a tvoří plyn v glukózovém médiu při 46 °C, zatímco koliformní zárodky ze studenokrevných živočichů tuto vlastnost nemají. Od té doby byla popsána řada modifikací tohoto původního testu, týkajících se používaného média i kultivační teploty. Mimoto se nyní doporučuje používat MGT-testu (Mackenzie-Gilbert-Taylorův test), založeného na kultivaci vzorku ve speciální živné půdě se žlučovými solemi a brilliantovou zelení při 44 °C za současného sledování tvorby plynu v této půdě a tvorby indolu v peptonové vodě.

Abychom ověřili tyto údaje a zjistili způsob, jakým by se tato rychlá identifikace mohla při potřebě provádět, porovnávali jsme růst a tvorbu plynu u kultur různých kmenů koliformních bakterií v peptonové vodě s glukózou, laktózou a v půdě podle Mackenzieho. Zjistili jsme, že při 44 °C tvoří plyn nejen *E. coli*, nýbrž i *Enterobacter* a *Citrobacter*, a to kmeny jak sbírkové, tak i izolované z piva, popř. z fekálií (*E. coli*). Tento způsob nevede ke spolehlivým výsledkům identifikace, aniž by se provedl test na tvorbu indolu. Rovněž je třeba

*) Uveřejněno ve zkrácené formě v bulletinu Výzkumného ústavu pivovarského a sladařského — v tisku —.

považovat pouze za orientační výsledky, získané souběžnou kultivací vzorků na Simonsově citrátovém agaru a na Endově půdě.

Při této zkoušce vycházíme ze známé zkušenosti, že ze zástupců čeledi *Enterobacteriaceae* je to prakticky pouze *E. coli*, která na této půdě neroste, protože neasimiluje citrát jako jediný zdroj uhlíku. Pochopitelně zde vylučujeme možnost výskytu *Shigelly* jako dalšího citrátnegativního zástupce této čeledi. Z rozdílu mezi počtem kolonií vyrostlých na Endo-agaru a na Simonsově citrátovém agaru lze zhruba orientačně zjistit počet těchto citrátnegativních zárodků. I zde by však bylo třeba počítat pouze s přibližnými výsledky, protože by mohly být zkresleny přítomností některých citrátpozitivních forem, které podle některých názorů mohou za určitých podmínek vznikat z citrátnegativních forem a zastupovat kontaminanty, které vyšetřovaný vzorek infikovaly před delší dobou. Uvádí se totiž, že z něny antigenní struktury a kvasných vlastností mohou nastat i u *E. coli* izolované z fekálií pacientů kteří prodělali dysenterii nebo tyfus a dále pak i vlivem subbaktericidních dávek sulfonamidů a antibiotik a konečně i chlorované vody, kdy vzrůstá procentový podíl citrát-pozitivních forem.

Závěrem k této pracovní etapě lze zcela oprávněně vyslovit názor, že při výskytu koliformních bakterií v pivovarské výrobě není podstatné, zda pivo obsahuje nebo neobsahuje *E. coli* a v jakém procentovém zastoupení, protože přítomnost i ostatních zástupců této skupiny je nežádoucí. Přitom nejde jen výhradně o epidemiologické hledisko, neboť patogenní mohou být nejen některé serotypy *E. coli*, nýbrž i *Enterobactera* a *Citrobactera*, jejichž uplatnění by pak záviselo na velikosti infekční dávky a na vnímavosti lidského organismu. Jde tu však především o to, že masový výskyt infekcí koliformních zárodků celkově indikuje nedostatečný stav sanitacních prací ve výrobě.

Tabulka 1

Růst a tvorba plynu u koliformních bakterií při 44 °C

Kmen	Glu-kóza	Laktóza	Půda podle Mackenzieho
<i>E. coli</i> — fekálního původu	× ×	× × × × ×	× × × × +
<i>E. coli</i> — izolát z piva	× ×	× × × × ×	× × × × ×
<i>E. coli</i> — izolát z piva	× ×	× × × × ×	× × × × ×
<i>E. coli</i> — sbírkový	× ×	× × × × ×	× × × × ×
<i>Enterobacter</i> — izolát z piva	× ×	× × × × ×	× × + + +
<i>Enterobacter</i> — izolát z piva	× ×	× × × × ×	× × + + +
<i>Enterobacter</i> — sbírkový	× ×	× × × × ×	× × × × +
<i>Citrobacter</i> — izolát z piva	× +	+ + + + +	+ + + + +
<i>Citrobacter</i> — sbírkový	× ×	× × × × ×	× × × × +

+ = růst, × = růst s tvorbou plynu

Literatura

- [1] BENOVA, O. - KURZOVÁ, V.: Problematika koliformních mikro-organismů, = „Kvasný průmysl“, 13, 1937, s. 253
- [2] BENOVA, O. - KURZOVÁ, V.: Pomnožovací schopnost koliformních bakterií v mladině a v pivě. = „Kvasný průmysl“, 14, 1938, s. 202
- [3] MACKENZIE, E. F. W. - TAYLOR, E. W. - GILBERT, W. E.: Recent Experiences in the Rapid identification of Bacterium Coli Type I. = „J. gen. Microbiol.“, 2, 1948, s. 197
- [4] ZMORAY, I. - KRATOCHVIL, I.: Koliformní bakterie v povrchové vodě. = „Čs. hygiena“, 1, 1956, s. 38

Došlo do redakce 10. 10. 1968

К ВОПРОСУ РАЗЛИЧЕНИЯ БАКТЕРИЙ ГРУППЫ КИШЕЧНОЙ ПАЛОЧКИ

Если пиво заражено бактериями группы кишечной палочки, то присутствие или отсутствие *E. coli*, ни его концентрацию нельзя считать единственным критерием оценки качества продукта, так как нежелательным является также присутствие других видов, входящих в эту группу. Оценку не следует производить исключительно с эпидемиологической точки зрения, так как патогенными могут быть не только определенные серотипы *E. coli* но и *Enterobactera* и *Citrobactera*. Их фактическое влияние зависит как от их числа в пищеварительных органах, так и от чувствительности индивидуальных лиц. Массовые заболевания, вызываемые бактериями группы кишечной палочки, доказывают, что завод не уделяет должного внимания санитарно-гигиеническим условиям производства.

DISCRIMINATION OF COLIFORM BACTERIA

If the beer is infested with coliform bacteria, the presence of absence of *E. coli* and its concentration cannot be taken as an only criterion for evaluating the microbiological condition of the product, since other representatives of the coliform group can be harmful, too. The problem should not be reduced to epidemiologic point of view, as *Enterobactera* and *Citrobactera* must be considered pathogenic no less than certain serotypes of *E. coli*. Their influence depends on the concentration in alimentary organs and susceptibility of individuals. Generally any large-scale infestation with coliform bacteria is a symptom of very poor sanitary conditions at breweries in question.

ZUR FRAGE DER UNTERSCHIEDUNG DER COLIFORMEN BAKTERIEN

Bei dem Vorkommen der coliformen Bakterien im Prozess der Bierherstellung ist nicht die Frage wesentlich, ob das Bier *E. coli* enthält oder nicht enthält und in welchem Prozentsatz, denn auch die Anwesenheit anderer Bakterien dieser Gruppe ist unerwünscht. Dabei handelt es sich nicht ausschliesslich um den epidemiologischen Gesichtspunkt, weil nicht nur einige Serotype *E. coli*, sondern auch *Enterobactera* und *Citrobactera* pathogen sein können; ihre Durchsetzung würde dann von der Grösse der Infektionsdosis und der Empfänglichkeit des menschlichen Organismus abhängen. Das Hauptproblem liegt darin, dass ein massenweises Vorkommen von Infektionen coliformer Bakterien den ungenügenden Gesamtstand der Sanitationsarbeiten in der Produktion indiziert.