

# Vliv solí Zn, Cd a Hg na růst mléčných bakterií

576.852.24: 546.47/.49-38  
663.41: 576.8

Ing. JAN ŠAVEL - Ing. MARIE PROKOPOVÁ, Jihočeské pivovary, n. p., České Budějovice

## ÚVOD

Ačkoliv mnoho prací v pivovarské literatuře se zabývá obsahem různých kovů v pivě, metodami jejich průkazu a vlivem na koloidní stabilitu, existuje pouze malý počet prací o vlivu kovů na růst pivovarských mikroorganismů.

Některé kovy mohou růst těchto mikroorganismů podporovat, jiné působí v opačném smyslu. Lüers (1950) přehledně referuje o vlivu solí různých kovů na růst pivovarských kvasnic. Uhl a Kühbeck (1969) se zmiňují o vlivu Mn a Mg na růst mléčných bakterií. Nagai et al. (1961) podrobně diskutují indukci mutantů pivovarských i pekařských kvasinek solemi těžkých kovů.

Přídavků solí některých kovů k živným půdám se používá k rozlišení různých skupin pivovarských kontaminantů. Wackerbauer a Emeis (1967) zkoušeli octan thalný k potlačení gramnegativních bakterií při stanovení mléčných bakterií, Nagai (1965) použil teluricitanu sodného k rozlišení respiračně-deficientních mutantů od ostatních kvasničných buněk.

Naše práce se zabývá účinkem solí Cd, Zn a Hg na mléčné bakterie, které se často vyskytují v pivě.

## MATERIÁL A METODY

Kmeny bakterií. *Lactobacillus brevis* CCM 1815, *Lactobacillus buchneri* CCM 1819, *Lactobacillus casei* CCM 1828, *Lactobacillus plantarum* CCM 1904, *Pediococcus cerevisiae* CCM 835, vlastní izoláty laktobacilů (L 21, L 26, L 33, L 36) a pediokoků ( $P_1$ ,  $P_2$ ,  $P_3$ ,  $P_7$ ,  $P_8$ ,  $P_{10}$ ) z piva. Všechny uvedené kmeny se po zaočkování do pasterovaného piva a kultivaci pomnožovaly za tvorby sedimentu a zákalu.

## Základní půda pro kultivaci laktobacilů a pediokoků (B-)

Sladina (předek) zředěná na 10 % hm se po sterilaci v autoklávu (1,1 at/15 min) a ochlazení zakvasila čistým kmenem pivovarských kvasinek. Po prokvašení (5 až 6 dnů při 20 °C) se mladé pivo zfiltrovalo s přídavkem křemeliny a po rozpuštění dalších složek se půda sterilovala v autoklávu při 1,1 at 15 min. Půda B- obsahuje:

prokvašená sladina	1 000 ml	$\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$	5 g
živný bujón č. 2*)	15 g	$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,3 g
kvasiční autolyzát*)	5 g	$\text{MnSO}_4 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	0,04 g
(sušený)			
kaseinový hydrolyzát*)	5 g		
(enzymový)			
kyselina askorbová	1 g	Twen 80	1 ml
kyselina citrónová	1,7 g	aktidion	25 mg
hydroxid amonný 25 %	0,7 ml	agar	15 g
fruktóza	5 g	pH před sterilací	5,8
glukóza	1 g	sterilizace v autoklávu	1,1 at/15 min.

\*) výrobek Imuny, n. p., Šarišské Michalany

Při přípravě tekuté půdy B- se vynechá agar.

## Živná půda s přídavkem kademnatých, zinečnatých a rtuťnatých solí

Před rozléváním na misky se k půdám ochlazeným na 50 °C přidávaly sterilní roztoky solí Cd, Zn a Hg v takovém množství, aby se dosáhlo požadované koncentrace.

## Disková metoda stanovení citlivosti kmenů

Na plotny půdy B- zaočkované suspenzí zkoušených kmenů se kladly disky z chromatografického papíru Whatman č. 3 (d = 16 mm), které se napojily zkoušený-



mi roztoky [0,05 ml]. Po kultivaci se odečítal průměr inhibičních zón.

### Kultivace

Není-li uvedeno jinak, zaočkovány půdy se kultivovaly 5–6 dní při 28 °C v atmosféře CO<sub>2</sub>. Před každým pokusem se mléčné bakterie pomnožovaly v tekuté půdě B<sup>-</sup> (5 dní, 28 °C).

### Chemikálie

CdCl<sub>2</sub> · 2,5 H<sub>2</sub>O, CdSO<sub>4</sub> · 8 H<sub>2</sub>O, Cd (CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub> · 2 H<sub>2</sub>O, ZnCl<sub>2</sub>, ZnSO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O, Zn (CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub> · 2 H<sub>2</sub>O, HgCl<sub>2</sub>, Hg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> · 2 H<sub>2</sub>O byly čistoty p. a.

### Výsledky pokusů

#### a) Inhibice růstu mléčných bakterií solemi Cd, Zn, Hg

Citlivost různých kmenů laktobacilů a pediokoků k různým solím Cd, Zn, Hg se hodnotila diskovou metodou. Protože některé soli potlačovaly růst bakterií pouze částečně, jsou výsledky shrnuty do dvou tabulek. Tabulka 1 dává průměry zón úplné inhibice růstu, tabulka 2 průměry zón, v nichž byl růst zřetelně slabší.

Tabulka 1. Průměry zón úplné inhibice mléčných bakterií solemi Cd, Zn, Hg

Roztok soli	Průměr zóny (mm)											
	L. brevis	L. buchneri	L. casei	L. plantarum	L. 21	L. 26	L. 33	L. 36	P. cerevisiae	P. 1	P. 2	P. 3
1% CdCl <sub>2</sub> · 2,5 H <sub>2</sub> O	22	26	30	30	0	0	0	0	45	60	59	55
1% CdSO <sub>4</sub> · 8 H <sub>2</sub> O	22	30	29	29	0	0	0	0	44	62	70	53
1% Cd (CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	21	30	26	26	0	0	0	0	42	60	62	41
10 % Zn Cl <sub>2</sub>	29	36	32	32	25	25	23	53	61	62	48	45
10 % Zn SO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0	19	0	0	0	0	0	0	0	30	20	0
10% Zn (CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	0	17	0	0	0	0	0	0	0	20	22	18
1 % Hg Cl <sub>2</sub>	28	35	36	26	35	39	40	38	31	48	34	36
1 % Hg (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	24	33	32	22	30	35	33	32	27	42	30	29

Znak 0 znamená částečné potlačení růstu, znak 0 neovlivněný růst.

Tabulka 2. Průměry zón částečné inhibice mléčných bakterií solemi Cd, Zn, Hg

Roztok soli	Průměr zóny (mm)											
	L. brevis	L. buchneri	L. casei	L. plantarum	L. 21	L. 26	L. 33	L. 36	P. cerevisiae	P. 1	P. 2	P. 3
1% CdCl <sub>2</sub> · 2,5 H <sub>2</sub> O	30	u	35	u	32	0	32	0	u	u	u	u
1 % CdSO <sub>4</sub> · 8 H <sub>2</sub> O	30	u	32	u	30	0	30	0	u	u	u	u
1% Cd (CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	30	u	30	32	32	0	30	0	u	u	u	u
10 % Zn Cl <sub>2</sub>	35	42	38	u	38	u	33	30	u	u	u	u
10% Zn SO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0	u	19	0	0	0	0	0	0	37	27	u
10% Zn (CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	0	u	0	0	0	0	0	0	0	35	25	u
1 % Hg Cl <sub>2</sub>	u	43	43	30	u	u	u	u	u	u	38	41
1% Hg (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	u	36	37	29	u	u	u	u	u	u	32	36

Znak 0 znamená neovlivněný růst, znak u zónu s úplnou inhibicí

#### b) Stanovení minimální inhibiční koncentrace solí Cd a Zn na půdě B<sup>-</sup> ztužené agarem

Na plotny půdy B<sup>-</sup> s přídavkem vybraných solí Zn a Cd se očkovací jehlou očkávaly kmeny mléčných bakterií. Po kultivaci se hodnotila intenzita růstu počtem křížků v porovnání s růstem na půdě B<sup>-</sup> bez přídavku solí (max. růst = + + + +). Růst mléčných bakterií na půdě s chloridem kadernatým uvádí tabulka 3, v tabulce 4 jsou souhrnně uvedeny nejnížší koncentrace solí, které potlačují úplně růst zkoušených kmenů. Na půdě B<sup>-</sup> bez přídavku chloridu kadernatého rostly všechny kmeny velmi dobře.

#### c) Vliv chloridu kadernatého na růst mléčných bakterií v tekuté půdě B<sup>-</sup>

Zkumavky s tekutou půdou B<sup>-</sup> s různým množstvím chloridu kadernatého se zaočkovaly 1 kapkou suspenze zkoušených kmenů, předpěstovaných v půdě B<sup>-</sup>. Po kultivaci se hodnotila intenzita růstu počtem křížků v porovnání s růstem v půdě bez chloridu kadernatého (max. růst = + + + +). Tabulka 5 udává výsledky vlivu chloridu kadernatého na růst nejcitlivějších kmenů zkoušených laktobacilů a pediokoků a kmenů nejméně citlivých k CdCl<sub>2</sub>. Tyto kmeny byly vybrány podle pokusů s inhibicí růstu mléčných bakterií chloridem kadernatým v pevné půdě.

Tabulka 3. Růst mléčných bakterií na ztužené půdě B<sup>-</sup> s různým obsahem CdCl<sub>2</sub>

Kmen	Množství CdCl <sub>2</sub> · 2,5 H <sub>2</sub> O v 1 l půdy (mg/l)							
	800	400	200	100	50	25	12,5	6,25
L. brevis	—	—	—	++	+++	+++	+++	+++
L. buchneri	—	—	—	++	+++	+++	+++	+++
L. casei	—	—	+	+++	+++	+++	+++	+++
L. plantarum	—	—	—	++	+++	+++	+++	+++
L. 21	—	+	++	+++	+++	+++	+++	+++
L. 26	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
L. 33	—	—	+	++	+++	+++	+++	+++
L. 36	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
P. cerevisiae	—	—	—	—	—	+	+++	+++
P. 1	—	—	—	—	—	—	—	+++
P. 2	—	—	—	—	—	—	—	—
P. 3	—	—	—	—	—	—	—	—
P. 7	—	—	—	—	+	+++	+++	+++
P. 8	—	—	—	—	+++	+++	+++	+++
P. 10	—	—	—	—	—	—	—	—

Tabulka 4. Minimální inhibiční koncentrace solí CdCl<sub>2</sub>, ZnCl<sub>2</sub> a ZnSO<sub>4</sub> v ztužené půdě B<sup>-</sup>

Sloučenina	CdCl <sub>2</sub> · 2,5 H <sub>2</sub> O	ZnCl <sub>2</sub>	ZnSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O
L. brevis	200	6 400	12 800
L. buchneri	200	6 400	12 800
L. casei	400	12 800	12 800
L. plantarum	200	12 800	25 600
L. 21	800	6 400	12 800
L. 26	1 400*	6 400	25 600
L. 33	400	6 400	25 600
L. 36	1 000	6 400	25 600
P. cerevisiae	50	3 200	25 600
P. 1	25	3 200	25 600
P. 2	3*	400	1 600
P. 3	1,6*	400	12 800
P. 7	100	6 400	800
P. 8	100	6 400	25 600
P. 10	3*	400	800

\*) stanoveno v dalších pokusech

Tabulka 5. Růst mléčných bakterií v tekuté půdě B<sup>-</sup> s různým obsahem CdCl<sub>2</sub>

Kmen	Množství Cd Cl <sub>2</sub> · 2,5 H <sub>2</sub> O v 1 l půdy (mg/l)							
	800	400	200	100	50	25	12,5	6,25
L. plantarum	(+)	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
L. 26	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
P. 8	(+)	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
P. 10	—	—	(+)	+	++	++	++	++

### DISKUSE

Provedené pokusy prokázaly inhibiční efekt solí Cd, Zn a Hg na růst mléčných bakterií. Podle výsledků diskové metody závisel inhibiční efekt na použitém kmenu mléčných bakterií a v menší míře také na druhu aniontu v soli příslušného kovu. Účinnost solí klesala v řadě Hg ≥ Cd > Zn. Soli Hg byly účinnější v inhibici laktobacilů než Cd, u pediokoků tomu bylo naopak. Soli Cd a Zn se lišily inhibičním účinkem na laktobacily a pedioky. Tyto soli potlačovaly více růst pediokoků než laktobacilů. Tento efekt se nepodařilo prokázat u solí rtuti.

Stanovení minimálních inhibičních koncentrací solí Zn a Cd v pevné půdě potvrdilo výsledky nalezené diskovou metodou. Např. všech 8 kmenů laktobacilů rostlo dobře na půdě s obsahem 100 mg CdCl<sub>2</sub> · 2,5 H<sub>2</sub>O v 1 l půdy, ale



jen jeden kmen pediokoků ze sedmi rostl dobře na půdě s obsahem 50 mg této soli v 1 l půdy, 2 kmeny pediokoků nerostly na půdě s obsahem 3 mg/l chloridu kadernatého a jeden na půdě s obsahem 1,6 mg/l.

Podobné výsledky se získaly i při kultivaci v tekuté půdě. Také zde potlačoval chlorid kadernatý více pediokoky než laktobacily, ačkoliv k potlačení růstu v tekuté půdě bylo zapotřebí vyšší koncentrace než v pevné půdě. Lze předpokládat, že působení Cd a Zn bude záviset na přítomnosti jiných iontů v živném prostředí. McLeod a Snell (1950) referovali o toxickém působení Zn na *L-arobinosu*. Tento vliv se mohl zrušit přidávkou solí manganu, hořčíku, vápníku a stroncia. Reddish (1957) uvádí, že toxický vliv Zn a Cd na různé mikroorganismy se významně snížil v přítomnosti vyššího množství hořčíku.

Vlivem iontů Mn a Mg na toxicitu Cd se zabývá další naše sdělení.

## Literatura

- [1] LÜERS, H.: Die wissenschaftlichen Grundlagen von Mälzerei und Brauerei, s. 664 — 665. Verlag Hans Carl, Nürnberg, 1950
- [2] Mac LEOD, R. A., SNELL, E. E.: J. Bact. **59**, 1950, s. 783 — 792
- [3] NAGAI, S.: J. Bact. **90**, 1965, s. 220 — 222
- [4] NAGAI, S., YANAGISHIME, N., NAGAI, H.: Bacteriol. Rev. **25**, 1961, s. 404 — 426
- [5] REDDISH, G. F.: Antiseptics, Disinfectants, Fungicides and Sterilization. 2 vydání, Philadelphia, 1957, s. 311
- [6] WACKBAUER, K. — EMEIS, C. C.: Mschr. f. Brauerei **20**, 1967, s. 160 — 164
- [7] UHL, A. — KÜHLBECK, G.: Brauwiss. **22**, 1969, s. 121 — 129, 199 — 208, 248 — 254

**Šavel, J. - Prokopová, M.: Vliv solí Zn, Cd a Hg na růst mléčných bakterií.** Kvas. prům., **20**, 1974, č. 12, s. 265 až 267.

Zkoumal se vliv solí Cd, Zn, Hg na růst 8 kmenů laktobacilů a 7 kmenů pediokoků ze sbírkových kultur i izolovaných z piva. Inhibiční účinek klesal v řadě  $Hg \geq Cd > Zn$ . Soli Cd a Zn potlačovaly více růst pediokoků než laktobacilů. Minimální inhibiční koncentrace chloridu kadernatého ( $CdCl_2 \cdot 2,5 H_2O$ ) v pevné půdě připravené k prokvašení sladiny a dalších látek se pohybovaly v rozmezí 200—1400 mg/l pro laktobacily a 1,6—100 mg/l pro pediokoky. Soli Zn působily podobně, ale k inhibici bylo zapotřebí řádově vyšších koncentrací. Soli rtuti potlačovaly růst laktobacilů i pediokoků ve stejném rozsahu.

**Шавель, Я. — Проконова, М.: Влияние солей цинка, кадмия и ртути на размножение молочных бактерий** Квас. прум. **20**, 1974, № 12, стр. 265—267.

Авторы изучали экспериментально влияние солей кадмия, цинка и ртути на размножение восьми штаммов молочных бактерий и семи штаммов педиококков. Некоторые из подвергнутых испытанию штаммов были взяты из коллекций, другие были изолированы из пива.

## Používání dovezeného kvasného lihu náhradou za syntetický

Socialistické organizace a výrobní podniky, které zpracovávaly nebo používaly syntetický lih nebo hydrogenačně rafinovaný syntetický lih a budou požadovat jako náhradní surovinu dovezený rafinovaný kvasný lih, musí zachovávat při jeho zpracování nebo jiném použití předpisy o kontrole výroby a oběhu lihu (rozhodnutí min. financí ČSR 152/1972/74, z 28. 8. 1974). Jsou to zejména ustanovení vyhlášky federálního ministerstva financí č. 17/1972 Sb. a Sazebníku daně z obrátu platného od 1. 1. 1974 jako ustanovení o uskladnění, evidenci, prově-

Podávající působení uvedených prvků lze vyjádřit v následujícím pořadí:  $Hg \geq Cd > Zn$ . Soli kadernia a cinka potlačovaly více růst pediokoků než mléčných bakterií. Minimální koncentrace chloridu kadernia ( $CdCl_2 \cdot 2,5 H_2O$ ) potřebná pro zajištění potlačujícího působení v tvrdé potravní prostředí, připravené ze srovnatelného sušiny a různých přísad, byla pro mléčné bakterie v rozmezí od 200 do 1400 mg/l, a pro pediokokky v rozmezí od 1,6 do 100 mg/l. Analogicky působily soli cinka, jejich koncentrace byla, avšak na řádově vyšší. Soli rtuti působí stejně na mléčné bakterie i pediokoky.

**Šavel, J. - Prokopová, M.: Effects of Zn, Cd and Hg Salts Upon the Propagation of Lactic Bacteria.** Kvas. prům. **20**, 1974, No. 12, pp. 265—267.

The authors have carried out a series of experiments to study the effects of Zn, Cd and Hg salts upon the growth of eight strains of lactobacilli and seven strains of pediococci. Strains used in experiments have been taken partly from collections and partly isolated from beer. The inhibiting effects diminish in the following sequence:  $Hg \geq Cd > Zn$ . Salts of Cd and Zn suppress the growth of pediococci more effectively than that of lactobacilli. Minimum inhibiting concentration of cadmium chloride ( $CdCl_2 \cdot 2,5 H_2O$ ) in solid medium prepared from fermented wort and other substances is 200—1400 mg/l for lactobacilli and 1,6—200 mg/l for pediococci. Salts of Zn have similar effects, but for the same inhibiting efficiency their concentration must be substantially higher. Hg salts suppress the growth of lactobacilli with the same intensity as that of pediococci.

**Šavel, J. - Prokopová, M.: Einfluss der Zn-, Cd- und Mg-Salze auf das Wachstum der Milchsäurebakterien.** Kvas. prům., **20**, 1974, No. 12, S. 265—267.

Es wurde der Einfluss der Zn-, Cd- und Hg-Salze auf das Wachstum von 8 Lactobazillen- und 7 Pediokokkenstämmen aus Sammlungskulturen, die aus Bier isoliert wurden, verfolgt. Die Inhibitionswirkung sank in der Reihe  $Hg \geq Cd > Zn$  ab. Die Cd- und Zn-Salze hemmten das Wachstum der Pediokokken stärker als der Lactobazillen. Die minimale Inhibitionskonzentration des Kadmiumdichlorids ( $CdCl_2 \cdot 2,5 H_2O$ ) im festen Boden, der zur Vergärung von Würze und anderen Substanzen zubereitet wurde, bewegte sich im Bereich von 200 bis 1400 mg/l für Lactobazillen und 1,6 bis 100 mg/l für Pediokokken. Die Zn-Salze wirkten in der gleichen Richtung; zur Inhibition waren jedoch stellenmässig höhere Konzentrationen notwendig. Die Hg-Salze hemmten das Wachstum der Lactobazillen sowie auch Pediokokken im gleichen Ausmass.

řování plnění lihu, o výdeji do výroby, o oznamovací povinnosti, prodeji lihu a spolupráci s finanční správou.

Pokud nejde o povolené používání čistého lihu za ceny bez daně z obrátu, musí být lih denaturován prostředky a v poměru míšení podle přílohy 1 k ČSN 66 0860 nebo podle zvláštního povolení ministerstva zemědělství a výživy republik v dohodě s ministerstvem financí a zdravotnictví republik.

Podle § 7 odst. 5 vyhlášky federálního ministerstva financí č. 17/1972 Sb., mohou krajské finanční správy povolit denaturaci u odběratele.

Sigmund