

## API – systémy v pivovarství

663.44

VĚRA KURZOVÁ, prom. biol., Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, Praha

Při četných mikrobiologických šetřeních se setkáváme s nutností identifikovat zjištěné mikroorganismy, ať již z hlediska rozšíření znalostí o výskytu jednotlivých rodů a druhů, ale současně též při hledání nejvhodnějšího sanitčního zásahu při zjištění mikrobiálního znečištění provozů.

Pro určení taxonomické příslušnosti izolovaných mikroorganismů je u nás doposud běžně používán klasický způsob identifikace, který je časově i materiálově náročný, vyžaduje kvalifikované pracovníky a na mnohých pracovištích neumožňuje zpracovat současně větší počet vzorků. Výzkum biochemických nebo nutričních charakteristik mikroorganismů se uskutečňuje jednak na základě různého počtu standardních testů a jednak na zjišťování jejich schopnosti využívat různé zdroje uhlíku. Tyto zdroje uhlíku (respektive substráty) mohou být využívány zcela rozdílnými biochemickými mechanismy:

1. *Asimilace* — růst probíhá za přítomnosti substrátu představujícího jediný zdroj uhlíku v médiu definovaného složení. Toto médium musí být schopno podporovat růst testovaných mikroorganismů, je-li doplněno jednoduchým zdrojem uhlíku.

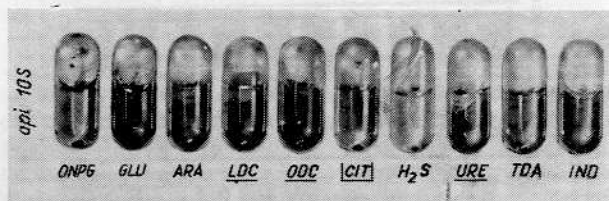
2. *Fermentace* — využívání glycidů probíhá anaerobní cestou za současné produkce kyselin.

3. *Oxidace* — využívání glycidů probíhá aerobní cestou za současné produkce kyselin.

Aby se odstranila náročnost provádění pestré řady biochemických testů pro identifikaci izolovaných mikroorganismů, byly v zahraničí vyvinuty miniaturizované multitestovací systémy, které tyto práce zjednodušují, urychlují a v neposlední řadě i standardizují. Nejširší uplatnění nalezly tzv. *API-systémy*. První zmínky o této nové metodě používané v pivovarské praxi se datují u nás začátkem sedmdesátých let, první podrobnější aplikaci pro pivovarskou mikrobiologickou kontrolu publikuje Dachs v roce 1974 [1], dále pak Murrough a Palmer [2]. V posledních letech pak jsou v pracích zahraničních autorů uváděny široké škály biochemických testů při identifikaci bakterií, z čehož vyplývá, že API-systémy se staly nedílnou součástí výzkumných i kontrolních prací v pivovarském průmyslu [3, 4].

Výrobou API-systémů se zabývá řada zahraničních firem, např. API-System S. A. La balme les Grotes 38 390 Montalieu-Vercieu, Francie; API Laboratory Products Ltd. Farnborough, Hants, Velká Británie; Analytab Products, Inc., Plainview N. Y. 11803, USA. První API-systémy byly vyvinuty pro identifikaci bakterií skupiny *Enterobacteriaceae*, ale zahraniční výrobci rozšířili ve svém výrobním programu tyto systémy i na další skupiny mikroorganismů. Největší výběr nabízí firma Analytab Products. Jen pro skupinu *Enterobacteriaceae* byly vyvinuty tři typy. *API 10 S* jsou používány pro rutinní screening a obsahují 12 biochemických testů: ONPG ( $\beta$ -galaktosidasa), GLU (glukosa), ARA (L-arabinoza), LDC (lysin dekarboxylasa), ODC (ornithin dekarboxylasa), CIT (Simmons-citrát),  $H_2S$  (sirovodík), URE (ureasa), TDA (tryptofan desaminasa), IND (indol), OX (cytochromoxidasa), NIT (redukce nitrátů). Kromě tohoto základního nejjednoduššího typu existují dále systémy *API-20 E*, které obsahují oproti *API-10 S* navíc další testy: VP (Voges-Proskauerův test), ADH (arginin dihydrolasa), GEL (ztekucování želatiny), MANN (mannitol), INO (inositol), SOR (sorbitol), RHA (rhamnosa), SAC (sacharosa), MEL (melibiosa), AMY (amygdalin). V kli-

nické praxi umožňuje identifikaci variabilních druhů bakterií *API-50 CH*, který představuje další rozšířenou škálu 50 biochemických testů. Pro další skupiny mikroorganismů byly vyvinuty systémy *API-20 A* pro druhovou identifikaci anaerobních bakterií, *API-20 C* pro rutinní diagnostiku kvasinek, *API-zym* je nový systém k identifikaci bakterií *Streptococcus* a konečně *API-System Lactobacillus*, obsahující 50 testů pro diferenciaci a druhovou identifikaci rodu *Lactobacillus*.

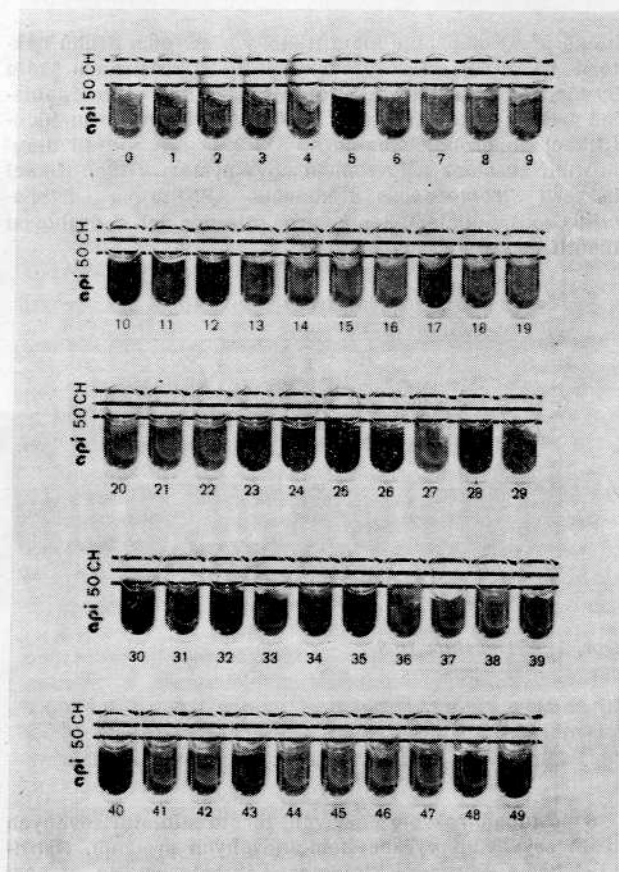


Obr. 1. API systém 10 S

S postupem rozvoje používání těchto miniaturizovaných testů se zavádí výroba kombinovaných systémů. Například firma Baltimore Biological Laboratories Div. of Becton, Dickinson and Co nabízí *Minitek* systém použitelný pro identifikaci skupiny *Enterobacteriaceae*, některých aerobních nefermentujících bakterií, jako jsou *Pseudomonas*, ale i některých anaerobů. Firma Corning Diagnostics 25 Lumber Rd. Rostlyn nabízí *kvasinkový systém*, *R-B systém* pro *Enterobacteriaceae* a *NF-systém*, který umožňuje jednoduché a rychlé určení neenterických gramnegativních bakterií. Z dalších komerčně vyráběných systémů je možné se zmínit o *Entero-Set 20* firmy Inolex Corp. for Diagnostics Div. Fisher Scientific Co. Orangeburg s 20 testy, *Enterotube* firmy Roche Diagnostics Div. Hoffmann La-Roche Inc. Nutley s 11 testy, *Micro-ID* s 15 testy a *Pathotec* s 12 testy firmy General Diagnostics Div. Warner-Lambert Co Morris Plains [5].

V mikrobiologickém oddělení VÚPS jsme měli možnost v roce 1981 při řešení výzkumného úkolu „Studium pivo škodlivých gramnegativních bakterií“ [6] pracovat s omezeným množstvím *API-10 S* a *API-50 CH* (obr. 1 a 2). Galerie těchto API-systémů jsou dokonale přizpůsobeny pro studium asimilace, fermentace i oxidace u mikroorganismů a umožňují sledovat současně nebo následně celý soubor těchto vlastností. Galerie API-systémů se skládají z tenkých fólií, na kterých jsou umístěna jednotlivá mikropole (*API-10 S* obsahuje 10 políček, *API-50 CH* 50 políček), z nichž každé obsahuje zónu anaerobiosy pro studium fermentace a zónu aerobiosy pro studium asimilace a oxidace. Jednotlivá mikropole obsahují dehydrovaná specifická média. Tato média jsou rekonstituována při inokulaci bakteriální suspenzí a při inkubaci reagují metabolity přítomných mikroorganismů s obsahem jednotlivých polí s různými indikátory. Fólie

s inkubačními komůrkami jsou umístěny v průhledných krabičkách, na jejichž dno se pipetuje malé množství sterilní vody. Celé systémy jsou dodávány od výrobce sterilní a po zaočkování se kompletní API galérie inkubují v termostatu při požadované teplotě.



Obr. 2. API systém 50 CH

Identifikace mikroorganismů se určuje podle připraveného diferenčního listu a indexu. Index obsahuje seznam bakterií, jejichž charakteristika byla zakódována podle principu obecně používaného v API-systému a umožňuje identifikovat neznámou bakterii tím, že se srovná její číselný kód s číselným profilem uvedeným v indexu. Tento biochemický profil je zároveň identifikační fenotypovou kartou zkoumaného mikroorganismu.

V průběhu naší výzkumné práce jsme při identifikaci izolovaných bakterií, a to jak tyčinek, tak koků, postupovali jednak klasickou metodou přípravy celé škály biochemických testů ve zkumavkách, současně jsme použili API-systémů. Vzhledem k omezenému počtu API-systémů, které jsme měli k dispozici, uvádíme v tabulkách 1–4 výsledky šetření těch izolovaných tyčinek a koků, u kterých mohly být pro porovnání použity metody obě. Vybrané testy jsou testy doporučené pro taxonomické určování gramnegativních bakterií podle Bergey's Manual 8 th Edition [7].

Spektrum prováděných biochemických testů bylo u obou metod různé, lze proto porovnávat pouze testy shodné, a to redukci nitrátů, tvorbu ureasy, oxidasy, sirovođíku, indolu, dále pak utilizaci některých glycidů.

**Redukce nitrátů** — reakce se shodují u všech izolátů koků, neshodují se u kmene tyčinek č. 5.

**Tvorba ureasy** — reakce se shodují u izolátů tyčinek,

Tab. 1. Biochemické vlastnosti izolovaných bakterií

Kmen č.	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>	T <sub>3</sub>	T <sub>5</sub>	T <sub>7</sub>	K <sub>1</sub>	K <sub>2</sub>	K <sub>3</sub>	K <sub>4</sub>	K <sub>5</sub>
t 15° a 40° C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
pH 4,5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
pH 7,5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
NaCl 4%–10%	–	–	+	–	–	–	+	+	+	–
oxidasa	+	+	–	–	–	–	–	+	+	–
katalasa	+	+	–	+	+	+	+	+	+	+
redukce NO <sub>3</sub>	+	+	–	+	–	–	(+)	(+)	(+)	–
ureasa	–	–	–	–	–	–	+	+	+	–
sírovođík	–	–	+	–	–	–	+	+	+	–
VP – test	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
arginin	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
indol	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–

T — izolované kmeny tyčinek  
K — izolované kmeny koků

Tab. 2. Biochemické vlastnosti izolovaných bakterií na API-10 S systémech

Kmen č.	ONPG	GLU	ARA	LDC	ODC	CIT	H <sub>2</sub> S	URE	TDA	IND	OX	NO <sub>2</sub>
T <sub>1</sub>	–	+	–	+	+	–	–	–	+	–	+	+
T <sub>2</sub>	–	+	–	+	+	–	–	–	+	–	+	+
T <sub>3</sub>	+	+	–	+	+	–	+	–	+	–	–	–
T <sub>5</sub>	–	+	–	+	+	–	–	–	+	–	–	–
T <sub>7</sub>	–	+	–	+	+	–	–	–	+	–	–	–
K <sub>1</sub>	–	+	–	+	+	–	–	–	+	–	–	–
K <sub>2</sub>	–	+	–	+	+	–	–	+	+	–	–	+
K <sub>3</sub>	–	+	–	+	+	–	–	–	+	–	–	+
K <sub>4</sub>	–	+	–	+	+	–	–	–	+	–	–	+
K <sub>5</sub>	–	+	–	+	+	–	–	–	+	–	–	–

u koků byla klasickou metodou zaznamenána pozitivní reakce oproti API-10 S navíc u kmenů č. 3 a 4.

**Tvorba sírovođíku** — reakce se shodují u všech 10 kmenů.

**Tvorba indolu** — negativní reakce se shodují u všech 10 kmenů.

**Oxidaseový test** — reakce se shodují u všech 10 kmenů.

Co se týče porovnávání glycidových testů, vzhledem k tomu, že naše izoláty netvořily plyn a většinou netvořily kyseliny, které mění barvu indikátoru přítomného v živné půdě [a v malých mikropólech na API 50 CH je samotný růst beze změny barevného indikátoru těžko postižitelný], bylo porovnání těchto reakcí omezené. K tvorbě kyselin došlo jednoznačně oběma metodami z glukosy a Na-laktátu u všech izolátů tyčinek i koků; celkově lze říci, že rozhodně oproti klasické metodě byla na API-50 CH zaznamenána tvorba kyselin ve více případech. V tabulce 4 uvádíme z 50 sledovaných reakcí pro přehlednost jen ty testy, u nichž byl zaznamenán pozitivní výsledek. U testů oproti profilové kartě v tabulce neuvedených byl u všech kmenů výsledek negativní.

Domníváme se, že široká škála glycidových testů na API-50 CH by našla opodstatnění pouze při zcela specifických identifikacích (spíše ve zdravotnictví), protože výsledky velké části testů nelze porovnávat s údaji v taxonomických příručkách. Pro práce obdobného charakteru bychom považovali za nejvhodnější a plně dostačující použití systémů API-20E s 23 testy.

Na základě výsledků uvedených v tabulkách 1–4 jsme všech 5 koků zařadili k rodu *Acinetobacter* z čeledi *Neiseriaceae*. Tento rod je charakterizován kokovitou formou, v logaritmické fázi přechází v mírně tyčinkovité



Tab. 3. Utilizace uhlíkatých zdrojů izolovanými baktériemi

Kmen č.	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>	T <sub>3</sub>	T <sub>5</sub>	T <sub>7</sub>	K <sub>1</sub>	K <sub>2</sub>	K <sub>3</sub>	K <sub>4</sub>	K <sub>5</sub>
glukosa	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
ribosa	+	+	++	+	(+)	(+)	—	+	+	+
laktosa	+	+	++	+	+	(+)	++	+	+	+
arabiosa	+	+	+	+	+	—	—	+	+	—
Na-glukonát	+	+	++	+	+	—	+	+	+	—
xylosa	—	—	—	—	+	+	—	+	+	+
fruktosa	+	+	++	+	+	++	++	+	++	+
mannosa	+	++	++	+	+	+	—	+	+	(+)
maltosa	+	++	++	++	+	—	++	+	+	—
škrob	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	—	—	—	—	—
etanol	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	—	—	—	—	—
Na-laktát	+(+)	+(+)	+(+)	+(+)	+(+)	+(+)	+(+)	+(+)	+(+)	+(+)
Na-pyrohrozn						+	+	+	+	+
Na-sukcinát						+	(+)	+	+	+
kyselina glutamová						—	(+)	+	+	(+)
půda bez C-zdroje						—	—	—	—	—

+ růst  
++ růst za současného okyselení

(+) opožděný růst  
+(+) růst a slabé okyselení

Tab. 4. Utilizace uhlíkatých zdrojů izolovanými baktériemi na API-50 CH

Kmen č.	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>	T <sub>3</sub>	T <sub>5</sub>	T <sub>7</sub>	K <sub>1</sub>	K <sub>2</sub>	K <sub>3</sub>	K <sub>4</sub>	K <sub>5</sub>
glukosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ribosa			+							
laktosa			+				+			
fruktosa			+				+			
mannosa		+	+			+				
maltosa		+	+				+			
amygdalin			+							
Na-laktát	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
arbutin			+							
N-acetyl-glukosan						+	+			
glycerol							+			
eskulin			+							
salicin			+			+				
cellobiosa			+			+				
melibiosa			+							
sacharosa			+				+			
trehalosa			+			+	+			
melezitosa							+			
inulin		+								
rafinosa		+								
gentiobiosa						+				
α-turanosa		+					+			

formy, nepohyblivé a nesporující. Jedna z hlavních vlastností rodu *Acinetobacter* je nepřítomnost oxidasy a tento předpoklad byl splněn u všech 5 kmenů. Dále tyto koky netvoří sirovodík a indol. I tyto dvě vlastnosti izoláty splňují. Nitráty nejsou zpravidla redukovány, přesto však u některých variant byla přítomnost nitrát-reduktasy zaznamenána. Všechny kmeny izolovaných koků splňují další požadovanou vlastnost, jsou katalasopozitivní. Rozdílnost v tvorbě acetoinu potvrzuje četnost přechodných forem mezi jednotlivými druhy. Při systematickém zařazování izolovaných tyčinek jsme kmeny T<sub>1</sub> a T<sub>2</sub>, které vykazovaly přítomnost oxidasy, zařadili do čeledi *Vibrionaceae*, a protože produkovaly acetoin, redukovaly nitráty, netvořily ureasu, shodují se s vlastnostmi rodu *Aeromonas*. U tohoto rodu se též uvádí, že je využívána glukosa, fruktosa, maltosa a adonitol, nikoliv však dulcitol, inositol, inulin, melezitosa, sorbosa a xylosa. I tyto znaky s výjimkou adonitolu jsou ve shodě s výsledky

všech našich testů (tab. 3 a 4). U řady dalších biochemických vlastností se připouští značná variabilita. Pokud jde o uvažované příslušnosti k rodu *Zymomonas*, připouští se u některých druhů určitá tolerance ke kyslíku, neprodukuje však katalasu a neredukuje nitráty. Tyto dva poslední znaky jsou v rozporu s našimi výsledky. Zbývající izoláty tyčinek, T<sub>3</sub>, T<sub>5</sub> a T<sub>7</sub>, které měly oxidasový test negativní, jsme zařadili do čeledi *Enterobacteriaceae*. Dále tyto kmeny produkovaly katalasu a acetoin, netvořily ureasu a indol, argininový test byl rovněž negativní. Redukce nitrátů a tvorba sirovodíku vykazovala variabilitu. Zjištěné vlastnosti nasvědčují pro zařazení těchto kmenů k rodu *Erwinia*. Tato skupina bakterií bývá zařazována k rodu *Enterobacter*, avšak v 8. vydání Bergey's Manual z roku 1974 se např. s druhem *Enterobacter agglomerans*, uváděným mezi kontaminanty pivovarské výroby, setkáváme u rodu *Erwinia* v podskupině B — *Herbicola*. Zařazení izolovaných tyčinek do tohoto rodu je i nadále poněkud problematické, protože se v řadě znaků připouštějí četné difference mezi jednotlivými variantami, zejména pak v utilizaci glycidů a jim příbuzných látek.

Práci s API-systémy hodnotíme kladně, protože tato metoda přináší značnou úsporu času i materiálu, jakož i snížení pracnosti při identifikaci kontaminantů a je možné ji v určitých případech použít i pro mikrobiologickou kontrolu pivovarských provozů. Rozdíly, které se nám projeví v některých případech oproti klasické kultivační metodě u základních metabolických projevů, je možné vysvětlit pravděpodobně rozdílným složením použitých kultivačních půd a detekčních činidel, s čímž máme v tomto směru určité zkušenosti z našich dřívějších prací.

## Literatura

- [1] DACHS, E.: Brauwelt 72, 1974, s. 1537.
- [2] MURROUGH, G. - PALMER, V.: J. Ins. Brew., 85, 1979, s. 11.
- [3] INGLEDEW, J. - SIWASWAMY, G. - BURTON, J. D.: J. Inst. Brew., 86, 1980, s. 165.
- [4] DALEZIL, L. - KIRSOP, B.: J. Inst. Brew., 86, 1980, s. 122.
- [5] COX, N. A. - MERCURI, A. J.: Food Technology, 3, 1979, s. 57.
- [6] KURZOVÁ, V. - VERNEROVÁ, J.: Výzkumná zpráva VÚPS „Studium jiva škodlivých gramnegativních bakterií“, ev. č. 19, 1981.
- [7] BUCHANAN, R. E. - GIBBONS, N. E.: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8th Edition, Baltimore, USA, Williams and Wilkins Company, 1974.

Kurzová, V.: API-systémy v pivovarství. Kvas. prům., 28, 1982, č. 10, s. 221—224.

Článek se zabývá popisem nové rychlé metody iden-

tifikace izolovaných mikroorganismů použitím API-systémů. Je uveden přehled výroby těchto API-systémů pro jednotlivé skupiny mikroorganismů a výsledky vlastní práce s API-10 S a API-50 CH v porovnání s klasickým způsobem identifikace některých gramnegativních bakterií.

**Курзова, В.: АПИ-системы в производстве пива.** Квас. прум., 28, 1982, № 10, стр. 221—224.

Статья занимается описанием нового быстрого метода идентификации изолированных микроорганизмов при использовании АПИ-систем. Приведен обзор по производству этих АПИ-систем для отдельных групп микроорганизмов и результаты собственной работы с АПИ-10 С и АПИ-50 Х в сопоставлении с классическим способом идентификации некоторых грамотрицательных бактерий.

**Kurzová, V.: API-Systems in Brewing.** Kvas. prům. 28, 1982, No. 10, p. 221—224.

A description of a new quick method for an identification of isolated microorganisms using API-Systems is made. Author shows a survey of a production of the API-Systems for the individual groups of microorganisms and compares the results of her own, obtained with API-10S and API-50CH, with those obtained with a classical procedure of the identification of some Gram-negative bacteria.

**Kurzová, V.: API-Systeme in der Brauerei- Mikrobiologie.** Kvas. prům. 28, 1982, Nr. 10, S. 221—224.

In dem Artikel werden neue Methoden zur Identifikation isolierter Mikroorganismen bei Anwendung der API-Systeme beschrieben. Es wird eine Übersicht der erzeugten API-Systeme für die einzelnen Gruppen der Mikroorganismen angeführt. Im weiteren wird über die Ergebnisse der eigenen Versuche berichtet, in denen der Einsatz der API-Systeme API-10 S und API-50 CH mit den klassischen Methoden der Identifikation gramnegativer Bakterien verglichen wird.