

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

## 1. ÚVOD

K průkazu a stanovení mikroorganismů se v pivovarské mikrobiologii používá různých půd. Snaha zkrátit kultivace a zachytit co největší počet mikroorganismů vedla k obohacování půd živinami; kvalita půdy se hodnotila počtem mikroorganismů vyrostlých z různých provozních vzorků.

Ke stanovení celkového počtu kvasinek se všeobecně používají sladinné nebo mladinné půdy v koncentraci, blízké koncentraci mladiny používané k výrobě běžných konzumních piv. V půdách pro stanovení mléčných bakterií se jejich růst podporoval různými stimulanty, které se původně v pivě nenacházely, nebo v něm byly v řádově nižších koncentracích. Tak se tato živná média často značně lišila od prostředí, v němž mikroorganismy negativně působily, tj. v pivu.

Dosavadní živná prostředí prokazovala mikroorganismy bez rozlišení schopnosti kazit pivo. Stanovili se např. kultivačně kvasinky ve stočeném pivu a znovu se stejným množstvím jednotlivých izolovaných kvasničných kmenů zaočkují láhve s pasterovaným pivem, zjistí se značné rozdíly v trvanlivosti takto uměle kontaminovaných piv. To je jedna z příčin nepřilíš určitého vztahu mezi celkovým počtem kvasinek a trvanlivostí. Ještě více se tento vliv uplatňuje u mléčných bakterií.

Z těchto důvodů se pivovarští mikrobiologové při provozní kontrole opírají nejen o kultivační stanovení mikroorganismů, ale také o stanovení trvanlivosti. Hlavními nevýhodami tohoto postupu jsou: práce s relativně velkým objemem vzorků, dlouhá doba stanovení a omezení na úsek výroby s filtrovaným pivem.

Tyto nevýhody odstranila z větší části kultivační technika vyvinutá v mikrobiologické laboratoři Jihočeských pivovarů [1]. Její podstatou je kultivace mikroorganismů v pivu, upraveném do polotekutého stavu přidávkou agaru.

## 2. MATERIÁL A METODY

### Polopevná pivní půda (P<sub>3</sub>)

10%, popř. 12% pivo se zbaví třepáním kyslíčnicku uhličitého a promývá přes keramickou svíčku nebo fritu čistým dusíkem, až obsah rozpuštěného kyslíku kles-

ne pod 1,5 mg O<sub>2</sub>/l. Pivo se rozplní do pivních lahví téměř po okraj a po uzavření korunkou se pasteruje 30 min při 60 °C. Takto připravené pivo se uchovává v zásobě.

Před očkovaním mikroorganismů se připraví 0,7% roztok agaru ve vodě autoklávováním, nebo přímo rozvařením v baňce zahříváné kahanem. Půda P<sub>3</sub> se získá smíšením 30 ml horkého roztoku agaru se 100 ml zásobního piva.

V našich pokusech jsme např. 0,7 g agaru a 100 ml vody v 500 ml baňce zahřívali 15 min v autoklávu při 120 °C a po vyjmutí k horkému roztoku agaru asepticky přidali 330 ml zásobního piva z 0,33 l pivní láhve. Po promíchání byla půda připravena k použití.

Trvanlivost pasterovaného piva lze zvýšit úpravou adsorpčním nebo jiným stabilizačním prostředkem před promýváním dusíkem. V našich pokusech se např. vytřepané pivo 30 min míchalo při laboratorní teplotě s 1 % adsorpčního stabilizátoru Stabiquicku a po filtraci se postupovalo již podle uvedeného postupu. Takto připravené vzorky zásobního piva se mohly použít k přípravě půdy i po dvou měsících skladování při laboratorní teplotě.

### Očkování vzorků

Vzorky z provozu (mladina, kvasící mladina, pivo) se asepticky pipetují do sterilních zkumavek v množství 0,1–1,0 ml, nebo se filtrují membránovým filtrem Synpor 6. Z membránového filtru se asepticky vystříhne proužek široký 1 cm a vsune do sterilní zkumavky. Do zkumavek se vzorky se ihned po přípravě půdy P<sub>3</sub> pipetuje nebo lije půda P<sub>3</sub> do výše 8 až 10 cm. Zkumavky s půdou se umístí na 30 min do chladničky, aby půda částečně zgelovatěla, a potom do termostatu s teplotou 20 nebo 28 °C. V jednotlivých dnech kultivace se pozoruje růst mikroorganismů.

Při stanovení mléčných bakterií se k půdě přidá aktidion v množství 30 µg/ml, při stanovení kvasinek tetracyklin v množství 50 µg/ml. Sterilní roztoky antibiotik se mohou pipetovat přímo do zkumavek se vzorky před přeléváním půdou.

### Počet mléčných bakterií na půdě B+

Celkový počet mléčných bakterií se stanovoval anaerobní kultivací na půdě B+ [2, 3].



### 3. VÝSLEDKY

#### Růst mikroorganismů kazičích pivo v půdě P<sub>3</sub>

Pět kvasničných a pět bakteriálních sedimentů zkaženého piva se očkovalo v množství 10<sup>4</sup> buněk do zkumavek a přelilo 15 ml půdy P<sub>3</sub> připravené z 10% nebo 12% piva. Zaočkované zkumavky se kultivovaly při 20 °C a 28 °C. Tabulka 1 uvádí dobu, za kterou se ve zkumavkách pomnožily mikroorganismy do vzniku zákalu stejné intenzity. Podobně se připravily zkumavky s různou koncentrací mikroorganismů v půdě P<sub>3</sub> a zaznamenala doba růstu mikroorganismů v 10% pivu při 28 °C (tab. 2).

Tabulka 1. Doba růstu mikroorganismů do vzniku zákalu stejné intenzity v P<sub>3</sub>

Druh piva, teplota	Doba růstu [dny]									
	kvasinky					baktérie				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
10%, 20°C	2	2	3	2	3	3	4	4	4	5
10%, 28°C	2	1	2	1	2	2	2	2	3	2
12%, 20°C	2	2	4	4	5	5	5	6	6	10
12%, 28°C	3	2	3	2	4	4	3	3	5	6

Tabulka 2. Doby průkazu mikroorganismů v závislosti na jejich koncentraci v P<sub>3</sub>

Druh mikroorganismů	Doba průkazu [dny]					
	počáteční koncentrace buněk v 1 ml P <sub>3</sub>					
	2.10 <sup>1</sup>	2.10 <sup>2</sup>	2.10 <sup>3</sup>	2.10 <sup>4</sup>	2.10 <sup>5</sup>	2.10 <sup>6</sup>
kvasinky	3	3	3	3	3	2
baktérie	4	4	4	3	2	2

#### Obsah mléčných bakterií v stočených pivech

Ve vzorcích 10% lahvových piv z osmi závodů, v nichž se stočené pivo kazilo mléčnými bakteriemi, se sledovaly: počet mléčných bakterií na půdě B<sup>+</sup> a v P<sub>3</sub>, trvanlivost při 20 °C a druh mikroorganismů v sedimentu nebo zákalu piva po zkažení (tab. 3a). Rozbory se opakovaly se stejnými vzorky po třídenním uložení při 20 °C (tab. 3b).

#### Obsah mléčných bakterií a kvasinek v pivech s rozdílnou trvanlivostí

V pivech ze závodu dosahujícího trvale vysoké trvanlivosti piva a ze závodu s nízkou trvanlivostí se stanovily kvasinky a mléčné bakterie. Počet mikroorganismů v půdě P<sub>3</sub> se odečetl po čtyřech dnech kultivace při 28 °C (tab. 4).

#### Vliv druhu piva na rychlost růstu mikroorganismů

Mikrobiální sedimenty zkažených piv se očkovaly do půdy P<sub>3</sub> (10<sup>5</sup> buněk/ml), připravené z piva ze závodu s trvale nízkou trvanlivostí piva a souběžně do piva ze závodu s trvale vysokou trvanlivostí. Dvě sedimenty obsahovaly pouze kvasinky, dvě laktobacily. Po kultivaci vznikl zákal stejné intenzity ve stejných časových intervalech nezávisle na druhu piva použitého k přípravě půdy.

### 4. DISKUSE

Průkaz mikroorganismů očkovaním vzorků do pasterovaného piva je často používanou technikou v pivovarské mikrobiologii, nevýhodou je potřeba speciálních uzavěří nebo korunek.

Tabulka 3a. Mléčné bakterie v 10% pivech po stočení na půdách B<sup>+</sup>, P<sub>3</sub>

Závod č.	Mléčné bakterie v 1 ml piva					Trvanlivost	
	na B <sup>+</sup>		v P <sub>3</sub> [28°C] za				
	počet	druh	4 dny	7 dní	druh	dny	druh
1	14,6	Tb	pod 0,1	0,7	tb	8	tb
2	6,6	pdk	0,2	0,2	tb	8	tb
3	0,7	pdk	pod 0,1	0,1	tb	8	tb
4	pod 0,1	—	pod 0,1	pod 0,1	—	9	Tb
5	2,1	Tb	pod 0,1	pod 0,1	—	9	Tb
6	3,2	Tb, pdk	1,6	2,0	Tb	7	Tb
7	8,8	tb	3,0	8,0	Tb	6	Tb
8	105,2	Tb, pdk	1,3	2,0	Tb	7	Tb

Tb: dlouhé tyčinkové bakterie, tb: krátké tyčinkové bakterie, pdk: pediokoky

Tabulka 3b. Mléčné bakterie v 10% pivech na půdách B<sup>+</sup>, P<sub>3</sub>, 3 dny po stočení (20 °C)

Závod č.	Mléčné bakterie v 1 ml piva					Trvanlivost	
	na B <sup>+</sup>		v P <sub>3</sub> [28°C] za				
	počet	druh	4 dny	7 dní	druh	dny	druh
1	12,5	Tb, pdk	1,3	4,0	tb	8	tb
2	6,9	Tb	1,8	3,0	tb	8	tb
3	16,8	Tb	0,3	2,0	tb	8	tb
4	pod 0,1	—	pod 0,1	pod 0,1	—	9	Tb
5	16,2	Tb	pod 0,1	pod 0,1	—	9	Tb
6	80,0	Tb	20,0	20,0	Tb	7	Tb
7	69,5	Tb	25,0	25,0	Tb	6	Tb
8	122,5	Tb	23,2	45,8	Tb	7	Tb

Tb: dlouhé tyčinkové bakterie, tb: krátké tyčinkové bakterie, pdk: pediokoky

Tabulka 4. Obsah mléčných bakterií a kvasinek v pivech s různou trvanlivostí

Vzorek č.	Mléčné bakterie v 1 ml		Kvasinky v 1 ml		Trvanlivost	
	na B <sup>+</sup>	v P <sub>3</sub>	na MA	v P <sub>3</sub>		
	počet	druh	počet	druh	dny	druh
1	36,2	pod 0,03	1,5	0,7	14	Tb, kv
2	25,8	pod 0,03	14,2	0,9	15	Tb, kv
3	53,7	0,03	0,2	pod 0,03	16	Tb
4	6,8	2,6	141,0	20,2	6	Tb, kv
5	10,2	3,1	70,2	10,1	5	Tb, kv

MA: mladinový agar, Tb: dlouhé tyčinkovité bakterie, kv: kvasinky

Kultivaci piva zaočkovaného za přístupu vzduchu se při hladině pomnoží aerobní mikroorganismy, které klesají pod hladinu a postupně zakalí pivo. Tak se při aerobní kultivaci v pivu pomnoží mikroorganismy, které v pivu stočeném v uzavřených dopravních obalech obvykle nerostou. Protože se na množství mikroorganismů usuzuje z intenzity zákalu nebo sedimentu, nelze určit počet mikroorganismů kazičích pivo v původním vzorku.

Snahy pěstovat škodlivé mikroorganismy na pivo ztuženém agarem obvyklou technikou v Petriho miskách nebyly příliš úspěšné. Na povrchu pivního agaru se kromě pomalu rostoucích mléčných bakterií množily při anaerobní kultivaci některé mikroorganismy, které nerostly v pivu.

Řešením je částečné ztužení pasterovaného piva; tím se zabrání smíšení mikroorganismů z povrchové vrstvy s ostatním pivem a umožní kvantitativní zhodnocení. Ve zbývajícím objemu půdy (1 cm pod hladinou a níže) rostou pouze mikroorganismy kazičící pivo.

Podle tab. 1 v půdě P<sub>3</sub> dobře rostly mikroorganismy ze zkažených piv. Podle mikroskopického nálezu byly mikroorganismy narostlé v půdě P<sub>3</sub> morfologicky shod-



né s mikroorganismy z pív použitých k naočkování. Potvrdily se rozdíly v růstu mikroorganismů v 10% a 12% pivu, což odpovídá rozdílné trvanlivosti těchto pív v praxi.

Teplota ovlivňovala rychlost růstu mléčných bakterií více než kvasinek. Proto je kultivace vzorků při 28 °C výhodná zejména u mléčných bakterií, i když se jí může použít i u kvasinek.

Techniku polopevné půdy použil v pivovarské mikrobiologii již Nakagawa v r. 1964, jeho půda a další její modifikace však nebyly selektivní pro mikroorganismy kazící pivo.

K selektivnímu průkazu mléčných bakterií nebo kvasinek se osvědčil přídatek aktidionu nebo tetracyklinu do částečně ztuženého piva.

Podle doby růstu mikroorganismů v  $P_3$  lze rozeznat druhy, které rychle kazí pivo. Rychlost tvorby zákalu poněkud závisí na počáteční koncentraci mikroorganismů, další údaje se týkají růstu mikroorganismů v koncentraci pod 1000 buněk/ml.

Popsaná kultivační technika je zvláště výhodná u mléčných bakterií, kde stanovení druhů rychle kazících pivo bylo dosud nemožné. Menší množství kyslíku, které difunduje při kultivaci do půdy, růst mléčných bakterií podstatně neovlivňuje, naproti tomu se mohou pod hladinou pomnožit kvasinky, které v pivu s nízkou koncentrací rozpuštěného kyslíku nerostou.

V povrchové vrstvě půdy obvykle rostou křísotvorné druhy kvasinek a aerobní bakterie, které zpravidla nevydají při vyhodnocování výsledků. V nutném případě se jejich růstu zabrání vrstvičkou parafinového oleje.

Souběžná stanovení mléčných bakterií na živinami bohaté půdě  $B^+$  a v půdě  $P_3$  prokázala, že jen malá část mléčných bakterií přítomných v pivu může rychle kazit pivo. Jako příklad, kdy stanovení na půdě bohaté živinami může poskytnout mylnou informaci o předpokládané trvanlivosti, slouží údaje z tab. 4. Nízký obsah rychle rostoucích mléčných bakterií v půdě  $P_3$  odpovídal vysoké trvanlivosti těchto pív. Po desetidenní kultivaci se počet kolonií v  $P_3$  zvýšil, nedosáhl však počtu kolonií na půdě  $B^+$ .

Z těchto důvodů doporučujeme pro stanovení mikroorganismů rychle kazících pivo 4denní kultivaci při 28 °C, zaočkovávané zkumavky je vhodné sledovat i po uplynutí této doby.

Nový způsob pěstování mikroorganismů piva umožňuje rozhodnout, zda pokles trvanlivosti je způsoben nevhodným složením piva, nebo přítomností druhu mikroorganismu rychle kazícího pivo.

Pěstování mikroorganismů v částečně ztuženém pivu je vhodné především pro provozní kontrolu. Výhodou je možnost průkazu rychle rostoucích mikroorganismů, snadná příprava půdy, očkování i kultivace, rychlost stanovení a v neposlední řadě snadné mytí skleněného nádobí.

#### Literatura

- [1] Zlepšovací návrh č. 27/78, Jihočeské pivovary
- [2] ŠAVEL, J., PROKOPOVÁ, M.: Kvas. prům. 20, 1974, s. 49—51
- [3] ŠAVEL, J., PROKOPOVÁ, M.: Kvas. prům. 20, 1974, s. 265—267

**Šavel J., Prokopová M.: Pěstování mikroorganismů kazících pivo.** Kvas. prům. 24, 1978, č. 11, s. 246—249.

Článek popisuje pěstování mikroorganismů rychle kazících pivo v polopevné pивní půdě ( $P_3$ ) ve zkumavkách. Pivo se zbaví kyslíčnicku uhlíčitým třepáním, proudem dusíku se sníží rozpuštěný kyslík pod 1,5 mg  $O_2$ /l a po rozplnění do pивních lahví a uzavření korunkou se pasteruje. Trvanlivost tohoto zásobního piva se zvý-

ší stabilizací adsorpčním prostředkem. Před očkováním se 30 ml horkého 0,7% roztoku agaru ve vodě smísí se 100 ml zásobního piva a směs se zalévají 0,1—1,0 ml vzorky nebo proužky membránových filtrů s mikroorganismy ve zkumavkách. Po 4denní kultivaci při 28 °C se určí počet mikroorganismů rychle kazících pivo, sledováním po delší dobu se stanoví i pomalu rostoucí druhy mikroorganismů. Tetracyklin (50  $\mu$ g/l) selektivně potlačuje bakterie, aktidion (30  $\mu$ g/l) kvasinky. Souběžné sledování obsahu mléčných bakterií stočeného piva na živinami bohaté půdě a v  $P_3$  potvrdilo, že jen část mléčných bakterií ve stočeném pivu rychle kazí pivo. Mezi počtem mikroorganismů rychle kazících pivo a trvanlivostí je vzájemná korelace. Mikroorganismy narostlé ze vzorků stočených pív v  $P_3$  byly morfologicky shodné s mikroorganismy, které se pomnožily v souběžně uložených vzorcích stočených pív v lahvích. Metoda je pro rychlost a snadnost vhodná pro provozní kontrolu.

**Шавел, Я. — Прокопова, М.: Разведение микроорганизмов портящих пиво.** Квас. прум. 24, 1978, № 11, стр. 246—249.

В статье рассматривается разведение в пробирках, в полужидкой пивной среде ( $P_3$ ) микроорганизмов, вызывающих быструю порчу пива. Из пива, предназначенного для исследований, удаляется встряхиванием углекислота, после чего с помощью потока азота количество растворенного в пиве кислорода снижается до предела, не превышающего 1,5 мг  $O_2$  в литре жидкости. Пиво наливается в бутылки, которые закупориваются корончатыми пробками и подвергаются пастеризации. Срок складирования обработанного пива можно увеличить добавкой стабилизирующего, адсорбирующего препарата. Перед инокуляцией 30 мл горячего, 0,7 %-ного, водного раствора агара смешивают с 100 мл заготовленного пива и эту смесь вливают в пробирки, где находятся пробы 0,1—1,0 мл или полоски мембранного фильтра с захваченными микроорганизмами. После четырехдневного культивирования при температуре 28 °C можно определить микроорганизмы быстро портящие пиво. Позже определяются медленно размножающиеся микроорганизмы. Тетрациклин (50  $\mu$ г/мл) подавляет избирательно бактерии, а актидигон (30  $\mu$ г/мл) — дрожжи. Параллельное изучение количества молочнокислых бактерий в пиве, в среде богатой питательными веществами и в  $P_3$  показывает, что порчу пива вызывает лишь часть бактерий. Между их количеством и стойкостью пива при хранении существует корреляция. Микроорганизмы, размножившиеся в  $P_3$  в пробах пива сходны морфологически с организмами, появившимися в пиве в бутылках. Благодаря простоте и малой затрате времени метод можно применять в производственных условиях.

**Šavel J., Prokopová M.: Cultivation of Microorganisms Spoiling Beer.** Kvas. prům. 24, 1978, No. 11, pp. 246—249.

The article deals with the cultivation in test tubes on semisolid beer medium ( $P_3$ ) of microorganisms rapidly spoiling beer. Beer must be treated as follows: carbon dioxide should be expelled by shaking, the amount of dissolved oxygen reduced by introducing nitrogen stream under 1,5 mg of  $O_2$  in 1 litre, bottles filled, capped with crown corks and pasteurized. The storage period of beer so treated can be improved by applying some stabilizing adsorption preparation. Prior to inoculation 30 ml of 0,7 % hot water solution of agar must be mixed with 100 ml of stored beer and this mixture poured in test tubes with 0,1—1,0 ml samples or strips of membrane filter holding microorganisms. Microorganisms quickly spoiling beer can be identified after 4 days of cultivation at 28 °C. Slowly propagating



microorganisms can be identified later. Tetracycline (50 µg/ml) suppresses selectively propagation of bacteria, whereas actidion (30 µg/ml) of yeast. Comparison of the numbers of lactobacilli in cask beer, in highly nutritive medium and in P<sub>3</sub> indicates, that only a certain part of lactobacilli present in beer is responsible for its rapid spoilage. There is a correlation between the numbers of quick-spoiling microorganisms and storage quality of beer. Microorganisms multiplied in samples of beer in P<sub>3</sub> were morphologically identical with those multiplied in stored, bottled beer. The described method being simple and requiring little time is suitable for routine checking.

**Savel J., Prokopová M.: Kultivation der bierverderbenden Mikroorganismen.** Kvas. prům. 24, 1978, No. 11, S. 246—249.

In dem Artikel wird die Kultivation der bierverderbenden Mikroorganismen auf halbfestem Bierboden (P<sub>3</sub>) in Probegläsern beschrieben. Aus dem Bier wird durch Schütteln Kohlendioxyd entfernt, mittels Stickstoffstrom wird der gelöste Sauerstoff unter 1,5 mg O<sub>2</sub>/l herabgesetzt und nach Abfüllung in Bierflaschen und Verschließen durch Kronenkörke wird das aufbe-

reitete Bier pasteurisiert. Die Haltbarkeit dieses Vorratsbieres wird durch Stabilisierung mittels Adsorptionsmittel erhöht. Vor der Einimpfung werden 30 ml heißen 0,7 % wäßrigen Agarlösung mit 100 ml Vorratsbier vermischt und das Gemisch wird auf die 0,1—1,0 ml — Proben oder Membranfilterstreifen mit Mikroorganismen in Probegläsern gegossen. Nach viertägiger Kultivation bei 28 °C wird die Zahl der bierverderbenden Mikroorganismen ermittelt; durch Verfolgung während einer längeren Zeit werden auch die langsamer wachsenden Mikroorganismenarten bestimmt. Tetrazyklin (50 µg/ml) inhibiert selektiv die Bakterien, Aktidion (30 µg/ml) die Hefen. Die parallele Verfolgung des Milchsäurebakteriengehalts des Abgefüllten Bieres auf nährstoffreichem Boden und auf P<sub>3</sub> bestätigte, daß nur ein Teil der Milchsäurebakterien im abgefüllten Bier eine schnell bierverderbende Wirkung ausübt. Zwischen der Zahl der schnellen Bierverderber und der Haltbarkeit besteht eine gegenseitige Korrelation. Die aus den Proben der abgefüllten Biere in P<sub>3</sub> angewachsenen Mikroorganismen waren morphologisch identisch mit den Mikroorganismen, die sich in den parallel aufbewahrten Proben der abgefüllten Biere in Flaschen vermehrten. Die Methode ist einfach und schnell und eignet sich daher für die Betriebskontrolle.