

VYUŽITÍ MĚŘENÍ ZÁKALU PŘI JEDNORÁZOVÉ KULTIVACI MIKROORGANISMŮ K RYCHLÉ MIKROBIOLOGICKÉ KONTROLE V PIVOVARSTVÍ

Doc. Ing. PETR SLADKÝ, Mgr. HANA CÍSAŘOVÁ, KCHFO MFF UK, Praha
Ing. IDA HOLLEROVÁ, Ing. PETRA KOHOUTOVÁ, VÚPS Praha, a. s.

Klíčová slova: *růstové křivky, zákal, nefelometrie, turbidimetrie, jednorázová kultivace*

1. ÚVOD

Je známo, že v průběhu zkvašování extraktu mladiny dochází k jejímu zvýšenému zakalení v důsledku rozmnožení kvasnic a jejímu následnému vyčištění flokulací a sedimentací. Přestože se uvedeného jevu v pivovarství od nepaměti empiricky využívá k vedení kvašení na základě vizuálních pozorování, využití kvantitativních měření kinetiky zákalu v průběhu kvašení, či obecně během kultivace mikroorganismů v kapalných půdách, v širší pivovarské praxi chybí. Zatímco přímé provozní měření zákalu v kvasných či ležáckých tancích je v současné době značně technicky i ekonomicky

složité, laboratorní změření zákalu pivovarských vzorků je běžnou záležitostí díky rozšíření moderních metod a zařízení.

Cílem předložené práce je popsat pracovníkům provozních pivovarských laboratoří nenákladné a účinné způsoby využití měření kinetických změn zákalu při kultivaci mikroorganismů v kapalném médiu k rychlé provozní technologické i mikrobiologické kontrole. Vzhledem k šíři pojednávané problematiky a v souladu s jejím praktickým významem se v této práci omezíme na popis využití měření kinetiky zákalu za pokojové teploty ve dvou modelových příkladech: rozmnožování kvasnic ve sladince

a mléčných bakterií v tekuté půdě MRS. Přitom těžiště práce ponecháme na její metodicko-přístrojové části a zevrubném popisu postupů a vyhodnocení naměřených dat, včetně udání orientační časové, resp. ergonomické náročnosti uvedených měření, což je pro jejich praktické využití v pivovarských laboratořích rovněž důležité.

2. PRINCIP METODY

Jak plyne z názvu práce, je princip metody založen na poznatcích o průběhu jednorázových kultivací (viz např. [1-4]).

V prvním přiblížení vycházíme z exponenciálního modelu rozmnožování. Při jed-

norázové kultivaci mikroorganismů v kapalných pūdách dochází, vedle změn jiných růstových parametrů, zvláště ke změnám růstové rychlosti. V jisté fázi rozmnožování mikroorganismů tuto růstovou rychlost můžeme popsat, jak je známo [1], lineární diferenciální rovnicí prvního řádu

$$\frac{dx}{dt} = \mu x \quad (1)$$

kde μ = konst. = specifická růstová rychlost, t je čas a x je veličina související s počtem jedinců v jednotce objemu. Integrál této rovnice má pak tvar

$$x(t) = x(0)e^{\mu t} \quad (2)$$

Za předpokladu, že množení mikroorganismů probíhá dělením jednoho mikroorganismu na dva, tj. geometrickou řadou se základem dvě, lze koncentraci jedinců v n -té generaci popsat též rovnicí

$$x_n = x_0 2^n \quad (3)$$

a vedle specifické růstové rychlosti definovat tzv. čas zdvojení, resp. tzv. generační dobu, pomocí vztahu:

$$t_2 = \frac{\ln 2}{\mu} \quad (4)$$

Pro srovnání naměřených veličin $x(t)$ s teorií je výhodné pracovat s \ln variantou rovnice (2):

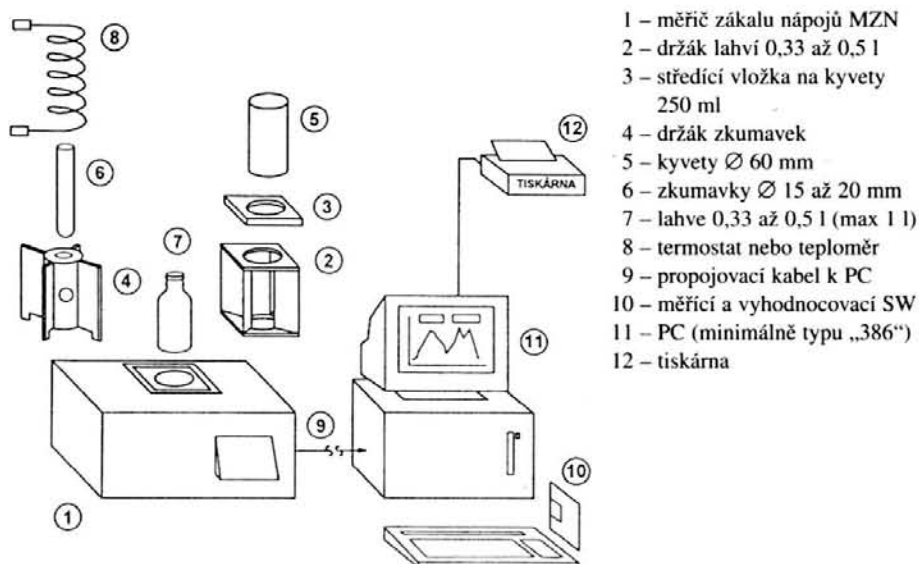
$$\ln x(t) = \mu t + \ln x(0) \quad (5)$$

Jestliže provedeme jednorázovou kultivaci mikroorganismů v kapalných pūdách, na kterou dopadá svazek světla, bude docházet k rozptylu světla na množících se částicích mikroorganismů. Změříme-li ve vhodném uspořádání toto rozptýlené světlo pomocí moderního fotometru jako funkci času, získáme křivky související s růstovými křivkami kultivovaných mikroorganismů. Na základě toho pak můžeme růstové křivky mikroorganismů v kapalných pūdách, snímané pomocí transmisních nebo jiných fotometrů, definovat názvem „fotometrické růstové křivky“.

I když „fotometrické“ růstové křivky jsou zaznamenávány jinak než růstové křivky mikroorganismů, stanovené počítáním kolonií, mohou s nimi v prvním přiblížení korelovat s dostatečnou přesností, kterou stanovíme např. cejchováním použitých fotometrů, a to zvláště při malých koncentracích v exponenciální fázi růstu, o čemž se snadno početně přesvědčíme pomocí výše uvedených rovnic.

3. PRAKTICKÉ ZPŮSOBY MĚŘENÍ

Jak bylo naznačeno v předchozí kapitole, změny zákalu v kultivovaných vzorcích lze měřit pomocí běžných laboratorních transmisních fotometrů. Praktickou nevýhodou tohoto způsobu je, že při měření je nutno vzorky umístit nebo přímo kultivovat ve speciálních firemních kyvetách předepsaných



Obr. 1 Sestava aparatury pro měření mikrobiologických zákalů kapalných vzorků o objemu 5 až 500 ml ve zkumavkách i komerčních lahvích

rozměrů. Vedle toho, že tyto kyvety jsou poměrně drahé, mají většinou i kvadratický průřez, což zvyšuje pracnost jejich umývání a omezuje možnost pracovat se sérií více kultivací. Bohužel, komerční transmisní fotometry většinou neumožňují měření v běžných laboratorních zkumavkách, které jsou nejen cenově dostupné, ale rovněž vhodné pro sériové mikrobiální kultivace, neboť je lze účinně umývat a sterilizovat.

Naštěstí teorie i praxe fotometrických měření ukazuje, že lze měřit velice přesně zákal i v běžných laboratorních zkumavkách v tzv. nefelometrickém uspořádání, a to dokonce i ve zkumavkách různého průměru podle velikosti průřezu budícího optického svazku. Další teoretickou i praktickou předností nefelometrických měření je, že jejich výsledky jsou méně ovlivněny rozměry světlorozptylujících mikroorganismů, jež se mohou při rozmnožování měnit a tak zkreslovat interpretaci výsledků transmisních měření zákalu.

Vedle výše zmíněných předností nefelometrie ke sledování kultivací ve zkumavkách je pro praktické využití popisované metody rozhodující její přístrojová dostupnost v běžné provozní pivovarské laboratoři v podobě moderního laboratorního pivovarského zákaloměru.

Většina moderních pivovarských laboratorních zákaloměrů pracuje normativně v základním nefelometrickém uspořádání a umožňuje měření zákalu vzorků i v komerčních lahvích. Řadu typů těchto zákaloměrů lze snadno upravit i pro měření kultivací v běžných laboratorních zkumavkách. Vedle toho tyto zákaloměry umožňují použít ruční i automatizované postupy měření pomocí osobního počítače (viz obr. 1).

4. POSTUPY MĚŘENÍ

Podle typu přístrojového vybavení a počtu měřených vzorků je možno použít při měření vývoje zákalu kultivovaných vzorků ve zvolených nádobách a při zvolené teplotě

postup buď ručního, nebo automatického měření vzorků a záznamu naměřených dat v závislosti na čase.

V případě ručních měření se zaznamenávají naměřená data s výhodou do tabulky např. ve tvaru uvedeném v tab. 1. Pro grafické zpracování naměřených dat z tabulky se vynášejí na osu y spíše přirozený logaritmus hodnoty zákalu v daném čase. Dbá se na důsledný popis vzorků, tj. očíslování zkumavek i času měření jednotlivých sekvencí. Výhodné je začít měření s jednorázovým vyhledávacím kultivačním pokusem oproti samotné pūdě, tj. se dvěma zkumavkami či lahvemi. Výsledky ručních měření je možno zpracovat pomocí některého z komerčních nebo autorských tabulkových a grafických počítačových programů.

Větší produktivity měření může být dosaženo přirozeně automatickým postupem pomocí PC. Pomocí vhodného počítačového programu lze výsledky současně číst i graficky prohlížet na obrazovce a případně i tisknout v uspořádání dle obr. 1.

5. MATERIÁLY A PŘÍPRAVA VZORKŮ

Vzorky pro nefelometrické sledování kultivací ve zvolených nádobách (zkumavkách, válcových kyvetách či skleničkách, atp.) připravujeme známými mikrobiologickými postupy popsány zhruba v dostupné literatuře (viz např. [2,3]).

Pro zvýšení analytické průkaznosti se osvědčují jak variace ve složení a koncentraci živných pūd, tak i inokula. Metoda umožňuje měření jak nativních pivovarských vzorků, jako např. sladiny a mladiny či piva, tak i vody s přirozenou provozní infekcí a to přímo i v komerčních obalech atp.: Ke zkrácení doby průkazu lze s výhodou použít zakonzentrování inokula pomocí osvědčených mikrofiltračních metod (viz obr. 2).

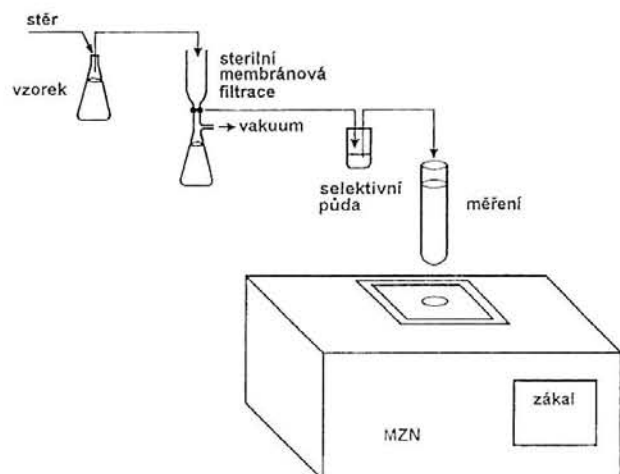
Praktické využití metody je ilustrováno na příkladech nefelometrického sledování

Tab. 1a. Vzor protokolu pro zápis naměřených hodnot vývoje zákalu v kultivovaných vzorcích za účelem konstrukce grafů růstových křivek mikroorganismů

| | | | | | | | | | |
|-----------------------|--------------|-----------------|-----------|-------|-----------|-------|-----------|-------|-----------------|
| operátor | | vzorek (serie): | | | | | | | |
| datum: | | teplota: | | | | | | | |
| čas inokulace (atp.): | | | | | | | | | |
| číslo vzorku | | 0 | | 1 | | 2 | | ----- | N |
| čas měření | číslo měření | Z_0 | $\ln Z_0$ | Z_1 | $\ln Z_1$ | Z_2 | $\ln Z_2$ | | Z_N $\ln Z_N$ |
| t_0 | 0 | | | | | | | | |
| t_1 | 1 | | | | | | | | |
| t_2 | 2 | | | | | | | | |
| t_3 | 3 | | | | | | | | |
| ⋮ | | | | | | | | | |
| t_M | M | | | | | | | | |

Tab. 1b. Příklad vedení zápisu naměřených hodnot vývoje zákalu v kultivovaných vzorcích za účelem konstrukce grafů růstových křivek mikroorganismů

| | | | | | | | | | | |
|---------------------------------|-----------------|-------------------------|-------------------------|--|-------------------------|-------------------------------------|-------------------------|-------------------------------------|-------------------------|-------------------------------------|
| operátor: Císařová Kohoutová | | | | vzorek (serie): mléčné bakterie v MRS | | | | | | |
| datum: 17. 9. 97 | | | | teplota: 23 °C | | | | | | |
| číslo vzorku | | 0 | 1 | | 2 | | 3 | | 4 | |
| čas měření [h] | číslo měření | Z ₀ [EBC] | Z ₁ [EBC] | ln(Z ₁ -Z ₀) | Z ₂ [EBC] | ln(Z ₂ -Z ₀) | Z ₃ [EBC] | ln(Z ₃ -Z ₀) | Z ₄ [EBC] | ln(Z ₄ -Z ₀) |
| 24,25 | 1 | 1,43 | 2,46 | 0,03 | 2,58 | 0,14 | 4,02 | 0,95 | 8,74 | 1,99 |
| 24,75 | 2 | 1,43 | 2,38 | 0,06 | 2,90 | 0,38 | 5,11 | 1,30 | 9,50 | 2,09 |
| 25,5 | 3 | | 2,65 | 0,20 | 3,49 | 0,72 | 4,33 | 1,06 | 11,15 | 2,27 |
| 26,0 | 4 | | 2,68 | 0,23 | 4,05 | 0,96 | 4,56 | 1,14 | 12,49 | 2,40 |
| 26,5 | 5 | | 2,87 | 0,37 | 4,61 | 1,16 | 4,46 | 1,11 | 14,91 | 2,60 |
| 27,0 | 6 | | 4,20 | 1,02 | 5,15 | 1,31 | 7,42 | 1,79 | 24,47 | 3,14 |
| 27,5 | 7 | | 4,88 | 1,24 | 6,48 | 1,62 | 10,09 | 2,16 | 34,37 | 3,49 |
| 28,0 | 8 | 1,43 | 4,81 | 1,22 | 7,29 | 1,77 | 11,32 | 2,29 | 37,98 | 3,60 |
| 28,5 | 9 | | 6,01 | 1,52 | 8,30 | 1,93 | 13,12 | 2,46 | 45,49 | 3,79 |
| 29,0 | 10 | | 6,83 | 1,69 | 10,09 | 2,16 | 15,53 | 2,65 | 55,32 | 3,99 |
| 30 | 11 | | 10,40 | 2,19 | 12,15 | 2,37 | 23,60 | 3,10 | 71,10 | 4,24 |
| 31 | 12 | | 13,46 | 2,49 | 20,67 | 2,96 | 29,71 | 3,34 | 94,14 | 4,53 |
| 32 | 13 | | 17,20 | 2,76 | 30,77 | 3,38 | 53,68 | 3,96 | 112,5 | 4,71 |
| 33 | 14 | 1,43 | 23,65 | 3,10 | 42,83 | 3,72 | 81,27 | 4,38 | | |



Obr. 2 Příklad přípravy mikrobiálních vzorků pro měření zákalu během kultivace v kapalných půdách o objemu 5 až 500 ml (MZN – měřič zákalu nápojů)

kultivace kvasinek ve sladidně a mléčných bakterií v půdě MRS.

5.1. Použité kmeny

Při zkušebních měřeních byly testovány mikroorganismy, které se při stacionární kultivaci chovají v kapalném médiu rozdílným způsobem: dobře sedimentující pivovarské kvasinky, které v médiu klesají ke dnu a tvoří usazeninu, naproti tomu bakterie mléčného kvašení, které zůstávají v tekuté živné půdě ve vznosu a tvoří zákal.

Testovaná kvasinka: *Saccharomyces cerevisiae* var. *uvarum* subsp. *carlsbergensis* č. 7 ze sbírky pivovarských kvasinek VÚPS (sbírka je v zájmu zachování biodiverzity podporována grantem MZe ČR).

Testovaná bakterie: izolát ze zakaleného piva, určený v mikrobiologické laboratoři VÚPS a.s. jako *Lactobacillus plantarum*.

5.2. Použité půdy a způsoby kultivace

Pivovarské kvasinky pro pokus byly pomnožovány na sladidnovém agaru. Pro vlastní kultivaci kvasinek byla použita sladina z pivovaru (předek, ředěný na 10% hm.). Vlastní zkouška probíhala při pokojové teplotě.

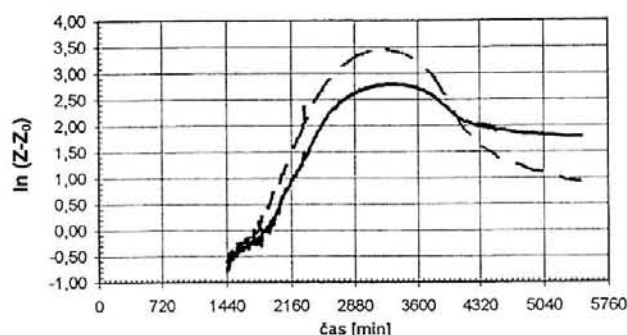
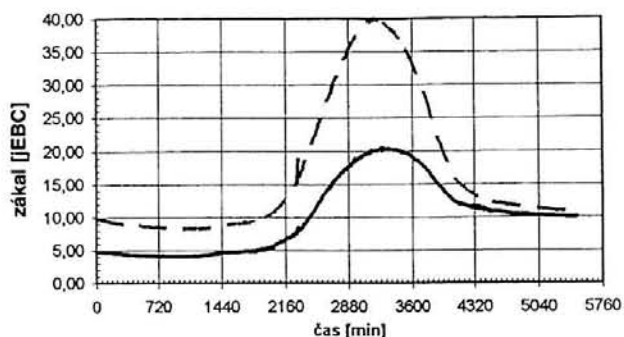
Mléčné bakterie byly namnoženy na MRS agar (DIFCO) s přidávkou aktidionu a β-fenylethanolu [2] v anaerobním prostředí při 28 °C a vlastní test probíhal v MRS bujónu při pokojové teplotě.

5.3. Příprava vzorků

V obou případech byly testované mikroorganismy namnožovány na pevných agarových půdách zaočkováných rozřetrem. Po jejich dostatečném nárůstu byly očkovací kličkou buňky resuspendovány ve velmi malém objemu sterilního fyziologického roztoku. Z této husté suspenze byla následným ředěním připravena suspenze řidší, odpovídající zákalům standardu č. 1 McFarlandovy zákalové stupnice, který odpovídá koncentraci $300 \cdot 10^6$ bakterií/ml nebo $10 \cdot 10^6$ kvasinek/ml [5]. Pomocí této suspenze byla naočkována škála různých koncentrací buněk v příslušných půdách tak, že výchozí koncentrace buněk ve zkumavkách byly přesně definovány. Výchozí koncentrace buněk byla vždy kontrolována rozřetrem na příslušných agarových plotnách a po jejich inkubaci (kvasinky 48 h, 25 °C; bakterie 120 h, 28 °C, anaerobně) byl zjišťován počet narostlých kolonií. Bylo pracováno s těmito koncentracemi buněk: 10^6 /ml, $5 \cdot 10^5$ /ml, $2,5 \cdot 10^5$ /ml, 10^5 /ml a nejnižší výchozí koncentrace byla $5 \cdot 10^4$ /ml.

6. VÝSLEDKY A DISKUSE

Při nefelometrických (i turbidimetrických) měřeních růstových křivek mikroorganismů pozorujeme vesměs nenulové počáteční hodnoty zákalu (resp. i absorbance), jak je patrné z grafů na obr. 3a. Abychom mohli použít k jejich vyhodnocení modelových rovnic (2) až (5) pro průběh exponenciální fáze, musíme tuto skutečnost vzít do úvahy. Nejjednodušeji to učiníme tak, že na osu y vynášíme hodnoty např. přirozených



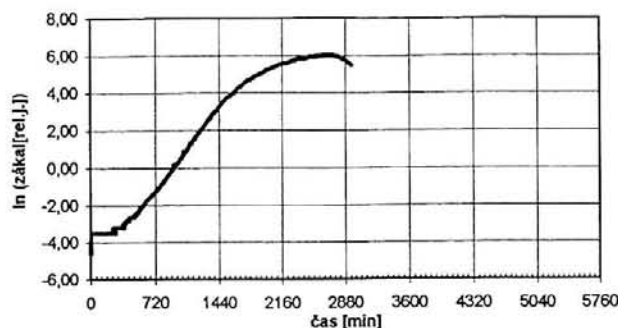
Obr. 3 Příklad výsledků automatického měření růstových křivek kvasnic (*Saccharomyces cerevisiae* var. *uvarum* subsp. *carlsbergensis*) ve sladince při pokojové teplotě. Snímáno ve dvou směrech měření zákalu:

nefelometrickém (Z_{90}) a turbidimetrickém (Z_{15})

s možností vysokého rozlišení růstových parametrů. Počáteční koncentrace: $0,5 \cdot 10^6$ /ml

a) – zákal vynesený v lineární stupnici

b) – vynesený přirozené logaritmy zákalů po odečtení hodnot výchozího zakalení vzorku a přesvitů



Obr. 4 Příklad výsledků automatického měření růstových křivek mléčných bakterií (*Lactobacillus plantarum*) v MRS při pokojové teplotě. V časovém intervalu 720 až 1440 min (12 až 24 h) je zřetelně patrna exponenciální fáze růstu s časem zdvojení 1,86 h.

logaritmů zákalů po odečtení výchozího zákalu Z_0 na počátku inokulace nebo minimální hodnoty zákalu v tzv. lag fázi, tj. např. veličinu $\ln(Z-Z_0)$, jak je ukázáno na obr.3b.

Porovnáním takto vynesených růstových křivek s rovnicí (5) získáme hodnotu specifické růstové rychlosti jako směrnici přímky proložené exponenciální fází růstové křivky např. metodou nejmenších čtverců. Průsečík této přímky s osou času udává teoretickou neboli modelovou hodnotu logaritmu zákalu související s výchozí koncentrací inokula, jak udává rovněž rovnice (5).

Hodnocení vlastního průběhu modelo-

vých růstových křivek kvasnic na obr.3 přesahuje rámec této metodické studie. Zde pouze poznamenejme, že nenákladná nefelometrická měření umožňují sládkům posoudit řadu významných růstových faktorů pивovarských kvasnic v praktických produkčních podmínkách moderních pivovarských technologií (viz např. [6]). K tomuto účelu je výhodné použít měření zákalu ve dvou směrech rozptýleného světla s možností posouzení změn rozměrů zákalotvorných částic, jak jsme popsali v práci [7]. Růstové křivky kvasnic ukázané na obr.3 byly naměřeny pomocí zákaloměru popsaného

v [7] v režimu automatického záznamu dat ve dvou úhlech měření zákalu Z_{90} a Z_{15} .

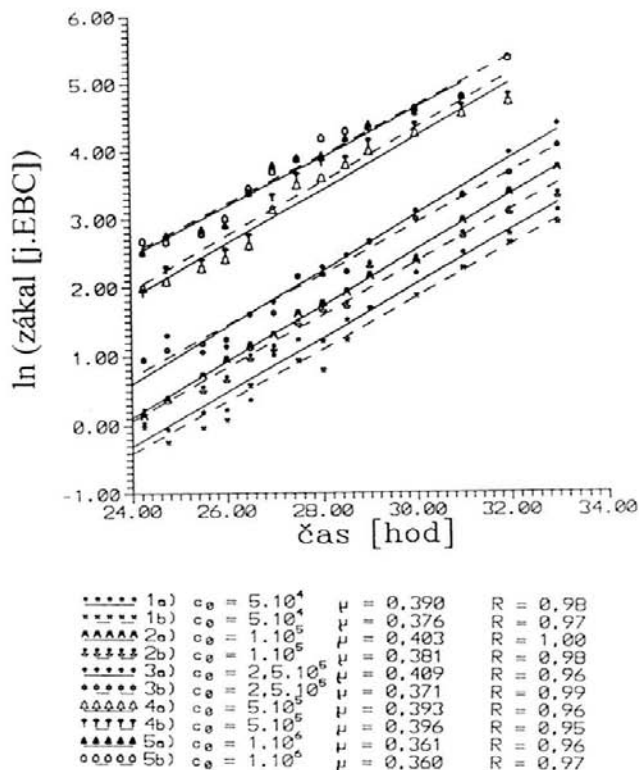
Pomocí zjednodušeného automatického nefelometru jsme naměřili modelové růstovou křivku mléčných bakterií v půdě MRS ukázanou na obr.4. Na tomto obrázku je zřetelně patrna exponenciální fáze růstu v časovém intervalu 12 až 24 h s časem zdvojení 1,86 h. Jestliže tento čas zdvojení extrapolujeme na jednotkovou výchozí koncentraci, můžeme očekávat pomocí nefelometrických měření průkaz velmi malých koncentrací mléčných bakterií již v časech kratších než 36 hodin, což má velmi užitečný praktický význam.

Výše uvedený závěr potvrzují i výsledky nefelometrických měření růstu mléčných bakterií v MRS při různých počátečních hodnotách inokulace uvedené na obr.5.

Z metodického hlediska je významné, že tato měření byla provedena pomocí ručního záznamu dat v podobě tab. 1. To umožňuje použití nenákladných nefelometrických měření k poměrně rychlému stanovení kontaminace piva a pivovarských meziproduktů i v malých pivovarech s velkou přesností, o čemž svědčí vysoké hodnoty korelačního koeficientu R na obr.5. Z obr.5 je rovněž patrný určitý pokles specifické růstové rychlosti μ pro vyšší výchozí koncentrace inokula.

Z ekonomických důvodů jsou nefelometry či jiné typy fotometrů pro měření zákalu konstruovány tak, že umožňují v jednom časovém okamžiku měření pouze jedné kvety či zkumavky se vzorkem. Z těchto důvodů lze měřit více vzorků pouze v určité časové posloupnosti, jak je patrné z příkladu vzorové tab. 1. V případě ekonomické nutnosti resp. výhodnosti lze tato měření mechanizovat např. pomocí automatického vkladáče resp. měniče vzorků. V běžné laboratorní praxi a v souladu se získanými výsledky plně postačí ruční výměna vzorků např. ve zkumavkách umístěných na stojanech po dobu kultivace ve standardním laboratorním termostatu. Ve zvolených časových intervalech se tyto vzorky vkládají postupně do měřicí komory nefelometru a během několika sekund se odečítají naměřené hodnoty zákalu a zapisují do tabulky k dalšímu vyhodnocení. Přitom se k průkazu bakteriální kontaminace s výhodou používá porovnávacích měření např. na počátku inokulace a dále v cca 6 až 12 h intervalech. Jsou-li růstové zkoušky zahájeny např. na počátku ranní směny, lze v průběhu druhého pracovního dne vesměs očekávat průkaz kontaminace. To platí zvláště o kultivacích přes soboty a neděle.

Při zkoumání resp. hledání účinných kultivačních médií lze s výhodou použít jednorázová měření s automatickým záznamem vývoje zákalu v jediném vzorku v měřicí komoře nefelometru, jejíž teplota je např. pomocí trubkového výměníku udržována běžným kapalinovým termostatem na zvolené teplotě (viz položka 8 na obr.1). Uvedeným způsobem lze účinně zapsat pomocí standardního osobního počítače a vhodného pro-



Obr. 5 Příklad grafického zpracování výsledků „ručního“ záznamu exponenciální fáze růstových křivek mléčných bakterií (*Lactobacillus plantarum*) pro různé počáteční koncentrace inokula c_0 [1/ml]. Měřeno za pokojové teploty (cca 23 °C). Z průběhu grafů je patrná vysoká přesnost stanovení specifické růstové rychlosti μ [1/h] umožňující rozlišit její koncentrační závislost (viz legenda).

gramu celý průběh růstových křivek, jak je ilustrováno v příkladu na obr. 3 a 4. Automatická měření lze opět s výhodou provádět přes noc nebo přes víkend.

7. ZÁVĚR

V předložené práci jsme uvedli několik příkladů měření časových změn zákalu při jednorázových kultivacích mikroorganismů

a jejich využití k mikrobiologické kontrole v pivovarnství.

Výsledky získané v této práci ukazují, že již pomocí nenákladných měřicích zařízení lze tradiční mikrobiologické metody v pivovarské laboratoři nahradit metodami nefelometrickými, objektivizovat je a účinně využívat k poměrně rychlé mikrobiologické kontrole. K výše uvedeným měřením lze s výhodou použít např. pivovarských laboratorních zákaloměrů [7], které umožňují v doplněné sestavě dle obr.1 měřit zákal vzorků nejen v uzavřených komerčních lahvích či speciálních velkoobjemových kyvetách, ale zvláště pak v běžných chemických zkumavkách o průměru 15 až 20 mm a objemu vzorků 5 až 10 ml. Díky tomu lze provádět rutinní a poměrně rychlé mikrobiologické zkoušky piva a pivovarských mezuproduktů nefelometricky v mnohonásobných objektivních a statisticky významných sériích.

LITERATURA

- [1] SIKYTA, B.: Metody technické mikrobiologie, SNTL Praha, 1978
- [2] ŠAVEL, J.: Mikrobiologická kontrola v pivovarech, SNTL Praha, 1980
- [3] KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, A., TOMÁŠEK, K., ONDRIŠKOVÁ, M.: Biologická kontrola výroby piva a nealkoholických nápojů
- [4] HOLLEROVÁ, I.: Kvasny Prum. 44, 1998, s. 67
- [5] BALOWS, A., et al.: Manual of Clinical Microbiology, Fifth Edition, Am.Soc.of Microbiology, Washington, 1991
- [6] ŠAVEL, J.: Kvasny Prum. 44, 1998, s. 5
- [7] GABRIEL, P. et al.: Kvasny Prum. 40, 1994, s. 203

Lektorovala: Ing. Věra Hönigová
Do redakce došlo 15. května 1998