

# Odstranění rušivého vlivu bakterií při stanovení kvasinek v pivovarských meziproduktech

663.45  
582.282.232

Ing. JAN ŠAVEL - ANDEĚLA ŘEŘICHOVÁ, Jihočeské pivovary, n. p., České Budějovice

Stanovení kvasinek v pivovarských meziproduktech i v stočeném pivě je důležitou metodou provozní kontroly v pivovarském průmyslu. Kultivaci na plotnách sladidového (mladinového) agaru nebo želatiny určíme podle počtu narostlých kolonií množství kvasinek v původním vzorku. Při nízkém obsahu kvasinek zachytíme buňky na membránovém filtru a přiložíme jej na plotnu živné půdy. K tomuto účelu vyrábí IMUNA, n. p., Šarišské Michalany sladidové živné podložky s přiloženým membránovým filtrem. Jimi lze nahradit agarové nebo želatinové půdy a tím rozbor urychlit. Při stanovení cizích kvasinek přidáváme do živné půdy kyselinu jódovou [Šilhánková 1962, a, b, Šavel 1970, Bendová a Kurzová 1972], nebo krystalovou violeť [Scherrer et al. 1969], které zabraňují růstu kulturních kvasinek.

Ve vzorcích z pivovarského provozu bývají kromě kvasinek často přítomny různé druhy bakterií. Mnohé z nich rostou na půdách používaných k stanovení kvasinek, potlačují jejich růst a znemožňují přesné odečítání počtu kvasničných kolonií. Proto je nutno jejich vliv eliminovat. Nejčastěji jsou zastoupeny koliformní bakterie, jinou závažnou kontaminací jsou bakterie mléčného kvašení.

Potlačení bakterií lze dosáhnout různými zásahy. Wackerbauer a Emeis (1967) zkoumali selektivní prostředky jako thaliumacetát, kyselinu sorbovou a  $\beta$ -fenyl-ethanol k zamezení růstu gramnegativních bakterií náležejících k rodům *Escherichia*, *Enterobacter* a *Obesumbacterium*. Účelem jejich práce však bylo odstranit rušivý vliv gramnegativních bakterií při stanovení mléčných bakterií.

Ke stejnému účelu lze použít i některá antibiotika. Přídavek polymyxinu do živné půdy zabrání růstu běžné pivovarské bakteriální kontaminace, nemá však vliv na

růst kvasinek. Tohoto poznatku bylo využito při odstraňování bakterií z piva a kvasnic [Case a Lyon 1956, Morris 1956, Kato a Nishikawa 1957, Zalicka a Nowakowska 1965]. Toto antibiotikum je však v ČSSR obtížně dostupné.

Jiný způsob odstranění bakterií ze směsi s kvasinkami je založen na filtraci membránovým filtrem, který zachytí kvasinky, ale propustí bakterie. Nobile (1967) použil metody dvojí filtrace pro souběžné stanovení bakterií a kvasinek. Při první filtraci se oddělí kvasinky na filtrech s póry velikosti  $1,2 \mu\text{m}$  a další filtrací na filtrech s póry  $0,22 \mu\text{m}$  se zachytí bakterie. Firma Sartorius vyrábí filtrační aparaturu umožňující provést obě filtrace současně [Dachs 1971].

V naší laboratoři jsme přezkoušeli obě metody zamezení rušivého vlivu bakterií při stanovení kvasinek. Abychom zpřístupnili tyto metody co největšímu počtu závodních laboratoří, použili jsme materiálu i antibiotik běžně dostupných v ČSSR.

V první sérii zkoušek jsme filtrovali různá piva obsahující kulturní i divoké kvasinky a běžnou bakteriální mikrofloru souběžně filtry SYNPOR 4, 5 a 6 s velikostí pórů  $0,85$ ,  $0,60$  a  $0,40 \mu\text{m}$  a filtry kultivovali na plotnách mladidového agaru. Na filtrech SYNPOR 5 a 6 vyrostlo po kultivaci kromě kvasinek také velké množství bakteriálních kontaminantů, které znemožňovaly přesné určení počtu kvasinek. Na filtrech SYNPOR 4 rostly většinou pouze kvasniční kolonie a v některých případech rovněž menší množství bakteriálních kolonií. Ve filtrátech z filtrů SYNPOR 4 a 5 jsme někdy prokázali velmi drobné cizí kvasinky, které pronikly těmito filtry.

Abychom si ověřili, do jaké míry je stanovení touto metodou spolehlivé, opakovali jsme všechna stanovení



na mladinovém agaru a na mladinovém agaru s přidavkem streptomycinu (viz dále), potlačujícího růst běžné bakteriální kontaminace. Vyhodnocením většího počtu vzorků jsme zjistili, že počet kvasinek, zachycených filtrací stejného vzorku na membránových filtrech s různou velikostí pórů byl stejný. V jednom případě vyrostlo na filtru SYNPOR 4 menší množství kvasničných kolonií ve srovnání s filtry SYNPOR 5 a 6. Proto jsme dále nezkoušeli filtry SYNPOR 3 s ještě většími póry. Pronikání malého množství drobných kvasinek do filtrátu ve většině případů výrazně neovlivnilo stanovení celkového počtu kvasinek.

V druhé sérii zkoušek jsme k odstranění rušivého vlivu bakterií použili síranu streptomycinu. Antibiotikum streptomycin inhibuje růst většiny gramnegativních a některých grampozitivních bakterií. Na plotny mladinového agaru s přidavkem 10–100 µg/ml síranu streptomycinu, (dále jen streptomycinu) odstupňovaným po 10 µg/ml, jsme pipetovali vzorky pivovarských meziproduktů jako infikované mladiny, piva aj. Vzorky čerstvě stočeného piva jsme předem filtrovali membránovým filtrem SYNPOR 6, zachycujícím spolehlivě veškeré kvasinky. Pro srovnání jsme stejné vzorky očkovali na plotny mladinového agaru bez přidavku streptomycinu.

Bakteriální kontaminace narostlá na plotnách mladinového agaru často znemožňovala odečítání kvasničných kolonií. Naproti tomu na plotnách s přidavkem streptomycinu s koncentrací vyšší než 50 µg/ml, byly ve většině případů inhibovány veškeré bakterie. V ojedinělých případech vyrostlo na těchto plotnách malé množství bakteriálních kolonií, které však neznemožňovaly odečtení počtu kvasničných kolonií. Úplného odstranění bakteriálních kolonií jsme dosáhli aplikací běžně používané dávky streptomycinu a 100 µg/ml V-penicilinu (Spofa, 200 000 j/0,25 g) do živné půdy.

Počet kvasinek narostlých na plotnách s různým množstvím streptomycinu byl prakticky stejný. Z toho je zřejmé, že streptomycin nemá vliv na růst kvasinek. Tento závěr jsme si potvrdili souběžným očkovaním čistých kmenů kvasinek na plotny mladinového agaru s přidavkem streptomycinu. Také v tomto případě byl počet kvasničných kolonií narostlých na půdě se streptomycinem stejný jako na půdě s mladinovým agarem.

Streptomycin lze aplikovat i při stanovení kvasinek na sladinných živných podložkách IMUNA. K navlhčení podložek použijeme 3–4 ml roztoku streptomycinu (50 až 100 µg/ml) v sterilní vodě a dále postupujeme jako obvykle.

Přídavek streptomycinu se osvědčil i při stanovení cizích kvasinek na půdě s krystalovou violetí. Také v tomto případě umožňoval streptomycin dobré odečítání kvasničných kolonií při kultivaci vzorků, pipetovaných přímo na indikační půdu nebo po zachycení kvasinek membránovým filtrem. Do půdy s kyselinou jódoctovou není nutné antibiotikum přidávat, neboť většina bakterií na této půdě neroste. Je zajímavé, že přídavek streptomycinu do půdy s fuchsinsířčitou směsí k průkazu cizích kvasinek (Brenner et al. 1970) měl jen omezený účinek.

Na základě těchto výsledků doporučujeme při stanovení kvasinek na mladinovém nebo sladinném agaru přidávat streptomycin. Roztok streptomycinu asepticky připravíme ve sterilní vodě a malé množství roztoku (asi 1 ml/100 ml půdy) pipetujeme před rozléváním do roztavené půdy, ochlazené na 40 °C. Koncentraci vodního roztoku volíme tak, aby výsledná koncentrace streptomycinu v půdě byla 50 µg/ml. Při nalévání malého množství do misek je výhodné pipetovat roztok streptomycinu přímo na misky a přelévát jej rozehřátou půdou. Penicilin přidáme jen v ojedinělých případech. Vzorky s větším obsahem kvasinek předem ředíme na

vhodnou koncentraci a suspenzi pipetujeme přímo na půdu se streptomycinem, vzorky s nízkým obsahem kvasinek (pivo) přefiltrujeme membránovým filtrem SYNPOR 6, který přiložíme na půdu s přidavkem streptomycinu.

#### Literatura

- BENDOŮVÁ, O. - KURZOVÁ, V. Kvasný prům. 18, 1972, s. 77–78.  
BRENNER, M. W. - KARSPÍČEK, M. - STERN, H. - HSU, W. P. Proc. ASBC, 1970, s. 79–89.  
CASE, A. C. - LYON, A. I. L. J. Inst. Brew. 62, 1953, s. 477–485.  
DACIS, E. Brauwelt, 111, 1971, s. 1782–1786.  
KATO, S. - NISHIKAWA, N. Bull. Brew. Sci. 3, 1957, s. 52–53.  
MORRIS, E. O. J. Inst. Brew. 62, 1953, s. 403–411.  
NOBILE, J. Appl. Microb. 15, 1957, s. 732–737.  
SCHERRER, A. - SOMMER, A. - PFENNINGER, H. Brauwiss. 22, 1969, s. 151–195.  
ŠAVEL, J. Kvasný prům. 16, 1970, s. 60–65.  
ŠILHANKOVÁ, L. Folia Microbiol. 7, 1932, s. 255–259.  
ŠILHANKOVÁ, L. Kvasný prům. 8, 1962 b, s. 175–181.  
WACKERBAUER, K. - EMEIS, C. C. Monatschr. Brauerei 20, 1937, s. 106–134.  
ZALICKÁ, B. - NOWAKOWSKA, A. Roczn. technol. e chem. zywn. 11, 1935, s. 159–73, ref. Ž. Biol. 1936, 6B 490.

Šavel, J. - Řeřichová, A.: Odstranění rušivého vlivu bakterií při stanovení kvasinek v pivovarských meziproduktech. Kvas. prům., 19, 1973, č. 7, s. 145–147.

Stanovení kvasinek v pive a pivovarských meziproduktech je často rušeno přítomností bakterií, které po kultivaci znemožňují odečítání kvasničných kolonií. Zamezení tohoto rušivého vlivu se dosáhne dvojím způsobem; filtrací filtrem SYNPOR 4, který propustí bakterie, ale zachytí kvasinky nebo přidavkem streptomycinu (50 až 100 µg/ml), popř. jeho kombinace s penicilinem (100 µg/ml) do živné půdy. Pro provozní praxi se doporučuje přídavek streptomycinu do půd pro stanovení kulturních i divokých kvasinek. Popsané metody využívají materiálů i látek běžně dostupných v ČSSR.

Шавел, Я.: — Ржержихова, А.: Нейтрализация нарушающего влияния присутствия бактерий при определении дрожжей в пивоваренных промпродуктах. Квас. прум. 19, 1973, № 7, 145–147.

При определении дрожжей в пиве и промежуточных продуктах пивоварения правильный анализ часто затрудняет присутствие разных бактерий, влияющих неблагоприятно на точность оценки колоний дрожжей после их культивации в соответствующей среде. Для исключения вредного влияния присутствия бактерий применяются два разных метода. Первый заключается в фильтрации с помощью фильтра СИНПОР 4, пропускающего бактерии, задерживающего, однако, дрожжи. Другим методом является добавка стрептомицина в питательную среду в количестве 50–100 γ/мл. Возможно также комбинировать стрептомицин с пенициллином (100 γ/мл). Для анализов в производственных условиях, направленных на определение культурных и диких дрожжей, рекомендуется применение стрептомицина в среде. Нужные для анализа химикаты и также фильтры выпускаются чехословацкой химической промышленностью.

Šavel, J. - Řeřichová, A.: Eliminating Disturbing Effects of the Presence of Bacteria Upon the Determination of Yeast in Brewing Semiproductions. Kvas. prům. 19, 1973, No. 7, 145–147.

The presence of bacteria in beer and brewing semiproductions affects unfavourably the determination of yeast, since after cultivation in appropriate media it is difficult to identify correctly the colonies of yeast. Two methods are used to eliminate the disturbing effects caused by bacteria. One of them is filtration through a SYNPOR 4 filter. Bacteria can pass through the filter while yeast is trapped. The other is based upon the effects of streptomycin added to medium (50–100 γ/ml). Streptomycin may be combined with penicillin (100 γ/ml). The streptomycin method can be recommended for



routine analyses which are carried out to identify culture and wild yeast. Both mentioned antibiotics and filters are available in Czechoslovakia and described methods are here used.

**Šavel, J. - Řeřichová, A.: Beseitigung des störenden Einflusses der Bakterien bei der Bestimmung der Hefen in Brauereien.** Kvas. prům. 19, No. 7, S. 145—147.

Die Bestimmung der Hefen in Bier und Brauerei-Zwischenprodukten wird oft durch die Anwesenheit von Bakterien gestört, die nach der Kultivation die Abzählung

der Hefekolonien unmöglich machen. Dieser störende Einfluss kann durch zwei Eingriffe beseitigt werden, und zwar entweder durch Filtration über das Filter SYNPOR 4, das die Bakterien durchlässt, die Hefen aber auffängt, oder durch Zugabe von Streptomycin (50—100  $\gamma$ /ml), bzw. in Kombination mit Penicillin (100  $\gamma$ /ml) zu dem Nährboden. Für die Betriebspraxis wird die Zugabe von Streptomycin zu den Nährböden für die Bestimmung der Kultur- und wilden Hefen empfohlen. Die beschriebenen Methoden benötigen keine Substanzen oder Materiale, die in der ČSSR nicht laufend erreichbar wären.