

Taxonomická příslušnost pivu škodlivých laktobacilů a pediokoků

Prof. Dr. OLGA BENDOŤÁ, VĚRA KURZOVÁ prom. biol., Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, Praha

Mezi pivu škodlivé grampozitivní bakterie patří především zástupci rodu *Pediococcus* z čeledi *Streptococcaceae* a rodu *Lactobacillus* z čeledi *Lactobacillaceae*. Jejich taxonomické zařazení zaznamenalo během řady let mnoho změn. V tomto sdělení je uveden pouze jejich stručný přehled, potřebný v pivovarské mikrobiologii pro základní informaci o dané problematice.

Na účast pediokoků z hlediska nepříznivého vlivu na jakost piva poprvé upozornil v r. 1876 *Pasteur* ve své známé studii o pivě „*Etudes sur la bière...*“. Při tehdejšímu stavu vědeckého poznání nebyly tyto bakterie ještě označovány rodovým názvem a taxonomicky zařazeny. Krátce však na to se jimi zabýval v letech 1878–1879 *Hansen*, který je nazval z dnešního hlediska zcela nevhodně „sarcinou“. Toto označení pivu škodlivých koků, tvořících charakteristické tetrády, přetrvávalo pak v pivovarské praxi po dlouhou řadu let, přestože v r. 1884 *Balcke* [1] podrobně popsal jejich vlastnosti, odlišil od rodu *Sarcina* a označil jako *Pediococcus cerevisiae*. V následujících letech potvrdil toto stanovisko *Lindner* [2], který současně uvedl, že *Pediococcus cerevisiae* není jediným zástupcem tetrádotvorných koků a který popsal další druhy tohoto rodu. Byl to až do dnešní doby taxonomicky uznávaný *Pediococcus acidi lactici* a dále *Pe-*

diococcus viscosus, jímž byly označeny pediokoky, které silně zvyšovaly viskozitu piva. Od doby těchto počátečních studií uplynulo téměř 100 let, v jejichž průběhu se problematice pediokoků vzhledem k jejich závažnému významu věnoval velký počet autorů. Jejich výčet však třeba v tomto přehledu omezit pouze na ty, jejichž sdělení obsahovala některé zásadní změny v pojetí uvedené problematiky.

Na prvním místě je třeba uvést *Claussena* [3], který již počátkem tohoto století izoloval a na základě rozdílů v tvorbě sedimentu a zákalu piva rozlišil dva druhy známé jako *Pediococcus damnosus* a *Pediococcus pernicius*. Existenci obou druhů lišících se pouze na základě těchto vlastností popřel však *Schönfeld* [4], který vyslovil názor, že uvedené rozdíly závisejí na složení piva a adaptačních schopnostech sledovaných mikroorganismů.

V r. 1934 rozšířil *Mees* [5] počet uváděných druhů rodu *Pediococcus* o další (*P. pentosaceus*, *P. halophilus*, *P. urinae equi*) a současně popsal pivu škodlivé variety *P. damnosus*.

Studiem pediokoků se od r. 1939 intenzivně zabýval *Shimwell* a *Kirkpatrick* [6, 7], kteří je izolovali z anglických svrchně kvašených piv. Schopnost tvořit tetrády a

inaktivní kyselinu mléčnou považovali ve srovnání s jejich fyziologickými vlastnostmi za druhořadou a nestálou, a proto je zařadili do rodu *Streptococcus*. Toto taxonomické zařazení pivu škodlivých koků se uznávalo zhruba po celé další desetiletí. Připojili se k němu také *Andrews* a *Gilliland* [8], kteří popsali výskyt *Streptococcus damnosus* var. *diastaticus* se schopností užívat dextriny.

V r. 1949 zahájil *Pederson* se svými spolupracovníky [9, 10] podrobný průzkum velkého počtu kmenů, které izoloval z různých zdrojů rostlinného původu a porovnal s kmeny *Pediococcus damnosus*, *Pediococcus pentosaceus*, *Pediococcus halophilus* a *Pediococcus urinae equi* udržovanými ve sbírce Vysoké školy technické v holandském Delftu. Protože velký počet izolovaných kmenů vykazoval značnou podobnost s uvedenými sbírkovými kmeny s výjimkou kmene *P. urinae equi*, navrhl *Pederson* pro všechny tyto izolované kmeny společný název *Pediococcus cerevisiae*. Kmeny zvyšující viskozitu piva označil *Pediococcus viscosus* a kmeny s teplotním optimem 40 °C jako *Pediococcus acidilactici* nebo *Pediococcus hennebergii*. K názvu *Pediococcus* se vrátili také *Bhandari* a jeho spoluautoři [11], kteří ve své práci revidovali v anglické pivovarské literatuře široce používané zařazení těchto koků mezi streptokoky.

Rozsáhlou taxonomickou studií rodu *Pediococcus* uveřejnili v r. 1959 japonští autoři *Nakagawa* a *Kitahara* [12], kteří srovnávali kultury izolované z rmutů, sladiny, kvasnic a piva s kmeny jiných autorů. Neuznali *Pedersonův* popis typového druhu *Pediococcus cerevisiae* *Balcke* a vyhradili tento název pouze pro kmeny izolované z piva. Pro kmeny odpovídající *Pedersonovu* popisu přiznali název *Pediococcus pentosaceus*. Příslušníky zkoumaného rodu rozdělili do 5 druhů: *P. cerevisiae*, *P. acidilactici*, *P. pentosaceus*, *P. halophilus* a *P. urinae equi*. U *Pediococcus cerevisiae* popsali dále 3 variety (*P. cerevisiae* var. *salicinaceus*, *P. cerevisiae* var. *diastaticus* a *P. cerevisiae* var. *mevalovorius*). Třetí uvedená varieta vyžadovala jako esenciální růstový faktor kyselinu mevalonovou. Podle názoru japonských autorů reprezentovaly *P. cerevisiae* a jeho 3 variety vlastní pivu škodlivé pediokoky, které se vyskytují pouze v pivu a v kvasnicích a rostou v médiu s pH nižším než 6,5, při teplotě nižší než 35 °C, nezkašují pentosy, jsou anaerobní a vysoce tolerantní k chmelovým látkám.

Další nejasnosti do taxonomického zařazování pediokoků vnesly v r. 1964 anglické autorky *Coster* a *White* [13], které v návaznosti na práce autorek *Günther* a *White* [14, 15] diferencovaly na základě řady kultivačních, fyziologických a sérologických testů rod *Pediococcus* na 4 druhy, a to *P. cerevisiae*, *P. parvulus*, *P. damnosus* a *P. halophilus*. Druhy *P. acidilactici* a *P. pentosaceus* uvedly jako synonyma druhu *P. cerevisiae*.

Určitým kompromisem je návrh autorky *Carvie* [16] pro rozhodčí komisi systematické bakteriologie [Judicial Commission on Systematic Bacteriology: Opinion 52, 1976] nerozlišovat existenci dvou druhů *P. cerevisiae* a *P. damnosus*, ale první druh považovat za synonymum druhého druhu a dále uznávat jako samostatné druhy *P. acidilactici*, *P. pentosaceus*, *P. parvulus* a *P. halophilus*.

Tento názor byl potvrzen genotypickou studií *Backa* a *Stackebrandta* [17], jakož i dalším velmi podrobným výzkumem taxonomické příslušnosti pediokoků na základě fenotypických znaků, jehož výsledky uveřejnil v r. 1978 *Back* [18]. Ukázalo se však, že vedle uznávaných druhů *P. damnosus* (= *P. cerevisiae*), *P. pentosaceus*, *P. acidilactici*, *P. parvulus* a *P. halophilus* lze oprávněně přiznat samostatnost dvěma dalším druhům *P. inopinatus* a *P. dextrinicus*. Dále byla posouzena taxonomická příslušnost většiny počtu kmenů izolovaných

převážně z rostlinného materiálu, které nezkašovaly arabinosu a xylosu a byly proto zařazeny k druhu *P. damnosus*. Tyto kmeny však vykazovaly v genotypu vysokou homologii s typickými kmeny *P. pentosaceus*, a proto byly popsány jako *P. pentosaceus* ssp. *intermedius*. Kromě známého pivu škodlivého druhu *P. damnosus*, který jednoznačně převažoval v kontaminovaných pivech, byl zjištěn zvýšený výskyt nově popsaného druhu *P. inopinatus*. *P. damnosus* byl izolován pouze z pív, kvasnic a vína, zatímco nebyl zjištěn v pivovarských surovinách a rostlinných materiálech, z čehož se soudí, že tento druh je značně přizpůsoben podmínkám při kvasných procesech.

Pro identifikaci jednotlivých druhů použil *Back* klasické charakteristické znaky a doporučil především posuzovat zkašování ribosy, arabinosy, xylosy, laktosy, štěpení škrobu a argininu, tvorbu kyseliny a plynu z natriumglukonátu, růst při 35 °C a 50 °C, při pH 8,0 a v přítomnosti 15 % NaCl. Doplnění charakteristiky kmenů provedl podle elektroforetické pohyblivosti dehydrogenas laktátu a podle hodnot DNS/DNS homologie. Ve své publikaci uvádí autor klíč k určování pediokoků pro praktickou aplikaci.

Taxonomická charakteristika rodu *Pediococcus* podle *Backa* v současné době tedy překonává charakteristiku tohoto rodu podle *Kitahary*, která byla pojata do 8. vydání známého *Bergeys' Manual of Determinative Bacteriology* [19].

Podrobný přehled vývoje názorů na zařazování a charakteristiku rodu *Pediococcus* uvádí *Eschenbecher* a *Back* v r. 1976 [20].

Podobně jako tomu bylo u pediokoků, popsal poprvé *Pasteur* [1876] výskyt tyčinkových bakterií v kvasnicích a ve zkaženém pivě ve své známé studii o pivě. Několik let později uveřejnil výsledky svého pozorování *van Laer* (r. 1892), který tyto mikroorganismy nazval na *Pasteurovu* počest *Saccharobacillus pastorianus* a označil je za nejzávažnější pivu škodlivé bakterie, jejichž pomnožení je provázáno zvýšením kyselosti a zákalom produktem.

V r. 1901 se začal popisem vlastností těchto bakterií zabývat *Henneberg* [21], který v r. 1903 uvedl jejich rozdělení ve dva samostatné druhy, *Saccharobacillus pastorianus* *van Laer* a *Bacillus Lindneri* *Henneberg*. U prvního druhu rozlišoval dvě variety, *Saccharobacillus pastorianus* var. *berolinensis* (izolovanou z berlínského „Weissbier“) a *Saccharobacillus pastorianus* var. *berolinensis jasciformia*.

Téměř po 20 letech se problematice laktobacilů opět věnoval *van Steenberg* [22], který začal používat název *Lactobacterium*. Jako pivu škodlivé popsal dva druhy, *Lactobacterium pasteurianum* a *Lactobacterium cerevisiae*.

V r. 1923 uvedl v návaznosti na *Hennebergovy* údaje *Bergey* [23] v prvním vydání svého známého klíče k určování bakterií 3 druhy laktobacilů poškozující jakost piva. Byly to *Lactobacillus pastorianus*, *Lactobacillus berolinensis* a *Bacillus lindneri*.

V následujících desetiletích se výzkumné práce v této oblasti zaměřovaly především na kritické posuzování oprávněnosti diferenciací laktobacilů kontaminujících pivo v uvedené tři druhy. Na základě prací známého pivovarského mikrobiologa *Shimwella* [24, 25, 26], který se této otázce věnoval od r. 1935 a se zřetelem k práci *Pedersona* [27] zařadil *Breed* [28] v r. 1948 do 6. vydání „*Bergey's Manual* ...“ pouze *L. pastorianus* jako samostatný druh, zatímco ostatní dříve uváděné druhy zejména *L. berolinensis* a *L. lindneri* považoval za jeho synonyma. Obdobné stanovisko zastávala i japonská autorka *Ito* [29], která navrhla pokládat všechny pivu škodlivé laktobacily za jediný druh *Lactobacillus cerevisiae*.

Pojetí *Lactobacillus pastorianus* jako jediného druhu reprezentujícího laktobacily kontaminující pivo se tedy udrželo poměrně dlouho, přestože i sám Shimwell [24] v r. 1949 upozorňoval na to, že nemusí být absolutně platné.

Počátkem 50. let bylo však překonáno tím, že jako pivovarské kontaminanty byly postupně izolovány i jiné druhy laktobacilů: *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus leichmanii*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus parvus* a *Lactobacillus malefermentans* [20, 31, 32].

Významným mezníkem ve vývoji názorů na taxonomické zařazování pivu škodlivých laktobacilů byla práce Rogosy a Sharpa [33], kteří zpochybnili existenci *Lactobacillus pastorianus* jako samostatného druhu a na základě systematického studia a srovnávacích testů uvedli jeho identitu s *Lactobacillus buchneri*. Svě tvrzení opírali o výsledky práce Carrière [32], který mezi 99 izolovanými kmeny pivovarských kontaminantů, příslušejících k rodu *Lactobacillus* nezjistil ani v jednom případě výskyt *Lactobacillus pastorianus*. Tato sdělení byla podnětem dalších prací, potvrzujících uvedený názor.

Pokračováním výzkumné práce orientované tímto směrem bylo rozsáhlé šetření, které provedl Eschenbecher [34]. Izoloval ze 128 vzorků piv a kvasnic z řady evropských pivovarů 660 kmenů rodu *Lactobacillus* a provedl jejich identifikaci. Z toho 348 kmenů určil jako streptobaktérie a 312 jako betabaktérie ve smyslu diferenciace podle Orla-Jensena [35]. Mezi homofermentativními streptobaktériemi zjistil 43 % příslušníků rodu *L. casei*, 9 % *L. coryniformis* a pouze zhruba 1 % *Lactobacillus plantarum* var. *arabinosus*. Mezi heterofermentativními betabaktériemi převažoval *Lactobacillus brevis* [4] vedle 7 % *Lactobacillus buchneri*. Autor popsal i některé variety druhů. Na základě této analýzy uvedl jako nejvýznamnější pivovarské kontaminanty *Lactobacillus casei* a *Lactobacillus brevis*. Všechny tyto pivo škodlivé laktobacily rostly při 15 °C a ani v jednom případě při 45 °C.

Současné taxonomické rozřídění druhů rodu *Lactobacillus* obsažené v 8. vydání „Bergey's Manual ...“ z roku 1974, vychází z výsledků práce Rogosy. Uvádí se zde samostatná existence 25 druhů, které jsou rozděleny podle typu zkvašování cukrů na homofermentativní a heterofermentativní. Homofermentativní druhy se člení především do dvou hlavních skupin, především podle schopností růstu při 15 °C a při 45 °C kromě dalších významných znaků. Obdobná kritéria jsou použita i pro rozlišování heterofermentativních druhů. Vzhledem k tomu, že výčet znaků pro přesnou identifikaci druhů je velmi početný, je pro praktickou aplikaci s přihlédnutím k cílům práce často vhodné používat zkrácených postupů určování.

Z uvedeného je zřejmé, že i v budoucnu lze očekávat další změny v taxonomickém zařazování pediokoků a laktobacilů, založené na rozšíření a prohloubení poznatků výzkumu této problematiky.

Literatura

- [1] BALCKE, J.: Wschr. Braerei 1, 1884, s. 257
- [2] LINDNER, P.: Wschr. Braerei 3, 1886, s. 789
- [3] CLAUSSEN, N. H.: Comt. rend. Lab. Carlsberg 6, 1903, s. 64
- [4] SCHÖNFELD F.: Wschr. Braerei 21, 1904, s. 520
- [5] MEES, R. H.: Onderzoekingen over de de biersarcina" Disertace, Vysoká škola techn., Delft, 1934
- [6] SHIMWELL, J. L.: Wallerstein. Lab. Comm. 12, 1949, s. 71
- [7] SHIMWELL, J. L. - KIRKPATRICK, W. F.: J. Inst. Brew. 45, 1939, s. 137
- [8] ANDREWS, J. - GILLILAND, R. B.: J. Inst. Brew. 58, 1952, s. 189
- [9] PEDERSON, C. S.: Bact. rev. 13, 1949, s. 225
- [10] PEDERSON, C. S. - ALBURY MARGARET. N. - BREED, R. S.: Wallerstein. Lab. Comm. 17, 1954, s. 7

- [11] BHANDARI, R. R. - RUSSELL, C. - WALKER, T. K.: J. Sci. Food Agric. 5, 1954, s. 27
- [12] NAKAGAWA, A. - KITAHARA, K.: J. gen. appl. Microbiol. 5, 1959 s. 95
- [13] COSTER, E. - WHITE, H. R.: J. Gen. Microbiol. 37, 1964, s. 15
- [14] GÜNTHER, H. L. - WHITE, H. R.: J. Gen. Microbiol. 26, 1961, s. 185
- [15] GÜNTHER, H. L. - WHITE, H. R.: J. Gen. Microbiol. 26, 1961, s. 199
- [16] GARVIE, E. I.: Int. Systematic Bacteriology 24, 1974, s. 301
- [17] BACK, W. - STACKEBRANDT, E.: Arch. Microbiol. 118, 1978, s. 79
- [18] BACK, W.: Brauwiss. 31, 1978, s. 312, s. 336
- [19] BUCHANAN, R. E. - GIBBONS, N. E. (co-eds): Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8th ed., Williams and Wilkins, Baltimore 1974
- [20] ESCHENBECHER, F. - BACK, W.: Brauwiss. 29, 1976, s. 125
- [21] HENNEBERG, W.: Wschr. Braerei 19, 1901, s. 381
- [22] van STEENBERGE, P.: Ann. Inst. Pasteur 34, 1920, s. 803
- [23] BERGEY, D. H. - HARRISON, F. C. - BREED R. - HAMMER, B. W. - HUNTOON, F. M.: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 1st ed., Williams and Wilkins, Baltimore 1923
- [24] SHIMWELL, J. L.: J. Inst. Brew. 41, 1935, s. 481, s. 245; 42, 1936, s. 452; 43, 1937, s. 111, s. 191; 54, 1948, s. 100; 55, 1949, s. 26
- [25] SHIMWELL, J. L.: Wallerstein Lab. Comm. 4, 1941, s. 41; 12, 1949, s. 71
- [26] SHIMWELL, J. L.: Brewers, J. 93, 1957, s. 525, s. 574
- [27] PEDERSON, C. S.: J. Bact. 35, 1938, s. 95
- [28] BREED, R. S. - MURRAY, E. G. - HITCHENS, A. P.: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 6th ed., Williams and Wilkins, Baltimore 1948
- [29] ITO, UMENO: Rep. Res. Lab. Kirin Brew. (Jap.), No 7, 1964, s. 27
- [30] RUSSELL, C. - WALKER, T. K.: J. gen. Microbiol. 8, 1953, s. 100, s. 310
- [31] BHANDARI, R. R. - RUSSELL C. - WALKER, T. K.: J. Sci. Food Agric. 5, 1954, s. 27
- [32] CARRIÈRE, A.: Über die Biologie und Systematik der bierschädigenden stäbchenförmigen Bakterienarten. Dissertation, Humboldt-Universität, Berlin, 1959
- [33] ROGOSA, M. - SHARPE, M.: J. appl. Bact. 22, 1959, s. 329
- [34] ESCHENBECHER, F.: Brauwiss. 17, 1964, s. 309; 19, 1966, s. 239; 21, 1968 s. 424, s. 464; 22, 1969, s. 14
- [35] ORLA - JENSEN, S.: The lactic bacteria, København, A. F. Høst & Son, 1919

Bendová, O. - Kurzová, V.: Taxonomická příslušnost pivu škodlivých laktobacilů a pediokoků. Kvas. prům., 26, 1980, č. 9, s. 197—199.

Článek obsahuje stručný přehled vývoje názorů na taxonomické zařazování pivu škodlivých zástupců rodu *Pediococcus* z čeledi *Streptococcaceae* a rodu *Lactobacillus* z čeledi *Lactobacillaceae*.

Бендова, О. — Курцова, В.: Таксономия молочнокислых палочек и педиококков, обсеменяющих и загрязняющих пиво. Квас. прум. 26, 1980 № 9, стр. 197—199.

В статье показывается, как изменялись взгляды специалистов на классификацию вредящих пиву представителей рода *Pediococcus* из семейства *Streptococcaceae* и рода *Lactobacillus* из семейства *Lactobacillaceae*.

Bendová, O. - Kurzová, V.: Taxonomy of Lactobacilli and Pediococci Contaminating Beer. Kvas. prům., 26, 1980, No. 9, pp. 197—199.

The article deals briefly with differing approaches to the taxonomy of two groups of beer contaminating microorganisms, viz.: *Pediococci* of *Streptococcaceae* familia and *Lactobacilli* of *Lactobacillaceae* familia.

Bendová, O. - Kurzová, V.: Taxonomische Angehörigkeit der bierschädlichen Lactobazillen und Pediokokken. Kvas. prům., 26, 1980, No. 9, S. 197—199.

Der Artikel enthält ein zusammenfassende Übersicht der Entwicklung der Ansichten auf die taxonomische Einreihung der bierschädlichen Vertreter des Genus *Pediococcus* aus der Familie *Streptococcaceae* und des Genus *Lactobacillus* aus der Familie *Lactobacillaceae*.