

Stanovení laktobacilů a pediokoků na ztužených půdách

Ing. JAROSLAV HODAN, Ing. STANISLAV AUGUSTIN, Západočeské pivovary, n. p., Plzeň

(Referát přednesený na XIII. pivovarsko-sladařském semináři v Plzni 19. 11. 1970)

576.8.093 576.852.24

576.851.2

Problematika biologické trvanlivosti piva je úzce spojena s výskytem hlavních škůdců piva — bakterií mléčného kvašení — laktobacilů a pediokoků, které jsou především odpovědné za vznik biologického zákalu v pivě. V současné době, kdy se i u nás používá ostřejší filtrace piva, je značně omezen výskyt kvasinek ve filtrovaném pivě. Mikrobiologické změny v takovém pivě probíhají odlišně, než tomu bylo dříve po jednoduché filtraci filtrační hmotou, kdy do filtrovaného piva přecházelo daleko více kvasničných buněk. Kvasničná sedimentační předcházela vesměs zákalu; pomnožením kulturních kvasinek se oddálil nástup bakteriální infekce. Křemelinovou filtrací se sice zvyšuje celková trvanlivost piva, měřená počtem dnů do vzniku sedimentu nebo zákalu, avšak zákal bakteriálního původu zpravidla nastupuje dříve, než tomu bývalo za přítomnosti kvasinek; je intenzivnější a sediment se obvykle vůbec netvoří. Ztráta poživatelnosti piva má v těchto případech charakter náhlého zlomu.

Tato situace vyžaduje nový přístup v boji proti bakteriální kontaminaci piva i přehodnocení dosavadní metodiky zjišťování laktobacilů a pediokoků. Stávající metody využívají schopnosti příslušníků obou rodů pomnožovat se v pivě, které se k urychlení růstu upravuje. Používá se obvykle prokvašená sladina — tedy nechmelené pivo; přidává se kvasničná voda nebo kvasničný autolyzát apod.

Laktobacily se dobře pomnožují např. v pivě, upraveném aktivním uhlím eliminací většího podílu hořkých látek, nebo v nechmeleném pivě s přidáním kvasničné vody. Pediokoky se dobře inkubují ve sterilním nechmeleném pivě se škrobovým mazem a s obsahem alkoholu, doplněným na 6 %; nebo v amoniakální kvasničné vodě. Jiná metoda využívá kultivace v pasterovaném pivě, upraveném přidáním kvasničného autolyzátu. Vzorky se inkubují při 25 °C; pozitivní nález lze očekávat nejdříve

ve asi po 3 dnech inkubace. Důležitou zásadou je zachování anaerobních podmínek při inkubaci. Kulturní nádoby se plní téměř po okraj a vzduchotěsně se uzavírají.

Tyto metody slouží k důkazu přítomnosti mikroorganismů obou rodů. Jde tedy v podstatě o kvalitativní zkoušky; nedostatečná nebo téměř žádná kvantitativnost stanovení je jejich hlavním nedostatkem. Proto vznikaly pokusy o aplikaci plotnových inkubačních metod na zjištění počtu zárodků laktobacilů a pediokoků v objemové jednotce vzorku. Obtížnost problému spočívá v zajištění anaerobních podmínek při plotnové inkubaci, což zatěžuje metodiku značnou pracností a zdlouhavostí, a v složitosti živného média.

Pracovníci berlínského ústavu VLB, Wackerbauer a Emeis, přezkoušeli téměř 30 různých živných půd, než sestavili skladbu vhodných médií pro důkaz a zjištění počtu laktobacilů a pediokoků. Takové půdy mají zajistit selektivitu při optimálním růstu mikroorganismů, pro něž byly určeny. Je třeba potlačit růst gramnegativních bakterií, převážně koliformních a jiných mladinnových bakterií, čehož se dosahuje přidáním β -fenyletanolu, a kvasinek aktidionem.

Wackerbauer a Emeis vyvinuli dvě speciální média pro kultivaci bakterií, kalících pivo. Je to „VLB-L 41 agar“, určený pro laktobacily, a „VLB-S 7 agar“, určený pro pediokoky. V literatuře bylo popsáno složení i příprava „VLB-L 41 agaru“. Je to v podstatě upravená půda podle *Williamsona*. Přípravuje se takto:

Sladina (předek) se upraví na 10,0 % hmot. a prokvasí spodními kvasnicemi do konečného stupně prokvašení. Kvasnice se odfiltrují a filtrát se varem zahustí na poloviční objem. 500 ml takto zahusťšeného piva se doplní destilovanou vodou na

900 ml. Filtruje se křemelinovým filtrem a přidají se tyto složky:

kvasničný extrakt (Yeast Extract - Difco)	10 g
maltóza	5 g
xylóza	2,5 g
fruktóza	2,5 g
soubor aminokyselin (Amino acids - Difco)	10 g
jaterní extrakt (Liver Extract-Difco)	20 ml
agar	20 g
bromkresolová zeleň	0,02 g

Reakce média se upraví na pH 5,0 až 5,2; půda se doplní na 1000 ml a steriluje 15 min při 110 °C. Před rozléváním ploten se přidá 0,4 % β -fenyletanolu a 20 mg aktidionu na 1 litr substrátu.

Složení a přípravu „VLB - S 7 agaru“ pro kultivaci pediokoků se nám nepodařilo zjistit. Výzkumný ústav VLB je však sděluje za licenční poplatek 50, —DM.

Je zřejmé, že jde o dosti složité půdy s náročnější přípravou. Některé složky půd jsou v našich podmínkách obtížně dostupné. Oba druhy půd však vyrábí západoněmecká firma „Sartorius-Membranfilter“ v Göttingen. Půda se expeduje buď v infúzních lahvích, nebo již rozlitá v polystyrenových Petriho miskách průměru 9 cm, jež jsou baleny po 3 až 4 kusech v polyetylenových sáčcích v kryovakové úpravě, tj. s odsátím vzduchu. Na takto adjustované plotny dává firma Sartorius exspirační lhůtu 3 měsíce, uchovávají-li se v chladu (nejlépe při 4 až 6 °C) a temnu.

Firma Sartorius přikládá k půdám návod. Podle předpokládaného stupně infekce se vzorky buď membránově filtrují, nebo přímo očkují roztěrem na povrch živného agaru. Zaočkované Petriho misky se vloží do vakuového exsikátoru nebo do Nowyho zvonu. Je však účelné plotny vložit nejdříve do zavařovací sklenice typu „Weck“ — „vekovky“ obsahu 1 až 2 litry, a potom teprve do exsikátoru či zvonu. Po evakuaci se pak nemusí inkubovat celý exsikátor nebo zvon, ale jen „vekovka“ s plotnami. Do „vekovky“ se vloží lahvička s mladinou, zaočkovanou kvasnicemi, a kádinka s indikátorem anaerobních podmínek. Je to v podstatě Fildes-McIntoshův indikátor, založený na opětném modrání leukoformy roztoku metylenové modři vlivem stop kyslíku v nedokonalé anaerobním prostředí. Návod však opomíjí skutečnost, že je třeba ke směsi jednotlivých roztoků indikátoru (metylenová modř, glukóza, louh sodný) přidat prostředek k iniciaci redukce metylenové modři před vlastním použitím indikátoru, jako např. krystalek tymolu, s nímž se směsný roztok považí do proběhnutí redukce (do získání leukoformy). Takto upravený indikátor se hned použije. Použije-li se „vekovka“, uzavře se víkem, opatřeným gumovým těsnicím kroužkem. Exsikátor se evakuuje tak dlouho, až se indikátor beze zbytku odbarví, což signalizuje prostředí prakticky bez kyslíku. Exsikátor se může otevřít a „vekovka“ s plotnami z něho vyjmout, jelikož dobrý těsnicí kroužek udrží vakuum.

Inkubuje se při 25 °C po dobu 5 až 6 dní u VLB-L 41 agaru a asi 1 týden u VLB-S 7 agaru. Kvasinky v lahvičce s mladinou začnou během inkubace kva-

sit a zajišťují tak určité množství CO₂, potřebné pro vývoj mnohých anaerobních bakterií.

Jde-li o rychlý důkaz laktobacilů a pediokoků, nikoli o jejich množství, přeruší se inkubace po 2 až 3 dnech. Kolonie nejsou ještě zřetelné, ale je možno již provést mikroskopickou prohlídku ve stěru s povrchu živné půdy. Při negativním nálezu (jde-li o stopové nebo žádné množství), lze v inkubaci pokračovat další 4 dny, kdy se mají objevit již makroskopicky zjistitelné kolonie. Tolik tedy k firemnímu návodu.

Na základě pozorování, že vzdušní kyslík v malém množství stimuluje růst laktobacilů, je možno modifikovat původní metodu podle Emeise. Stimulující účinek kyslíku se projevuje pravděpodobně jen tehdy, následuje-li mikroaerobní stadium inkubace až po anaerobním stadiu, jež je nutné na začátku inkubace laktobacilů, kdy se nacházejí v lag-fázi. Proto je vhodné laktobacily inkubovat první 3 dny anaerobně. Poté se gumový uzávěr „vekovky“ vyjme a tím se zruší vakuum. Množství kyslíku, jež se do „vekovky“ dostane, nemůže být velké, jelikož vlivem kvašení mladinky je prostor „vekovky“ zaplněn CO₂. Indikátor se však zbarví modře. Difúze vzduchu do tohoto prostoru je relativně nízká; dostačuje však k jisté stimulaci růstu laktobacilů.

Při inkubační teplotě 30 °C se podaří důkaz laktobacilů škodlivých pivu po 3 až 7 dnech. V teplotním rozsahu 25 až 32 °C však nebyly zjištěny rozdíly v růstu, takže je možno inkubovat v tomto rozsahu teplot.

Narostlé kolonie je nutno blíže identifikovat mikroskopicky. Dále je vhodné přesvědčit se o grampozitivitě kolonií a provést katalázový test, který má být negativní. Nejprůkaznější metodou je však sérologický důkaz.

Emeis provedl zajímavý modelový pokus: sterilní pivo uměle infikoval různým, avšak známým počtem pediokoků. Hned po zaočkování piva byla zjištěna koncentrace živých pediokoků technikou membránové filtrace a inkubací na VLB-S 7 agaru. V paralelním pokusu byla zjišťována biologická trvanlivost různě infikovaných piv při 25 °C. Vzorky byly pozorovány po dobu čtyř týdnů. Zákal vzorků byl potom vyšetřen mikroskopicky. V tabulce je přehled výsledků:

spočítané množství pediokoků na 1/2 litr. láhev	kultivačně zjištěné množství pediokoků v 1/2 litr. láhvi	biologická trvanlivost dní
3	0	větší než 28 dní
30	16	16
300	181	14
3000	1300	11

Nižší výsledky kultivační metody spadají na vrub mrtvých nevyklíčených buněk a též tvorby shluků (každá kolonie nepocházela vždy z jedné buňky). Řádově jsou však výsledky v korelaci. Z odpovídajících si výsledků sledování trvanlivosti je patrné, že již malé množství pediokoků může být pivu nebezpečné. Tato závislost bude ovšem různá u jiných kmenů pediokoků v souvislosti s jejich virulencí.

V závěru této části je třeba se zmínit o půdě, zvané „Nakagawa - medium“, vyvinuté stejnojmenným pracovníkem centrální laboratoře pivovaru „Asahi“ v Tokiu. První údaje o této půdě pocházejí z r. 1964. Půda je určena k důkazu a stanovení pediokoků a laktobacilů. Růst gramnegativních tyčinkovitých bakterií, kvasinek a jiných rušících mikroorganismů má být na půdě potlačen. Substrát obsahuje kvasničný extrakt, hydrolyzovaný kasein, glukózu, acetát, minerální soli, kyselinu askorbovou, aktidion, redukční látku, resazurin jako indikátor redoxpotenciálu a agar.

Na základě vlastních šetření doporučuje Vědecká stanice pro pivovarství v Mnichově tuto půdu jako vhodnou pro praktickou provozní kontrolu. Půda se expeduje v práškovité formě.

Vlastní šetření

Závodní laboratoř Plzeňského Prazdroje obdržela od fy Sartorius menší množství ploten v kryovakovém balení s rozlitými půdami VLB-L 41 a VLB-S 7. Pokusy je třeba považovat za orientační, jelikož další množství obou půd se dosud nepodařilo zajistit.

Zaočkované půdy se inkubovaly ve vysokém vakuovém exsikátoru obsahu 1 litr, běžně u nás vyráběném pod katalogovým číslem 2112. Maximální náplň byla 12 misek průměru 9 cm (misky průměru 10 cm se do tohoto typu exsikátoru nevejdou). Na horní misku byla postavena kádinka s indikátorem anaerobních podmínek. Do baňky, bočně spojené zábrusem s vlastním exsikátorem, byl přidán alkalický pyrogallol. Evakuace exsikátoru rotační olejovou vývěvou se střídala s vpouštěním CO₂ z bomby přes trojcestný kohout, načež následovala opět evakuace. Zajištění anaerobních podmínek v exsikátoru, sledované Fildes-McIntoshovým indikátorem, bylo dosti obtížně dosažitelné. Inkubovalo se týden při 28 °C v atmosféře CO₂.

Obě živná média byla prozatím ověřována inkubací vzorků mladiny, mladého piva a stáčeného piva. Mladina se očkovala jednak po 0,5 ml roztěrem na plotnu, jednak se membránově filtrovalo 20 ml přes filtr typu HUF5. Mladé pivo se očkovalo přímým roztěrem. Stáčené pivo se zpracovalo jednak membránovou filtrací 20 ml vzorku filtrem typu HUF5, jednak přímým roztěrem.

Počet kolonií, vyrostlých na plotnách po týdenní inkubaci při 28 °C, ukázal, že koncentrování zá-

rodků laktobacilů a pediokoků membránovou filtrací bylo účelné pouze u stáčeného piva; u mladiny a mladého piva vyrostlo dosti kolonií po přímém zaočkování vzorku na plotnu v množství do 0,5 ml.

Narostlé kolonie byly identifikovány mikroskopicky (vždy několik zástupců od skupiny téhož makroskopického vzhledu). Kromě toho bylo sledováno vybarvení podle Grama a proveden katalázový test.

Z mladiny vyrostly na obou živných půdách kromě laktobacilů a pediokoků též krátké silnější tyčinky gramnegativních katalázopozitivních bakterií, rostoucích dobře na Endově agaru. Zřejmě šlo o kmeny rezistentní k β-fenyletanolu, na což autoři půd rovněž upozorňují.

Z mladého piva i ze stáčeného piva byly získány prakticky jen kolonie laktobacilů a pediokoků. Laktobacily vyrůstaly většinou ve formě světlejší zelených, matných až matně lesklých kolonií; pediokoky vytvářely většinou temně modrozelené kolonie s matným leskem. Pro určitou proměnlivost makroskopického vzhledu je vždy nutná mikroskopická identifikace.

Mikroskopování kolonií bylo potřebné též proto, že laktobacily často rostly i na půdě VLB-S 7, určené pro stanovení pediokoků, a naopak též pediokoky vytvářely kolonie i na VLB-L 41 agaru. Ukázalo se, že obě média nejsou pro oba jednotlivé rody dostatečně elektivní. Vzniká otázka, zda by se nedalo vystačit pouze s jednou univerzální půdou pro současné stanovení laktobacilů i pediokoků.

Je třeba si ovšem uvědomit, že pro hlubší ověření metodiky zjišťování laktobacilů a pediokoků na ztužených půdách bude v našich podmínkách třeba zpracovat větší množství vzorků, což je ovšem závislé na možnostech dovozu příslušných živných půd. Rozhodně však chceme v pokusech pokračovat. Zvláště zajímavé bylo vyšetřit možnosti předpovědi biologické trvanlivosti piva, prakticky neobsahujícího kvasinky, podle množství přítomných laktobacilů a pediokoků.

Literatura

- [1] WACKERBAUER, K. - EMEIS, C. C.: Monatsschrift f. Brauerei **20**, 1967: 160.
- [2] WACKERBAUER, K. - EMEIS, C. C.: Monatsschr. f. Brauerei **22**, 1969: 3.
- [3] EMEIS, C. C.: Monatsschr. f. Brauerei **22**, 1969: 8.
- [4] KLEBER, W. - SEIDL, P.: Brauwelt **110**, 1970: 574.
- [5] KLEBER, W. - SEIDL, P.: Brauwelt **110**, 1970: 1141.