

DOI: 10.18832/kp201824

Microbiology of brewery production – bacteria of the order *Enterobacteriales* Mikrobiologie pivovarské výroby – bakterie řádu *Enterobacteriales*

Dagmar MATOULKOVÁ¹, Eva VONTROBOVÁ², Martina BROŽOVÁ¹, Petra KUBIZNIAKOVÁ¹¹ Department of Microbiology, Research Institute of Brewing and Malting, Lípová 15, 120 44 Praha 2, Czech Republic
Mikrobiologické oddělení, Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, a.s., Lípová 15, 120 44 Praha 2² Institute of Experimental Biology, Faculty of Science, Masaryk University, Kotlářská 2, 611 37 Brno, Czech Republic
Ústav experimentální biologie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova Univerzita /

e-mail: matoulkova@beerresearch.cz

Reviewed paper / Recenzovaný článek

Matoulková, D., Vontrovová, E., Brožová, M., Kubizniaková, P., 2018: Microbiology of brewery production – bacteria of the order *Enterobacteriales*. Kvasny Prum. 64(4): 161–166

The *Enterobacteriales* order contains 7 families with more than 40 bacterial genera which are isolated from various types of environment. The genera *Shimwellia*, *Obesumbacterium*, *Rahnella*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Raoultella*, *Serratia* and *Enterobacter* are often found in the beer brewing process. The ability of these bacteria to grow and multiply in the finished beer is minimal. The bacteria occur primarily as contamination of yeast. They are harmful because these bacteria produce sensory undesirable substances (e.g. dimethylsulfide, diacetyl, acetoin) at the beginning of the main fermentation and get into the finished beer. Some species are involved in the formation of N-nitrosamines harmful for health. Here we present an overview of the basic morphological and physiological properties of these bacteria and describe their importance from the point of view of harmfulness in the beer brewing process.

Matoulková, D., Vontrovová, E., Brožová, M., Kubizniaková, P., 2018: Mikrobiologie pivovarské výroby – bakterie řádu *Enterobacteriales*. Kvasny Prum. 64(4): 161–166

Řád *Enterobacteriales* obsahuje 7 čeledí s více než 40 bakteriálními rody, které jsou izolovány z rozmanitých typů prostředí. V pivovarském provozu se vyskytují zejména zástupci rodů *Shimwellia*, *Obesumbacterium*, *Rahnella*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Raoultella*, *Serratia* a *Enterobacter*. Schopnost těchto bakterií růst a množit se v hotovém pivu je minimální, vyskytují se zejména jako kontaminace kvasnic. Jejich škodlivost spočívá v produkci senzoryckých nežádoucích látek (např. dimethylsulfidu, diacetylu, acetoinu) na začátku hlavního kvašení a jejich přechodu do hotového piva. Některé druhy se podílí na tvorbě zdraví škodlivých N-nitrosaminů. V publikaci je uveden přehled základních morfologických a fyziologických vlastností těchto bakterií a je popsán jejich význam z hlediska škodlivosti v procesu výroby piva.

Keywords: *enterobacteria*, *Klebsiella*, *contamination of wort*, *Obesumbacterium*, *N-nitrosamines*, *Rahnella*, *Enterobacter*

Klíčová slova: *enterobakterie*, *Klebsiella*, *kontaminace mladiny*, *Shimwellia*, *Obesumbacterium*, *N-nitrosaminy*, *Rahnella*, *Enterobacter*

1 INTRODUCTION

In the brewing laboratory, enterobacteria are sometimes called thermobacteria, bacteria of wort or coliform bacteria, or coliforms. These terms are fairly inaccurate. The term thermobacteria was introduced at the end of the 19th century and was related with their difficult observation by microscopes – for their small size, the bacteria were at the border of discernibility; terminus = final (Šavel, 1980). The term bacteria of wort is misleading because other bacteria than enterobacteria (e.g. gram-positive *Bacillus*) can also occur in the wort. The term coliform bacteria (coliforms) is used for bacteria of *Enterobacteriales* order which ferment lactose to produce acid and gas (at 30–37 °C to 48 hours) and includes *Escherichia coli* (and most other species of *Escherichia* genus) and *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Raoultella* and some bacteria from *Serratia* genus. Coliforms do not include (i.g. lactose-positive bacteria) e.g. *Obesumbacterium proteus* or re-classified *Shimwellia pseudoproteus*, which are very important for microbiological control of brewing operations (Van Vuuren and Priest, 2003).

Another term that is used in connection with bacteria of *Enterobacteriaceae* family, is “fecal coliform” more precisely “thermotolerant coliform bacteria”. It denotes bacteria that retain growth and fermentation properties at 44 °C and can serve as indicators of fecal contamination (Veger and Baudišová, 1996).

Enterobacteriales order includes more than 40 bacterial genera which are found in various types of environment – water, soil, fruit, vegetables, grains, flowering plants, trees, human skin and digestive tract of animals including humans. Some representatives are agents of human and animal diseases. Many *Enterobacteriales* species primarily attack the intestinal tract and may cause diarrheal diseases. In addition, some enterobacteria can cause urinary infections, infections of wounds and respiratory tract, etc. (Brenner and Farmer, 2015; Sedláček, 2007).

From the point of view of microbiological control in the brewing laboratory, particularly important genera in *Enterobacteriales* order are *Shimwellia*, *Obesumbacterium*, *Rahnella*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Raoultella*, *Serratia* and *Enterobacter*. Pathogenic species, including

1 ÚVOD

Enterobakterie jsou někdy v pivovarské laboratoři nazývány jako termobakterie, mladinové bakterie nebo koliformní bakterie, případně koliformy. Uvedené termíny jsou poměrně nepřesné. Termín termobakterie byl zaveden na konci 19. století a souvisel s jejich obtížným pozorováním tehdejšími mikroskopy – pro své malé rozměry byly tyto bakterie na hranici rozeznatelnosti; terminus = konečný (Šavel, 1980). Termín mladinové bakterie je zavádějící, neboť v mladině se mohou vyskytovat i jiné bakterie nežli jen enterobakterie (např. gram pozitivní rod *Bacillus*). Pojem koliformní bakterie (koliformy) je používán pro bakterie z řádu *Enterobacteriales*, které fermentují laktosu za tvorby kyseliny a plynu (při teplotě 30–37 °C do 48 hodin), a zahrnuje *Escherichia coli* (a většinu ostatních druhů rodu *Escherichia*) a rody *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Raoultella* a některé zástupce rodu *Serratia*. Mezi koliformy (tj. laktosa-positivní bakterie) tedy nepatří např. druh *Obesumbacterium proteus* ani reklasifikovaný *Shimwellia pseudoproteus*, který je z hlediska mikrobiologické kontroly pivovarského provozu velmi důležitý (Van Vuuren a Priest, 2003).

Dalším pojmem, který je používán v souvislosti s bakteriemi řádu *Enterobacteriales*, jsou „fekální koliformy“, přesněji „thermotolerantní koliformní bakterie“. Jedná se o označení bakterií, které mají zachovány růstové a fermentační vlastnosti při teplotě 44 °C a mohou sloužit jako indikátory fekálního znečištění (Veger a Baudišová, 1996).

Řád *Enterobacteriales* zahrnuje více než 40 bakteriálních rodů, které jsou nacházeny v rozmanitých typech prostředí. Vyskytují se ve vodě, v půdě, na ovoci, zelenině, zrnech, kvetoucích rostlinách a stromech, na povrchu těla a v trávicím traktu živočichů včetně člověka. Některé zástupce jsou původci onemocnění člověka a zvířat. Mnoho druhů řádu *Enterobacteriales* primárně napadá střevní trakt a může způsobovat průjemová onemocnění. Kromě toho mohou být některé enterobakterie původci močových infekcí, infekcí ran, respiračního traktu apod. (Brenner a Farmer, 2015; Sedláček, 2007).

Z hlediska mikrobiologické kontroly v pivovarské provozní laboratoři jsou z řádu *Enterobacteriales* důležité zejména rody *Shimwellia*, *Obesumbacterium*, *Rahnella*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Raoultella*,

E. coli, have not been found in the brewing industry (Van Vuuren and Priest, 2003). *Shigella*, *Salmonella* and *E. coli* were inoculated into beer and died within 48 hours after inoculation, despite high initial cell concentration (Boulton and Quain, 2001).

2 BACTERIA OF ENTEROBACTERIALES ORDER IN THE BREWERY PRODUCTION

Enterobacteria are not sensitive to bitter hop acids, and aerated wort is the ideal environment for their growth and reproduction. They can compete with brewer's yeasts and reduce their growth. However, most enterobacteria are inhibited by ethanol and acidic pH, so they are not able to survive later phases of the main fermentation and are not transferred into the finished beer. Exceptions are *Shimwellia pseudoproteus* and *Rahnella aquatilis*, which are contaminants of pitching yeast, are transferred into the new wort and can damage several batches of beer in row (Bokulich and Bamforth, 2013). They can slow down fermentation and the finished beer has a high pH (Priest et al., 1974). Both species are to some extent resistant to ethanol (especially *S. pseudoproteus*) and are killed during the fermentation of HGB batches (ethanol concentration > 6 vol. %) (Van Vuuren and Priest, 2003). Their presence in yeast can be eliminated to some extent by acidic washing – bacteria of *Enterobacterales* order are sensitive to low pH (< 4,4) (Boulton and Quain, 2001; Hill, 2009).

The presence of enterobacteria in the fermented wort is associated with multiple sensory defects of the finished beer which can have sweet, honey, fruity to vegetable and faecal character. Enterobacteria produce various organic acids (formic, acetic, lactic) and other sensory active substances (acetaldehyde, acetoin, dimethylsulfide, diacetyl, 2,3-butanediol), that can significantly change the character of the environment in which these microorganisms occur (Briggs et al., 2004; Jespersen and Jakobsen, 1996).

Some species of enterobacteria can reduce nitrates to nitrites which subsequently react with amines. This reaction results in the formation of carcinogenic N-nitrosamines (Fig. 1). In this case, the most hazardous bacteria is *S. pseudoproteus*. *S. pseudoproteus* reduces nitrates, which are always present in the wort, to nitrites and thus provides a precursor to the formation of nitrosamines (Smith, 1994).

The contamination of wort with enterobacteria can also lead to an increased concentration of biogenic amines in beer. In this case, biogenic amines are formed enzymatically by decarboxylation of free amino acids by decarboxylase-active bacteria (Buňka et al., 2012; Gasarasi et al., 2003).

Enterobacteria can be introduced into the brewing process from contaminated water or e.g. from leaking pipe connections. These connections can cause the entrance of dirt and bacteria from the environment to cooled wort (Vaughan et al., 2005). Enterobacteria present in samples of water and yeast and during sanitation control are an indicator of poor hygiene conditions and low sanitation levels in the brewing process (Boulton and Quain, 2001).

The order Enterobacterales

The name of the *Enterobacterales* order is derived from Latin *enterobacterium* (an intestinal bacterium) and *-ales* ending to denote an order (Brenner and Farmer, 2015).

Members of the order *Enterobacterales* are Gram negative, rod-shaped, some genera are motile. The enterobacterial cell size ranges from 0.3–1.0 x 1.0–6.0 µm. Enterobacteria are facultatively anaerobic with both a respiratory and a fermentative type of metabolism. Species that occur in brewery are catalase positive and oxidase negative. Most of them also reduce nitrates to nitrites in an anaerobic respiration process. Most members grow on common media containing peptone or meat extract such as, e.g., MacConkey agar. The optimum growth temperature of most enterobacteria ranges from 22 to 35 °C (Brenner and Farmer, 2015; Sedláček, 2007).

The basic characteristics, occurrence and harmfulness of *Enterobacterales* order in the brewing process are summarized in Table 1.

The genera *Obesumbacterium* and *Shimwellia*

Bacteria of *Obesumbacterium* genus are pleomorphic (shape-changeable) nonmotile rods. The size of this bacteria ranges from 0.8–2.0 x 1.5–100 µm. Short thick rods predominate in the wort and long rods usually predominate when grown in most bacteriological media (Priest et al., 1974). The catalase reaction is weak and delayed. Members of *Obesumbacterium* genus reduce nitrates to nitrites. The name *Obesumbacterium* comes from Latin *obesum* (thick)

Serratia, a *Enterobacter*. Patogenní druhy, včetně *E. coli*, nebyly v pivovarském provozu prokázány (Van Vuuren a Priest, 2003). Při inokulaci piva bakteriemi *Shigella*, *Salmonella* a *E. coli* došlo k jejich usmrcení během 48 hodin od zaočkování i přes vysokou původní koncentraci buněk (Boulton a Quain, 2001).

2 BAKTERIE ŘÁDU ENTEROBACTERIALES V PIVOVARSKÉ VÝROBĚ

Enterobakterie nejsou citlivé na působení hořkých chmelových kyselin a provzdušněná mladina pro ně představuje ideální prostředí pro růst a množení. Mohou konkurovat pivovarským kvasinkám a zpomalovat jejich růst. Většina enterobakterií je však citlivá na ethanol a kyselé pH, nejsou tedy schopné přežít v pozdějších fázích hlavního kvašení a nepřecházejí do hotového piva. Výjimkou jsou druhy *Shimwellia pseudoproteus* a *Rahnella aquatilis*, které jako kontaminanty násadních kvasnic přecházejí opakovaně do nové mladiny a mohou poškodit několik várek za sebou (Bokulich a Bamforth, 2013). Mohou zpomalovat fermentaci a vyrobené pivo má vysoké pH (Priest et al., 1974). Oba druhy jsou do jisté míry rezistentní k ethanolu (zejména *S. pseudoproteus*), při kvašení HGB várek (koncentrace ethanolu > 6 obj. %) jsou usmrceny (Van Vuuren a Priest, 2003). Jejich přítomnost v kvasnicích lze do jisté míry eliminovat kyselým praním – bakterie řádu *Enterobacterales* jsou citlivé k nízkému pH (<4,4) (Boulton a Quain, 2001; Hill, 2009).

Přítomnost enterobakterií v zakvašené mladině souvisí s rozmanitými senzoryckými vadami hotového piva, které může mít sladký, medový, ovocitý až zeleninový a fekální charakter. Enterobakterie produkují různé organické kyseliny (mravenčí, octovou, mléčnou) a další senzorycky aktivní látky (acetaldehyd, acetoin, dimethylsulfid, diacetyl, 2,3-butanediol), které mohou výrazně změnit charakter prostředí, v němž se tyto mikroorganismy vyskytují (Briggs et al., 2004; Jespersen a Jakobsen, 1996).

Některé druhy enterobakterií jsou schopny redukovat dusičnany na dusitany, které následně reagují s aminy, což má za následek tvorbu karcinogenních N-nitrosaminů (obr. 1). Nejvíce rizikovou bakterií je v tomto případě *S. pseudoproteus*. V mladině jsou vždy přítomny dusičnany, a jejich redukcí na dusitany *S. pseudoproteus* poskytuje prekursor pro vznik nitrosaminů (Smith, 1994).

Kontaminace mladiny enterobakteriemi může vést ke zvýšené koncentraci biogenních aminů v pivu. Biogenní aminy v takovém případě vznikají enzymaticky, dekarboxylací volných aminokyselin bakteriemi s dekarboxylasovou aktivitou (Buňka et al., 2012; Gasarasi et al., 2003).

Zdrojem enterobakterií v pivovarském provozu je kontaminovaná voda nebo např. netěsnosti spojů potrubí, kterými se do zchlazené mladiny mohou dostávat nečistoty a bakterie z prostředí (Vaughan et al., 2005). Enterobakterie přítomné ve vzorcích vody a kvasnic, a zjištěné při kontrole sanitace, jsou indikátorem zhoršených hygienických podmínek a nízké úrovně sanitace v daném pivovarském provozu (Boulton a Quain, 2001).

Řád Enterobacterales

Název řádu *Enterobacterales* je odvozen z latinského *enterobacterium* (střevní bakterie) a přípony *-ales* pro označení řádu (Brenner a Farmer, 2015).

Bakterie řádu *Enterobacterales* jsou gramnegativní, rovné tyčky, některé mohou být pohyblivé. Velikost buněk enterobakterií se pohybuje v rozmezí 0,3–1,0 x 1,0–6,0 µm. Enterobakterie jsou fakultativně anaerobní s respiratorním i fermentativním typem metabolismu. Druhy vyskytující se v pivovarském prostředí jsou katalasa-positivní a oxidasa-negativní. Většina enterobakterií redukuje dusičnany na dusitany v procesu anaerobní respirace. Většina zástupců roste na běžné půdě obsahující pepton nebo masový výtažek. Velmi často se používá např. MacConkeyho agar. Optimální teplota růstu většiny enterobakterií je v rozmezí 22–35 °C (Brenner a Farmer, 2015; Sedláček, 2007).

Základní charakteristika, výskyt a škodlivost bakterií řádu *Enterobacterales* v pivovarské výrobě jsou shrnuty v tab. 1.

Rody *Obesumbacterium* a *Shimwellia*

Bakterie rodu *Obesumbacterium* jsou pleomorfní (tvarově proměnlivé) nepohyblivé tyčky. Jejich velikost se pohybuje v rozmezí 0,8–2,0 x 1,5–100 µm. V mladině se vyskytují většinou jako krátké silné tyčky, při inkubaci na běžných bakteriologických médiích mají tvar dlouhých tyček (Priest et al., 1974). Katalasová reakce může být někdy velmi slabá a zpožděná. Redukují dusičnany na dusitany. Název *Obesumbacterium* je odvozen z latinského *obesum* (tlustý)

Table 1 Occurrence and harmfulness of *Enterobacterales* order in the brewing process

Bacteria	Occurrence and general characteristic	Harmfulness
<i>Shimwellia pseudoproteus</i> (“ <i>Hafnia protea</i> “)	– yeast contamination – multiply at the early stages of main fermentation – relative tolerant to ethanol (< 6 %) – survive in yeast, can contaminate following batch	– production of DMS, higher alcohols, diacetylene – reduction of nitrates to nitrites (non-volatile N-nitrosamines formation) – slowdown of fermentation, higher pH of final beer
<i>Rahnella aquatilis</i> (“ <i>Enterobacter agglomerans</i> “)	– yeast contamination – multiply at the early stages of main fermentation, mainly in ales – relative sensitivity to ethanol – survive in yeast, can contaminate following batch	– production of diacetylene, DMS, acetaldehyde and ethyl acetate – increase of initial rate of wort fermentation – higher pH of final beer
<i>Citrobacter freundii</i>	– contamination of pitched wort – sensitivity to ethanol – do not survive the main fermentation	– production of organic acids and DMS – increase of initial rate of wort fermentation
<i>Klebsiella oxytoca</i> <i>Raoultella terrigena</i>	– contamination of pitched wort – sensitivity to ethanol – do not survive the main fermentation	– production of 4-vinylguayacol, acetoin, 2,3-butandiol and DMS
<i>Serratia marcescens</i>	– contamination of water – multiply at the early stages of main fermentation	– production of sulphur and phenolic compounds – reduction of nitrates to nitrites (non-volatile N-nitrosamines formation)
<i>Enterobacter cloacae</i>	– contamination of water – multiply at the early stages of main fermentation	– production of sulphur and phenolic compounds, DMS – reduction of nitrates to nitrites (non-volatile N-nitrosamines formation)

Tab. 1 Výskyt a škodlivost bakterií řádu *Enterobacterales* v pivovarské výrobě

Bakterie	Výskyt a základní charakteristika	Škodlivost
<i>Shimwellia pseudoproteus</i> („ <i>Hafnia protea</i> “)	– kontaminace kvasnic – množení v raných fázích hlavního kvašení – relativně tolerantní k ethanolu (< 6 %) – přežívají v kvasnicích, mohou kontaminovat další várku	– produkce DMS, vyšších alkoholů, diacetylu – redukce dusičnanů na dusitany (vznik netěkavých N-nitrosaminů) – zpomalení kvašení, vyšší pH hotového piva
<i>Rahnella aquatilis</i> („ <i>Enterobacter agglomerans</i> “)	– kontaminace kvasnic – množení v raných fázích hlavního kvašení, zejména u svrchně kvašených piv – relativně citlivá k ethanolu – přežívají v kvasnicích, mohou kontaminovat další várku	– produkce diacetylu, DMS, acetaldehydu a ethylacetátu – zrychlení počáteční rychlosti kvašení mladiny – vyšší pH hotového piva
<i>Citrobacter freundii</i>	– kontaminace zakvašené mladiny – citlivost k ethanolu – nepřežije hlavní kvašení	– produkce organických kyselin a DMS – zrychlení počáteční rychlosti kvašení mladiny
<i>Klebsiella oxytoca</i> <i>Raoultella terrigena</i>	– kontaminace zakvašené mladiny – citlivost k ethanolu – nepřežijí hlavní kvašení	– produkce 4-vinylguajakolu, acetoinu, 2,3-butandiolu a DMS
<i>Serratia marcescens</i>	– kontaminace zakvašené mladiny – množení v raných fázích kvašení	– produkce sirných a fenolických látek – redukce dusičnanů na dusitany (vznik netěkavých N-nitrosaminů)
<i>Enterobacter cloacae</i>	– kontaminace vody – množení v raných fázích kvašení	– produkce sirných a fenolických látek, DMS – redukce dusičnanů na dusitany (vznik netěkavých N-nitrosaminů)

and *bacterium* (rod). Originally, these bacteria were classified as *Flavobacterium proteus*, later reclassified as *O. proteus* (Shimwell, 1963; 1964). The older brewery literature also gives the name “*Hafnia protea*” which has never been officially recognized (Farmer and Brenner, 2015).

Bacteria of *Obesumbacterium* genus grow on ordinary media and form colonies of up to 0.5 mm. The optimum growth temperature is 25–32 °C; growth at 37 °C (commonly used for incubating enterobacteria) is comparatively poor. From sugars, they mainly use glucose and mannose, and only a limited range of other sugars. They are biochemically much less active than other enterobacteria (Sedláček, 2007).

Only one species was described; *Obesumbacterium proteus* existed in two biogroups (i.e. two groups of strains that share high homology of DNA but exhibit specific biochemical or physiological properties; taxonomically, the biogroup is a lower level than subspecies (Farmer and Brenner, 2015; Sedláček, 2007)). *Obesumbacterium proteus* biogroup 1 is closely related to *Hafnia alvei* and was less common in breweries than biogroup 2. Biogroup 1 was associated with the intestines of fish and snails. *O. proteus* biogroup 2 occurred only in the environment of beer production. In 2010 *O. proteus* biogroup 2 was

a *bacterium* (tyčka). Původně byla tato bakterie řazena do druhu *Flavobacterium proteus*, později byla reklasifikována jako *Obesumbacterium proteus* (Shimwell, 1963, 1964). Ve starší pivovarské literatuře je uváděn i název „*Hafnia protea*“, který však nikdy nebyl oficiálně uznán (Farmer a Brenner, 2015).

Rostou na běžných živných půdách, vytváří kolonie o velikosti do 0,5 mm. Teplotní optimum většiny zástupců je 25–32 °C; při teplotě 37 °C (používané běžně pro inkubaci enterobakterií) rostou výrazně pomaleji. Z cukrů využívají jen omezené spektrum cukrů, zejména glukosu a manosu. Celkově jsou biochemicky mnohem méně aktivní než ostatní enterobakterie (Sedláček, 2007).

Popsán byl pouze jediný druh, *O. proteus*, který existoval ve dvou biotypech (tj. ve dvou skupinách kmenů, které sdílejí navzájem vysokou homologii DNA, ale vykazují specifické biochemické nebo fyziologické vlastnosti; taxonomicky je biotyp nižší úroveň než poddruh) (Farmer a Brenner, 2015; Sedláček, 2007). *O. proteus* biotyp 1 je blíže příbuzný druhu *Hafnia alvei* a v pivovarské výrobě je nalézán jen zřídka, jeho přítomnost byla zaznamenána např. ve střešní soustavě ryb a hlemýžďů. *O. proteus* biotyp 2 byl nacházen vždy jen v souvislosti s prostředím pivovarské výroby a v roce 2010 proběhla reklasifikace

transferred to the genus *Shimwellia* and species *O. proteus* was reclassified as *Shimwellia pseudoproteus* (Priest and Barker, 2010).

S. pseudoproteus is a brewery spoilage bacterium because can multiply in the wort and is relatively tolerant to alcohol (up to 6 vol. %). It multiplies in fermented wort along with cultured yeast, inhibits the fermentation process and causes finished beer to have a higher residual extract and pH (Priest et al., 1974). The bacterial production of dimethylsulfide, n-propanol, isobutanol, isopentanol, 2,3-butanediol and diacetyl also damages beer. These substances impart to beer a vegetable flavor and a passion-like flavor. *S. pseudoproteus* survives during yeast storage, which is the source of further contamination of beer production (Van Vuuren and Priest, 2003).

The presence of *S. pseudoproteus* can result in the formation of non-volatile N-nitrosamines (apparent total N-nitroso compounds, ATNC). In the wort, *O. proteus* reduces nitrate to nitrite (by the activity of bacterial enzyme nitrate reductase). Nitrites are precursors of nitrosamines since they react with amines to form ATNC (schematically in Fig. 1). The contamination of yeast with greater than 0,03% *S. pseudoproteus* cells results in exceeding recommended 20 µg/l limit of ATNC (Boulton and Quain, 2001).

The genus *Rahnella*

Bacteria of *Rahnella* genus are small straight rods, motile when grown at 25 °C but nonmotile at 36 °C. Cell size ranges from 0.5-0.7 x 2.0-3.0 µm. They reduce nitrates to nitrites. The genus *Rahnella* was named after the microbiologist Otto Rahn who proposed the name *Enterobacteriaceae* family (Kämpfer, 2015). *Rahnella* is found in water and soil and was also isolated from clinical material (Sedláček, 2007).

Rahnella grows on ordinary media. The optimum growth temperature of most members is 25-35 °C; at 37 °C (temperature commonly used for incubation of enterobacteria) they grow more slowly. Most strains are psychrotolerant, i.e. they grow (but significantly slower) even at 4 °C. They use a wide range of sugars (Kämpfer, 2015).

The genus *Rahnella* currently includes 6 species. Some strains of the *Enterobacter agglomerans* complex that is sometimes referred to as species of *Enterobacteriaceae* in the older brewery literature have been included in *Rahnella* genus (e.g. Hamze et al., 1991; Van Vuuren et al., 1980).

Rahnella can influence the main fermentation. In the production of top fermented beer, *Rahnella* cells rise to the fermentation cover along with yeast and can survive 60-70 hours of fermentation. They are not affected by rising ethanol concentrations and decreasing pH. In this case, other enterobacteria remain in the volume of fermenting wort and their activity is gradually diminished (Priest et al., 1974). If *Rahnella* contaminates the wort in the production of lager beer, finished beer is usually less fermented (although *Rahnella* initially accelerates fermentation) and has a higher pH. During fermentation, the aroma and the taste of beer damaged by *Rahnella* are described as fruity, lactic and sulfuric, due to higher concentration of dimethylsulfide, acetaldehyde, methylacetate and diacetyl (Van Vuuren et al., 1980). As *shimwellia* and *obesumbacteria*, *Rahnella* cells are accumulated in the yeast and damage another batch of beer (Hamze et al., 1991).

The genus *Citrobacter*

Bacteria of *Citrobacter* genus are straight rods, occur single or in pairs, and are usually motile. They reduce nitrates to nitrites. Cells size ranges from 1.0 x 2.0–6.0 µm. The genus was named after his typical property - most strains use citrate as the exclusive source of carbon (Frederiksen, 2015).

Citrobacter grow on ordinary media and create smooth, low convex, gray colonies with shiny surface and entire edge. The optimum growth temperature is 37 °C (Frederiksen, 2015; Sedláček, 2007).

At present, 14 species of *Citrobacter* genus are described. *Citrobacter freundii* has been reported as an occasional contamination of

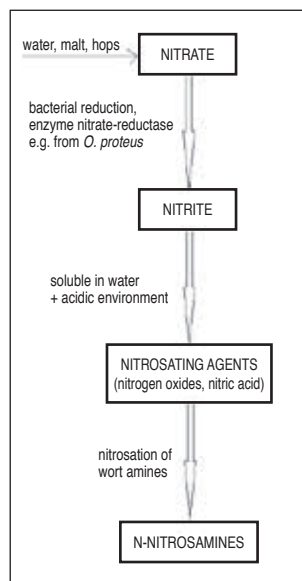
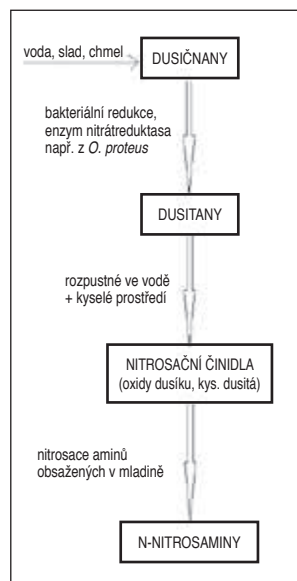


Fig. 1 ATNC formation during wort fermentation



Obr. 1 Tvorba ATNC v průběhu kvašení mladiny

tohoto taxonu – bylo navrženo a validováno přezáření *O. proteus* biotyp 2 do rodu *Shimwellia* a reklasifikace druhu *O. proteus* biotyp 2 jako *Shimwellia pseudoproteus* (Priest a Barker, 2010).

Škodlivost *S. pseudoproteus* v pivovarské výrobě spočívá v jeho schopnosti množit se v mladině a relativní toleranci k alkoholu (až 6 obj. %). *S. pseudoproteus* se množí v zakvašené mladině spolu s kulturními kvasinkami, brzdí fermentační proces a hotové pivo má tak vyšší zbytkový extrakt a pH (Priest et al., 1974). Pivo dále poškozuje produkci dimethylsulfidu, n-propanolu, isobutanolu, isopentanolu, 2,3-butanediolu a diacetylů. Tyto látky dodávají pivu zeleninovou vůni a chuť připomínající pastinák. *S. pseudoproteus* přežívá i v průběhu skladování kvasnic, které jsou pak zdrojem další kontaminace výroby (Van Vuuren a Priest, 2003).

S. pseudoproteus se podílí na vzniku netěkavých N-nitrosaminů (apparent total N-nitroso compounds, ATNC). Dusičnany přítomné v mladině jsou těmito bakteriemi redukovány na dusitany (činností bakteriálních enzymů nitrát-reduktas). Dusitany jsou prekursory nitrosaminů – reagují s aminy za tvorby ATNC (schematicky na obr. 1). Kontaminace kvasnic více než 0,03% buněk *O. proteus* vede k překročení doporučeného limitu ATNC 20 µg/l (Boulton a Quain, 2001).

Rod *Rahnella*

Bakterie rodu *Rahnella* jsou malé rovné tyčky, jejichž pohyblivost je dána teplotou inkubace – při teplotě 36 °C nejsou pohyblivé, při 25 °C jsou pohyblivé. Velikost buněk se pohybuje v rozmezí 0,5-0,7 x 2,0-3,0 µm. Redukují dusičnany na dusitany. Rod byl pojmenován na počest mikrobiologa Otto Rahna, který navrhl označení čeledi *Enterobacteriaceae* (Kämpfer, 2015). *Rahnella* se vyskytuje ve vodě, pletivech stromů a v půdě, izolována byla i z klinického materiálu (Brady et al., 2014; Sedláček, 2007).

Bakterie *Rahnella* rostou na běžných živných půdách. Teplotní optimum většiny zástupců je 25–35 °C; při teplotě 37 °C (používané běžně pro inkubaci enterobakterií) rostou pomaleji. Většina kmenů je psychrotolerantní, tj. rostou (ovšem výrazně pomaleji) i při teplotě 4 °C. Využívají široké spektrum cukrů (Kämpfer, 2015).

V současné době je v rámci rodu *Rahnella* popsáno 6 druhů. Do rodu *Rahnella* byly zařazeny některé kmeny druhového komplexu *Enterobacter agglomerans*, který je někdy ve starší pivovarské literatuře uváděn jako druh čeledi *Enterobacteriaceae* (např. Hamze et al., 1991; Van Vuuren et al., 1980).

Rahnella svou přítomností v mladině dokáže ovlivnit celý proces hlavního kvašení. Při výrobě svrchně kvašených piv jsou buňky *Rahnella* vynášeny do kvasné deky spolu s kvasinkami a dokáží tak přežít i 60–70 hodin kvašení, aniž by byly ovlivněny stoupající koncentrací ethanolu a klesajícím pH. Ostatní enterobakterie v takovém případě zůstávají v objemu kvasící mladiny a jejich činnost je postupně tlumena (Priest et al., 1974). Pokud *Rahnella* kontaminuje mladinu při výrobě piva typu ležák, je výsledné pivo obvykle méně prokvašené (ačkoliv *Rahnella* ze začátku urychluje kvašení) a má vyšší pH. Aroma a chuť piva poškozeného v průběhu kvašení činností bakterie *Rahnella* jsou popisovány jako ovocné, mléčné a sirnaté, což je dáno vyššími koncentracemi dimethylsulfidu, acetaldehydu, methylacetátu a diacetylů (Van Vuuren et al., 1980). Tak jako v případě *shimwellii* a *obesumbakterií* dochází k hromadění buněk v kvasnicích a poškození další várky piva (Hamze et al., 1991).

Rod *Citrobacter*

Bakterie rodu *Citrobacter* jsou rovné tyčky uspořádané jednotlivě nebo po dvou, většinou pohyblivé. Redukují dusičnany na dusitany. Velikost buněk se pohybuje v rozmezí 1,0 x 2,0–6,0 µm. Název *Citrobacter* je odvozen od typické vlastnosti tohoto rodu – využívání citrátu jako výhradního zdroje uhlíku většinou kmenů (Frederiksen, 2015).

Citrobacter rostou na běžných kultivačních půdách, kde vytváří hladké, mírně vypouklé, našedivělé kolonie s lesklým povrchem

the pitched wort. Citrate negative strains have been found in beer breweries (Van Vuuren et al., 1981). *C. freundii* and other species are commonly found in the intestinal tract and human and animal feces, soil, water, food and waste water. *Citrobacter* is isolated from clinical material as an opportunistic or secondary pathogen (Frederiksen, 2015).

Contamination of wort with *C. freundii* leads to faster fermentation, reduces yeast viability and damages the sensory profile of beer by increasing the concentration of lactate, succinate, isocitrate and dimethylsulfide in the final beer. *Citrobacter* is sensitive to ethanol and is viable only at the early stages of fermentation (Van Vuuren and Priest, 2003).

The genus *Klebsiella*

Bacteria of genus *Klebsiella* are nonmotile straight rods, arranged singly, in pairs or short chains. Cells are often surrounded by a capsule and can produce slimy colonies. Members of the genus reduce nitrates to nitrites and use a wide range of sugars and sugar alcohols. Cell size ranges from 0.3–1.0 × 0.6–6.0 μm. They grow on ordinary media in the form of dome-shaped, glistening colonies of varying degrees of “stickiness” or “slime” depending on the strain and composition of the medium. The optimum growth temperature is 30–35 °C. They do not grow at 10 °C. The genus *Klebsiella* is named after Edwin Klebs, a German microbiologist (Grimont and Grimont, 2015a).

Species of *Klebsiella* genus occur in human feces, mammalian mucosa, soil, water and plants. *Klebsiellas* are isolated from a variety of industries – food industry, textile industry, paper industry, etc. Some members can cause pneumonia in humans and, e.g., urinary tract infections (Grimont and Grimont, 2015a; Sedláček, 2007). Some species of *Klebsiella* genus were transferred to the new genus *Raoultella* (Drancourt et al., 2001).

K. oxytoca has been reported in brewery environment. In the fermented wort, *Klebsiella* species produce phenolic aroma and taste due to the formation of 4-vinylguaiacol. A considerable amount of dimethylsulfide passes into the finished beer from wort contaminated with *klebsiellas* (Van Vuuren and Priest, 2003).

The genus *Raoultella*

Bacteria of *Raoultella* genus were originally included in *Klebsiella* genus. A hallmark of the genus *Raoultella* is growth at 10 °C. They have been recovered from water, soil, plants and occasionally from clinical material. *Raoultella terrigena* (formerly *Klebsiella terrigena*) has been reported in brewery environment. The presence of *R. terrigena* in the fermented wort, as well as *K. oxytoca*, is associated with beer damage by a high concentration of 4-vinylguaiacol and dimethylsulfide. In addition, *R. terrigena* produces high concentration of acetoin and 2,3-butanediol (Blomquist et al., 1993; Drancourt et al., 2001; Sedláček, 2007).

The genus *Serratia*

Bacteria of *Serratia* genus are straight rods, usually motile by peritrichous flagella. They are facultatively anaerobic and reduce nitrates to nitrites. Cell size ranges from 0.5–0.8 × 0.9–2.0 μm. The optimum growth temperature is 30–37 °C. They grow on ordinary media and form opaque white colonies, some species have pink or red pigment.

At present, 18 species of the genus *Serratia* have been described. Its members have been reported in clinical material, soil, water, plant surface and in the intestinal tract of rodents and insects. *Serratia marcescens* is an opportunistic pathogen for hospitalized patients and can cause urinary infections. *Serratia* can pass into brewery environment by contaminated water. Their occurrence and activity are limited to the beginning of fermentation (Grimont and Grimont, 2015b; Sedláček, 2007).

The genus *Enterobacter*

Cells of the genus *Enterobacter* are straight rods, usually motile by peritrichous flagella. Its members are facultatively anaerobic, reduce nitrates to nitrites and ferment glucose and other saccharides for production of acids and gas. Cell size ranges from 0.6–1.0 × 1.2–3.0 μm. They are easy to grow on ordinary media and the optimum growth temperature is 30 °C. Most clinical strains grow at 37 °C (Grimont and Grimont, 2015c).

Enterobacteria are widely distributed in the environment, being found in both sweet water and wastewater, soil, plants, animal and human feces (Sedláček, 2007). More than 20 species have been described, some of them being opportunistic pathogens. Enterobac-

a ohraničenými okraji. Optimální růstová teplota je 37 °C (Frederiksen, 2015; Sedláček, 2007).

V současné době je popsáno 14 druhů rodu *Citrobacter*, z nichž druh *Citrobacter freundii* je nacházen jako občasná kontaminace zakvašené mladiny. V pivovarském prostředí byly identifikovány i tzv. citrát-negativní kmeny citrobakterů (Van Vuuren et al., 1981). *C. freundii* a ostatní druhy se běžně vyskytují ve střevním traktu a stolici člověka a zvířat, v půdě, ve vodě, v potravinách a odpadní vodě. Bývají izolovány z klinického materiálu jako oportunní nebo sekundární patogeny (Frederiksen, 2015).

Kontaminace mladiny bakteriemi *C. freundii* vede k urychlení kvašení, snížení životaschopnosti kvasinek a poškození sensorického profilu piva – produkovány jsou zvýšené koncentrace laktátu, sukcinátu, isocitrátu a dimethylsulfidu. Citrobakter je citlivý na ethanol a je tedy aktivní pouze v prvních fázích kvašení (Van Vuuren a Priest, 2003).

Rod *Klebsiella*

Klebsiely jsou nepohyblivé rovné tyčky, uspořádané jednotlivě, po dvou nebo v krátkých řetězích. Buňky bývají opouzdřené a kolonie mohou mít slizovitý vzhled. Redukují dusičnany na dusitany. Využívají celou řadu cukrů a cukerných alkoholů. Velikost buněk se pohybuje v rozmezí 0,3–1,0 × 0,6–6,0 μm. Rostou na běžných médiích ve formě vypouklých lesklých kolonií, jejichž „lepivost“ nebo „sliznatost“ je závislá na konkrétním kmeni a složení kultivačního média. Optimální růstová teplota je 30–35 °C, nerostou při 10 °C. Název rodu je odvozen od příjmení německého mikrobiologa Edwina Klebse (Grimont a Grimont, 2015a).

Rod *Klebsiella* zahrnuje druhy, které se vyskytují zejména ve stolici člověka, na sliznicích savců, v půdě, ve vodě, na rostlinách. Klebsiely jsou izolovány z rozmanitých průmyslových provozů – potravinářských, textilních, papírenských atd. Někteří zástupci mohou u člověka způsobovat pneumonie a např. infekce močových cest (Grimont a Grimont, 2015a; Sedláček, 2007). Některé druhy klebsiel byly přeřazeny do nového rodu *Raoultella* (Drancourt et al., 2001).

V pivovarském prostředí je nacházen druh *Klebsiella oxytoca*. Přítomnost těchto bakterií v zakvašené mladině je spojována s fenolickou vůní a chutí piva, což je dáno produkcí 4-vinylguajakolu. Z mladiny kontaminované klebsielami pak přechází do hotového piva i značné množství dimethylsulfidu (Van Vuuren a Priest, 2003).

Rod *Raoultella*

Bakterie rodu *Raoultella* byly původně řazeny do rodu *Klebsiella*. Charakteristickým znakem rodu *Raoultella* je schopnost růstu při teplotě 10 °C. Raoultely jsou izolovány z vody, půdy, rostlin, příležitostně i z klinického materiálu. V pivovarském prostředí se vyskytuje druh *Raoultella terrigena* (dříve *Klebsiella terrigena*), jehož přítomnost v zakvašené mladině stejně jako u druhu *K. oxytoca* souvisí s poškozením piva vysokými koncentracemi 4-vinylguajakolu a dimethylsulfidu. *R. terrigena* navíc produkuje vysoké koncentrace acetoinu a 2,3-butanediolu (Blomquist et al., 1993; Drancourt et al., 2001; Sedláček, 2007).

Rod *Serratia*

Bakterie rodu *Serratia* jsou rovné tyčky, které se většinou pohybují pomocí peritrichálních bičíků. Jsou fakultativně anaerobní, redukují dusičnany na dusitany. Velikost buněk se pohybuje v rozmezí 0,5–0,8 × 0,9–2,0 μm. Optimální teplota růstu je 30–37 °C. Na běžném živném agaru vytvářejí neprůhledné bílé kolonie, některé druhy mají růžový nebo červený pigment.

V současné době je popsáno 18 druhů rodu *Serratia*. Vyskytují se v klinickém materiálu, v půdě, ve vodě, na povrchu rostlin, ve střevním traktu hlodavců a hmyzu. *Serratia marcescens* je oportunním patogenem pro hospitalizované pacienty, může způsobovat infekce močových cest. Do prostředí pivovaru se seráče mohou dostat kontaminovanou vodou. Jejich výskyt a působení jsou však omezené na začátek fermentace (Grimont a Grimont, 2015b; Sedláček, 2007).

Rod *Enterobacter*

Rod *Enterobacter* jsou rovné tyčky, většinou se pohybující pomocí peritrichálních bičíků. Fakultativně anaerobní, redukují dusičnany na dusitany. Glukosu a další sacharidy fermentují za produkce kyseliny a plynů. Velikost buněk se pohybuje v rozmezí 0,6–1,0 × 1,2–3,0 μm. Snadno rostou na běžných médiích a optimální teplota růstu je 30 °C, většina klinických izolátů roste při 37 °C (Grimont a Grimont, 2015c).

Enterobaktery jsou velice rozšířené, nacházejí se ve sladké i odpadní vodě, v půdě, na rostlinách, ve zvířecích výkalech i lidské stolici (Sedláček, 2007). Je popsáno více než 20 druhů, z nichž některé

teria can pass to brewery environment by contaminated water. They can grow in the wort and at the beginning of the main fermentation. *Enterobacter cloacae* is harmful due to the production of phenolic substances and dimethylsulfide at the beginning of the main fermentation and due to the passage of substances into finished beer (Priest and Campbell, 2003).

3 CONCLUSIONS

Enterobacteria usually cannot grow in finished beer. However, their strains can grow and multiply in the early stage of the main fermentation and damage the final product by its metabolites. Their presence in the sample (water, wort, yeast, beer) indicates a reduced hygienic level of the beer brewing process

ACKNOWLEDGEMENTS

The results were obtained with the institutional support of the Ministry of Agriculture of the Czech Republic of a long-term conceptual RIBM development – Research of quality and processing of malting and brewing raw materials (RO1918) and were also supported by the Ministry of Education, Youth and Sports - Research sensory center in Prague, and Research and development brew house – Sustainability and development (LO1312).

REFERENCES / LITERATURA

- Blomquist, K., Nikkola, M., Lehtovaara, P., Suihko, M. L., Airaksinen, U., Stråby, K. B., Penttilä, M. E., 1993: Characterization of the genes of the 2,3-butanediol operons from *Klebsiella terrigena* and *Enterobacter aerogenes*. J. Bacteriol., 175: 1392–1404.
- Bokulich, N. A., Bamforth, C. W., 2013: The microbiology of malting and brewing. Microbiol. Mol. Biol. Rev., 77: 157–172.
- Boulton, C., Quain, D., 2001: Brewing yeast and fermentation. 1st edition, Blackwell Science Ltd., London, England. ISBN 978-140515268-6
- Brady, C., Hunter, G., Kirk, S., Arnold, D., Denman, S., 2014: *Rahnella victoriana* sp. nov., *Rahnella bruchi* sp. nov., *Rahnella woolbedingensis* sp. nov., classification of *Rahnella genomospecies* 2 and 3 as *Rahnella variigena* sp. nov. and *Rahnella inusitata* sp. nov., respectively and emended description of the genus *Rahnella*. Syst. Appl. Microbiol., 37(8): 545–52.
- Brenner, D. J., Farmer III, J. J., 2015: *Enterobacteriaceae*. In: Whitman, W. B., editor, Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. John Wiley & Sons, Inc., in association with Bergey's Manual Trust.
- Briggs, D. E., Boulton, C. A., Brookes, P. A., Stevens, R., 2004: Brewing: science and practice. Woodhead Publishing, Cambridge UK/CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 881 pp. ISBN 0-8493-2547-1
- Buňka, F., Budinský, P., Čechová, M., Drienovský, V., Pachlová, V., Matoulková, D., Kubáň, V., Buňková, L., 2012: Content of biogenic amines and polyamines in beers from the Czech Republic. J. Inst. Brew., 118: 213–216.
- Drancourt, M., Bollet, C., Carta, A., Rousselier, P., 2001: Phylogenetic analyses of *Klebsiella* species delineate *Klebsiella* and *Raoultella* gen. nov., with description of *Raoultella ornithinolytica* comb. nov., *Raoultella terrigena* comb. nov. and *Raoultella planticola* comb. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 51: 925–932.
- Farmer III, J. J., Brenner, D. J., 2015: *Obesumbacterium*. In: Whitman, W. B., editor, Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. John Wiley & Sons, Inc., in association with Bergey's Manual Trust.
- Frederiksen, W., 2015: *Citrobacter*. In: Whitman, W. B., editor, Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. John Wiley & Sons, Inc., in association with Bergey's Manual Trust.
- Gasarasi, G., Kelgtermans, M., Verstrepen, K.J., van Roy, J., Delvaux, F.R., Derdelinckx, G., 2003: Occurrence of biogenic amines in beer: causes and proposal remedies. Mschr. Brauwiss., 56: 58–63.
- Grimont, P. A. D., Grimont, F., 2015a: *Klebsiella*. In: Whitman, W. B., editor, Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. John Wiley & Sons, Inc., in association with Bergey's Manual Trust.
- Grimont, F., Grimont, P.A.D., 2015b: *Serratia*. In: Whitman, W. B., editor, Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. John Wiley & Sons, Inc., in association with Bergey's Manual Trust.
- Grimont, F., Grimont, P. A. D., 2015c: *Enterobacter*. In: Whitman, W. B., editor, Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bac-

ter. John Wiley & Sons, Inc., in association with Bergey's Manual Trust.

3 ZÁVĚR

Enterobakterie obvykle nemohou růst v hotovém pivo. Jsou však schopny růst a množit se v počátečním stádiu hlavního kvašení a poškozovat finální produkt svými metabolity. Jejich přítomnost ve vzorku (vody, mladiny, kvasnic, piva) indikuje sníženou hygienickou úroveň pivovarského provozu.

PODĚKOVÁNÍ

Výsledky byly získány s využitím institucionální podpory Ministerstva zemědělství ČR na dlouhodobý koncepční rozvoj VÚPS – Výzkum kvality a zpracování sladařských a pivovarských surovin (RO1918) a podpory Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy ČR - Výzkumné senzoričké centrum v Praze a Výzkumná a vývojová varna – udržitelnost a rozvoj (LO1312).

- Hamze, M., Mergaert, J., Van Vuuren, H. J. J., Gavini, F., Beji, A., Izard, D., Kersters, K., 1991: *Rahnella aquatilis*, a potential contaminant in lager beer breweries. Int. J. Food Microbiol., 13: 63–68.
- Hill, A. E., 2009: Microbiological stability of beer. In: Bamforth, C., Ed., Beer: A Quality Perspective, Academic Press, Cambridge, 163–184.
- Jespersen, L., Jakobsen, M., 1996: Specific spoilage organisms in breweries and laboratory media for their detection. Int. J. Food Microbiol., 33: 139–155.
- Kämpfer, P., 2015: *Rahnella*. In: Whitman, W. B., editor, Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. John Wiley & Sons, Inc., in association with Bergey's Manual Trust.
- Priest, F. G., Barker, M., 2010: Gram-negative bacteria associated with brewery yeasts: Reclassification of *Obesumbacterium proteus* Biogroup 2 as *Shimwellia pseudoproteus* gen. nov., sp. nov., and transfer of *Escherichia blattae* to *Shimwellia blattae* comb. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 60: 828–833.
- Priest, F. G., Campbell, I., 2003: Brewing Microbiology 3rd ed., Kluwer Academic/Plenum Publishers: New York. ISBN 978-030647288-6.
- Priest, F. G., Cowbourne, M.A., Hough, J.S., 1974: Wort enterobacteria – A review. J. Inst. Brew., 80: 342–356.
- Sedláček, I., 2007: Taxonomie prokaryot. 1. vydání, Masarykova univerzita, Brno.
- Shimwell, J. L., 1963: *Obesumbacterium* gen. nov. Brewers' Journal, 99, 759–760.
- Shimwell, J. L., 1964: *Obesumbacterium*, a new genus for the inclusion of "Flavobacterium proteus". J. Inst. Brew., 70: 247–248.
- Smith, N. A., 1994: Cambridge prize lecture nitrate reduction and nitrosation in brewing. J. Inst. Brew., 100: 347–355.
- Šavel, J., 1980: Mikrobiologická kontrola v pivovarech. SNTL, Praha.
- Vaughan, A., O'Sullivan, T., van Sinderen, D., 2005: Enhancing the microbiological stability of malt and beer—a review. J. Inst. Brew., 111: 355–371.
- van Vuuren, H. J. J., Priest, F.G., 2003: Gram-negative brewery bacteria. In: Priest, F. G. and Campbell, I., Eds., Brewing Microbiology, Springer US, 219–245.
- van Vuuren, H. J. J., Kersters, K., De Ley, J., Toerien, D. F., 1981: The identification of *Enterobacteriaceae* from breweries: Combined use and comparison of API 20E system, gel electrophoresis of proteins and gas chromatography of volatile metabolites. J. Appl. Bacteriol., 51: 51–65.
- van Vuuren, H. J. J., Cosser, K., Prior, B.A., 1980: Influence of *Enterobacter agglomerans* on beer flavour. J. Inst. Brew., 86: 31–33.
- Veger J., Baudišová D., 1996: Bakterie z čeledi *Enterobacteriaceae* ve vodním prostředí. Výzkum pro praxi, seš. 33, VÚV TGM Praha: 99.