

8

srpen 1975

ročník 21

Kvasný průmysl

ODBORNÝ ČASOPIS PRO PRACOVNÍKY V KVASNÉM A NÁPOJOVÉM PRŮMYSLU

Půda k specifickému průkazu a stanovení laktobacilů

Ing. JAN ŠAVEL, Jihočeské pivovary, n. p., České Budějovice

576.852.24
576.8.093.3

Úvod

Průkaz a stanovení laktobacilů je jedním z nejdůležitějších a nejčastějších rozborů pivovarské mikrobiologie. K tomuto účelu se používá různých půd, jejichž základem je živné prostředí, v němž se tyto bakterie dobře pomnožují. Často se k půdám přidávají další látky, sloužící k potlačení ostatní mikrobiální kontaminace, např. β -fenyletanol, který potlačuje růst gramnegativních bakterií.

Kromě laktobacilů rostou zpravidla na těchto půdách i pediokoky, které se s nimi často vyskytují. K rozlišení se jednotlivé kolonie mikroskopují, což je zdlouhavé a pracné. Dosud není znám vhodný inhibitor, který by potlačoval růst pediokoků, ale nebránil v rozvoji laktobacilů.

V předešlé práci [Šavel a Prokopová, 1974] jsme prokázali, že přídavek vhodného množství chloridu kadmatného k půdě z prokvašené sladiny potlačuje růst různých kmenů pediokoků, zatímco laktobacily na této půdě dobře rostou. Minimální inhibiční koncentrace $\text{CdCl}_2 \cdot 2,5 \text{ H}_2\text{O}$ pro laktobacily se pohybovala v rozmezí 200 až 1400 mg/l, pro pediokoky v rozmezí 1,6 až 100 mg/l.

V této práci jsme se pokusili využít rozdílného inhibičního účinku chloridu kadmatného k sestavení půdy pro specifické stanovení laktobacilů.

Materiál a metody

Původ různých kmenů laktobacilů a pediokoků, příprava základní živné půdy B⁻ pro jejich kultivaci, způsob kultivace, použité chemikálie a ostatní metody popisuje předešlé sdělení [Šavel a Prokopová, 1974].

Půda B⁻ s přídavkem β -fenyletanolu (B⁺). Před rozléváním na misky se k půdě B⁻ ochlazené na 50 °C přidal β -fenyletanol (0,3 % obj.).

Půda B⁺ s přídavkem chloridu kadmatného. Současně s přídavkem β -fenyletanolu se přidal sterilní roztok chloridu kadmatného v takovém množství, aby se dosáhlo požadované koncentrace.

Očkování suspenzí bakterií na pevné půdy. 0,1 ml suspenze bakterií (zředěné podle potřeby sterilní vodou) se po pipetování na plotny půd B⁻, B⁺ a na tyto půdy s chloridem kadmatným, rozetřelo skleněnou tyčinkou. Stejně se očkovoaly vzorky piva, mladiny a kvasnic. Kromě toho se podle potřeby očkovoaly bakterie očkovací jehlou na plotny ztužených půd (viz další text).

Postup práce a výsledky

a) **Stanovení minimální inhibiční koncentrace chloridu kadmatného v půdě B⁻ s přídavkem β -fenyletanolu**

Na plotny půdy B⁺ s chloridem kadmatným se očkovací jehlou očkovoaly kmeny mléčných bakterií. Po kultivaci se odečetla hodnota nejnižší koncentrace chloridu kadmatného, při níž byl růst jednotlivých kmenů úplně potlačen. Tyto hodnoty spolu s hodnotami zjištěnými s půdou B⁻ [Šavel a Prokopová, 1974] uvádí tabulka 1.

Tabulka 1. Minimální inhibiční koncentrace $\text{CdCl}_2 \cdot 2,5 \text{ H}_2\text{O}$ v půdách B⁻ a B⁺

Kmen	Minimální inhibiční koncentrace (MIC) $\text{CdCl}_2 \cdot 2,5 \text{ H}_2\text{O}$ (mg/l) v půdě		MIC (B ⁺)
	B ⁻	B ⁺	
L. brevis	200	200	1,0
L. buchneri	200	200	1,0
L. casei	400	100	4,0
L. plantarum	200	100	2,0
L. 21	800	400	2,0
L. 26	1 400	800	1,8
L. 33	400	400	1,0
L. 36	1 000	800	1,3
P. cerevisiae	50	25	2,0
P 1	25	12,5	2,0
P 2	3,1	0,8	3,9
P 3	1,6	1,6	1,0
P 7	100	50	2,0
P 8	100	100	1,0
P 10	3,1	0,8	3,9

Na obou půdách bez chloridu kadernatého (B⁻ i B⁺) rostly všechny zkoušené kmeny.

b) *Orientační stanovení laktobacilů a pediokoků v provozních vzorcích na půdách s chloridem kadernatým*

Na plotny půd B⁻ a B⁺ a na tyto stejné půdy s chloridem kadernatým se očkaly (roztěrem) různé vzorky z pivovarského provozu (kalová mladina, zakvašená mladina, várečné kvasnice, pivo z ležáckých tanků a sedliny piv zkažených mléčnými bakteriemi).

Podle výsledků předešlé práce (Šavel, Prokopová, 1974) i zhodnocení vlivu β-fenyletanolu na MIC CdCl₂ se volila koncentrace 100 mg/l CdCl₂ · 2,5 H₂O v půdě B⁻ a 50 mg/l CdCl₂ · 2,5 H₂O v půdě B⁺. Po kultivaci se porovnával počet laktobacilů a pediokoků zjištěný mikroskopováním (a barvením podle Grama) kolonií narostlých na těchto půdách. Výsledky uvádí tabulka 2.

Tabulka 2. *Průkazy laktobacilů a pediokoků ve vzorcích z pivovarského provozu*

Celkový počet vzorků	Půda	Počet vzorků s		Laktobacily + pediokoky
		laktobacily	pediokoky	
20	B ⁻	6	3	11
20	B ⁻ + CdCl ₂	17	0	0
20	B ⁺	9	2	8
20	B ⁺ + CdCl ₂	17	0	0

Počet kolonií laktobacilů byl však zpravidla vyšší na plotnách půd B⁻ a B⁺ než na plotnách s chloridem kadernatým. Příčinou může být vyšší citlivost některých kmenů laktobacilů (vyskytujících se v provozních vzorcích) k chloridu kadernatému, nebo částečné potlačení růstu očkovaných laktobacilů, které není při velkém inokulu (nátěr) patrné.

c) *Vliv velikosti inokula na inhibiční účinek chloridu kadernatého*

Plotny půd B⁻ s různým obsahem chloridu kadernatého se zaočkaly roztěrem různě zředěnými supenzemi čistých kmenů *L. plantarum*, *L. 26* a čerstvou sedlinou zkaženého piva, obsahující pouze laktobacily. Současně se tyto půdy zaočkaly neředěnými supenzemi stejných vzorků (nátěr očkovací jehlou), stejným způsobem jako při stanovení minimální inhibiční koncentrace CdCl₂.

Výsledky uvádí tabulka 3a, b.

Tabulka 3a. *Vliv velikosti inokula na inhibiční účinek CdCl₂*

Kmen	Ředění	Počet kolonií na půdě						
		B ⁻ bez CdCl ₂ · 2,5 H ₂ O	s CdCl ₂ · 2,5 H ₂ O					
			B ⁻ + 10 mg/l	‰ *	B ⁻ + 50 mg/l	‰		B ⁻ + 100 mg/l
L. Plantarum	1	2 260	2 280	100,9	2 240	99,1	1 360	60,2
	2	605	708	117,0	552	91,2	296	48,9
	3	146	121	82,8	101	69,2	61	41,8
L 26	1	6 000	5 800	96,7	5 680	94,7	600	10,0
	2	1 600	1 710	106,8	1 120	70,0	183	11,4
	3	987	980	99,3	754	76,4	100	100,1
Sedlina s laktobacily	1	4 000	4 270	106,8	2 000	50,0	950	23,8
	2	1 549	1 267	81,8	1 250	80,7	350	22,6
	3	976	832	85,2	643	65,9	112	11,5

* v porovnání s počtem kolonií na půdě B⁻

d) *Stanovení laktobacilů v provozních vzorcích na půdách s přidávkou chloridu kadernatého*

Podle výsledků, uvedených v předešlých odstavcích jsme pro stanovení laktobacilů ve vzorcích s inokulem

Tabulka 3b. *Růst laktobacilů na půdě s různým obsahem CdCl₂ (nátěr očkovací jehlou)*

	Intenzita růstu na půdě			
	B ⁻ bez CdCl ₂ · 2,5 H ₂ O	s CdCl ₂ · 2,5 H ₂ O		
		B ⁻ + 10 mg/l	B ⁻ + 50 mg/l	B ⁻ + 100 mg/l
<i>L. plantarum</i>	++++	++++	++++	++++
<i>L. 26</i>	++++	++++	++++	++++
sedlina s laktobac.	++++	++++	++++	++++

Tabulka 4a. *Stanovení laktobacilů a pediokoků v pivních sedlinách na půdě B⁻ a B⁻ + CdCl₂*

	na B ⁻	Počet vzorků			
		na B ⁻ + 10 mg/l CdCl ₂ · 2,5 H ₂ O		s pediokoky	
		s laktobacily < B ⁻ = B ⁻	s laktobacily < B ⁻ = B ⁻	s pediokoky < B ⁻ = B ⁻	s pediokoky < B ⁻ = B ⁻
s laktobacily	10	3	7	—	—
s pediokoky	5	—	—	—	—
s laktobacily + pediokoky	15	3	12	—	1

<B⁻ počet vzorků s počtem kolonií na plotnách s CdCl₂ menším než na plotnách B⁻

=B⁻ počet vzorků s počtem kolonií na plotnách s CdCl₂ stejným jako na plotnách B⁻

Tabulka 4b. *Stanovení laktobacilů a pediokoků v pivních sedlinách na půdě B⁺ a B⁺ + CdCl₂*

	na B ⁺	Počet vzorků			
		na B ⁺ + 10 mg/l CdCl ₂ · 2,5 H ₂ O		s pediokoky	
		s laktobacily < B ⁺ = B ⁺	s laktobacily < B ⁺ = B ⁺	s pediokoky < B ⁺ = B ⁺	s pediokoky < B ⁺ = B ⁺
s laktobacily	8	1	7	—	—
s pediokoky	3	—	—	—	1
s laktobacily + pediokoky	8	2	6	—	1

<B⁺ počet vzorků s počtem kolonií na plotnách s CdCl₂ menším než na plotnách B⁺

=B⁺ počet vzorků s počtem kolonií na plotnách s CdCl₂ stejným jako na plotnách B⁺

asi 100 až 1000 bakterií na misku zvolili koncentraci 10 mg/l CdCl₂ · 2,5 H₂O pro půdu B⁻ a 5 mg/l CdCl₂ · 2,5 H₂O pro půdu B⁺.

Na plotny těchto půd se očkaly sedliny různých piv s laktobacily a pediokoky. Množství kolonií laktobacilů a pediokoků narostlých na půdách s chloridem kadernatým se porovnávalo s počtem kolonií na půdách bez CdCl₂ (tab. 4a, b). Při porovnání se přihlíželo rovněž k odchylkám při opakovaném stanovení stejného vzorku.

Diskuse

K stanovení mléčných bakterií v pivovarském provozu se používá různých půd. Do některých z nich se přidává β-fenyletanol k potlačení gramnegativní kontaminace.

Podle údajů literatury (Engel, 1971) i vlastního pozorování potlačuje β-fenyletanol částečně růst pediokoků. Protože toto potlačení není úplné, vyzkoušeli jsme přidávek CdCl₂ k půdě s β-fenyletanolem i k půdě bez něj. V průměru se MIC chloridu kadernatého pro mléčné bakterie přidávkou β-fenyletanolu dvakrát snížila, tzn., že β-fenyletanol zesiluje účinek CdCl₂.

Průkaz laktobacilů v provozních vzorcích na půdách s CdCl₂ byl dostatečně selektivní. U všech vzorků se dosáhlo úplného potlačení pediokoků. Chlorid kadernatý však částečně inhiboval i růst laktobacilů. Při očkování zředěných suspenzí bakterií, které je běžné v provozní kontrole, je tento účinek dobře patrný. Naproti tomu při stanovení MIC, při kterém se očkuje na plotnu velké množství buněk (nátěr) není inhibiční účinek pozorovatelný. Kromě toho se v provozních vzorcích prav-

děpodobně vyskytují také kmeny laktobacilů, které jsou citlivější k CdCl_2 oproti kmenům ve vybraném souboru, použitým k stanovení minimální inhibiční koncentrace.

Z těchto důvodů bylo nutné nalézt vhodnou koncentraci CdCl_2 pokusně. Takto nalezená koncentrace, 10 mg/l CdCl_2 . 2,5 H_2O pro půdu B⁻ a 5 mg/l CdCl_2 . 2,5 H_2O pro půdu B⁺, umožňovaly selektivní stanovení laktobacilů ve směsi s pediokoky. I při těchto koncentracích se však poněkud snížil (v některých případech) částečně i počet kolonií laktobacilů. Další snižování obsahu CdCl_2 v půdě nepostačovalo k úplné inhibici pediokoků.

Přesto lze doporučit půdy s CdCl_2 k provozní mikrobiologické kontrole v těch případech, kdy nízkou trvanlivost piva způsobují laktobacily a rozdílný obsah pediokoků ve vzorcích z různých míst provozu znemožňuje rychlé kultivační stanovení laktobacilů.

Literatura

- [1] ENGEL, E. L. ASBC Proc. 1971, s. 49—51
 [2] ŠAVEL, J., PROKOPOVÁ, M., Kvas. prům. 20, 1974, č. 12, s. 265—267; 21, 1975, č. 4, s. 79—80

Šavel, J.: Půda k průkazu a stanovení laktobacilů. Kvas. prům., 21, 1975, č. 8, s. 169—171.

Článek pojednává o selektivním stanovení laktobacilů ve směsi s pediokoky ve vzorcích z pivovarského provozu. K potlačení pediokoků se použilo chloridu kademnatého. K stanovení se použilo půdy z prokvašené sladiny a dalších přísad a stejné půdy s β -fenyletanolom (0,2 % obj.) k inhibici gramnegativních bakterií. Pro provozní kontrolu se pokusně našly hodnoty přísad CdCl_2 . 2,5 H_2O , 10 mg/l pro půdu bez β -fenyletanolu a 5 mg/l pro půdu s ním. Tyto koncentrace potlačovaly růst pediokoků a v některých případech také poněkud snižovaly počet rostoucích laktobacilů.

Шавел, Я.: Питательная среда для определения молочнокислых палочек. Квас. прум. 21, 1975, № 8, стр. 169—171.

В статье рассматривается избирательное определение молочнокислых палочек в образцах, полученных с пивоваренных заводов и содержащих также педиококки, которые были подавлены с помощью хлорида кадмия. В качестве питательной среды оправдало себя сброжен-

ное сусло с соответствующими добавками. Такая-же среда с добавкой фенилэтилового спирта в количестве 0,3 % (в объемном выражении) служила для ингибирования грамотрицательных бактерий. Для контроля в производственных условиях рекомендуются следующие концентрации: CdCl_2 . 2,5 H_2O 10 мг/л для среды без фенилэтилового спирта и 5 мг/л для среды с этим спиртом. Приведенные концентрации подавляют рост педиококков, а в некоторых случаях снижают число размножающихся молочнокислых палочек.

Šavel, J.: Correct Medium for Determining Lactobacilli. Kvas. prům. 21, 1975, No. 8, pp. 169—171.

The article deals with the selective determination of lactobacilli in samples containing beside lactobacilli also pediococci. To suppress pediococci cadmium chloride was used as an effective chemical. Medium taken for experiments was essentially fermented wort with some admixtures. To inhibit Gram-negative bacteria phenylethanol (in 0,3 % volumetric concentration) was added to the basic medium. As to the cadmium chloride (CdCl_2 . 2,5 H_2O) concentration 10 mg/l can be recommended for routine analyses and medium without phenylethanol and 5 mg/l for medium with it. Such concentrations are high enough to suppress pediococci and in some cases reduce also the growth of lactobacilli.

Šavel, J.: Boden zum Beweis und zur Bestimmung der Lactobazillen. Kvas. prům. 21, 1975, No. 8, S. 169—171.

Der Artikel informiert über die selektive Bestimmung der Lactobazillen im Vermisch mit Pediokokken in den Proben aus Brauereibetrieben. Zur Inhibition der Pediokokken wurde Kadmiumchlorid appliziert. Zur Bestimmung wurde ein Nährboden aus vergärter Würze und weiteren Zugaben angewandt, zur Inhibition gramnegativer Bakterien der gleiche Boden mit β -Phenyläthanol (0,3 Vol. %). Für die Zwecke der Betriebskontrolle wurden versuchsweise die Werte der Zugabe von CdCl_2 . 2,5 H_2O 10 mg/l für den Boden ohne β -Phenyläthanol und 5 mg/l für den Boden mit β -Phenyläthanol ermittelt. Diese Konzentrationen inhibierten das Wachstum der Pediokokken; in einigen Fällen verminderten sie auch einigermaßen die Zahl der wachsenden Lactobazillen.