

DOPLNOK K MRS MÉDIU NA KULTIVÁCIU NIEKTORÝCH PIVU ŠKODLIVÝCH BAKTÉRIÍ

SUPPLEMENTATION TO THE MRS MEDIUM FOR THE CULTIVATION OF FASTIDIOUS BEER SPOILAGE BACTERIA

ANDRÉ GILLET, MARIE-HÉLÈNE DUPUCHE, NICOLAS VELINGS, SOPURA SA Rue de Trazegnies, 199.B-6180 Courcelles/Belgicko, chemlab@sopura.com.

Gillet, A. – Dupuche, M.-H. – Velings, N.: Doplnok k MRS médiu na kultiváciu niektorých pív škodlivých baktérií. Kvasny Prum. 50, 2004, Nr. 7-8, s. 221–223.

Rýchla detekcia a kultivácia špecifických pív škodlivých baktérií je vždy tak trochu problém a nie je vždy uspokojivo vyriešený, zvlášť pre niektoré druhy *Lactobacillus* a *Pediococcus*. Tento článok prezentuje nové médium na základe adaptovaného MRS média navrhnutého autormi DeMan, Rogosa & Sharpe v roku 1960. Nové médium je porovnávané z hľadiska veľkosti kolónií na platni a kinetiky rastu v tekutých médiách. Kinetika je sledovaná prostredníctvom optickej hustoty ako aj počtom kolónií tvoriacich jednotiek. Možno povedať, že pomocou nového média môžeme ľahko kultivovať a počítať niektoré z špecifických pív škodlivých baktérií.

Gillet, A. – Dupuche, M.-H. – Velings, N.: Supplementation to the MRS Medium for the Cultivation of Fastidious Beer Spoilage Bacteria. Kvasny Prum. 50, 2004, Nr. 7-8, p. 221–223.

With the new medium, we can easily cultivate and count some of the most fastidious bacterial beer spoilers, at last strains coming from collections.

However, these results give to us a hope to get good performances for the retrieving of the native strains from spoilt beer or yeast. In that case, it will be necessary to add an inhibitor for yeast overgrowing, with the hope that the supplemented medium will retain its good performances for the detection and the growing of spoiling bacteria.

Kľúčové slová: kultivačné médiá, MRS, NBB, pivo škodlivé baktérie, detekčné metódy, *Lactobacillus*, *Pediococcus*
Keywords: culture medium, MRS, NBB, bacterial beer spoilers, detection methods, *Lactobacillus*, *Pediococcus*

1 ÚVOD

Rýchla detekcia a kultivácia špecifických pív škodlivých baktérií bol vždy problém a nie je stále uspokojivo vyriešený zvlášť pre niektoré druhy kmeňov *Lactobacillus* a *Pediococcus*, často striktné adaptované na určitý produkt, alebo určité prostredie.

V snahe vyriešiť tento problém bolo v posledných 30-tich rokoch navrhnutých mnoho viac-menej sofistikovaných kultivačných médií. V tomto príspevku uvádzame tie najvýznamnejšie. MRS, [1], Universal Beer Agar (UBA) [2], VLB-S7 [3], Raka-Ray Lactic Acid Bacteria Medium (RR-3) [4], NBB Medium (NBB) [5], Modified NBB Medium (NBBM1) [6], Modified NBB Medium (NBBM2) [7], a KOT Medium s aktidiómom a azidom (KOT) [8].

Všetky tieto médiá majú svoje silné a slabé stránky. Všetky sú výsledkom kompromisu medzi selektivitou, citlivosťou a rýchlosťou rastu. Niektoré kmene rastú lepšie v niektorých médiách a veľmi pomaly alebo vôbec v iných. V súčasnosti nemožno doporučiť ideálne médium bez obmedzenia pre všetky kmene.

Hlavnými problémami, na ktoré sa v tejto súvislosti naráža s niektorými zvlášť citlivými kmeňmi, je dĺžka inkubácie, v niektorých prípadoch viac ako sedem dní, a veľkosť kolónií, spôsobujúcich problémy pri ich počítaní.

To je dôvod, prečo sa musí vynaložiť toľko úsilia pri hľadaní špecifického média, ktoré je najlepšie vhodné pre dané (lokálne) podmienky. V súčasnosti sa originálne NBB médium stáva viac a viac štandardom pre pivovary.

V našom laboratóriu, kde testujeme účinnosť dezinfekčných prípravkov, sú tekuté médiá, na ktorých dochádza k rýchlemu rastu, resp. vytváraniu veľkých kolónií na pevných médiách, veľmi dôležité. V tomto smere nevyhovovali ani klasické MRS ani NBB médium. To bol dôvod, prečo sme sa pokúsili vyvinúť nové kultivačné médium, nazývané v tomto článku MRS B+, ktoré by sa ľahko pripravovalo, nebolo drahé, dávajúce rýchly rast, v prípade agaru aj veľkých kolónií, bolo dostatočne univerzálne pre všetky druhy laktobacilov a pediokokov.

2 MATERIÁL A METÓDY

2.1 Bakteriálne kmene

Kmene použité v týchto testoch boli *Lactobacillus brevis* DSM 1268, *Lactobacillus brevis* DSM 6235, *Lactobacillus lindneri* DSM 20691, *Lactobacillus parabuchneri* DSM 5708, *Lactobacillus* sp. DSM 6265, *Pediococcus damnosus* ATCC 43013, *Pediococcus inopinatus* ATCC 49902 a *Pediococcus inopinatus* DSM 20872. Všetky kmene boli získané z oficiálnych zbierok. Boli izolované

Gillet, A. – Dupuche, M.-H. – Velings, N.: Ergänzung zum MRS Medium zur Kultivierung obligat bierversäuernder Bakterien. Kvasny Prum. 50, 2004, Nr. 7-8, S. 221–223.

Der schnelle Nachweis und die Kultivierung der spezifisch Bier verderbenden Bakterien stellte schon immer ein Problem dar und ist noch immer für einige der am meisten obligaten *Lactobacillus*- und *Pediococcus* spezialisiert. Diese Abhandlung stellt ein neues Medium vor, welches auf einer Adaptation eines MRS Medium, welches von DeMan, Rogosa & Sharpe 1960 vorgestellt wurde, basiert. Das neue Medium wird bezüglich der Koloniengröße auf Platten und der Wachstumskinetik in flüssigen Medien verglichen. Die Kinetik wird anhand der optischen Dichte so wie einer cfu Zahlung verfolgt. Abschließend können wir sagen, dass man mit dem neuen Medium leicht einige der am meisten bierversäuernden Bakterien kultivieren und zählen können.

Гиллет, А. – Дупухе, М.-Г. – Велингс, Н.: Дополнение к среде MRS для культивирования некоторых пиву вредных бактерий. Kvasny Prum. 50, 2004, No. 7–8, стр. 221–223.

Быстрое определение и культивирование бактерий вредных пиву представляет собой до сих пор не вполне решенную проблему, особенно в случае некоторых рас *Lactobacillus* и *Pediococcus*. В настоящей статье описывается новая среда, которая основана на адаптации среды MRS, предложенной в 1960 г. DeMan, Rogosa and Sharpe. Новая среда сравнивается с точки зрения величины колоний на плитке и кинетики роста в текущих средах. Исследование кинетики проводится посредством оптической плотности и количеством единиц образующих колонии (cfu). Новая среда позволяет нетрудно культивировать и подсчитывать некоторые специфические пиву вредные бактерии.

z piva, kvasníc (z výnimkou *P. damnosus*, ktorý bol izolovaný z vína).

2.2 Kultivačné médiá a podmienky

Potenciálne nové médium MRS B+ bolo testované a porovnávané s dvomi klasickými médiami NBB a predchodca všetkých médií pre laktobacily, MRS Médium (De Man, Rogosa and Sharpe 1960). Všetky médiá boli testované v tekutej forme a na agare (prídavkom 30 g/l agaru).

Dodávateľia médií a príprava:

MRS médium: Biokar Diagnostic, Beauvais, Francúzsko

Agar: Biokar Diagnostic, Beauvais, Francúzsko

NBB médium: Döhler Group Darmstadt, NemECKO, pripravené z prášku NBB-P a prídavku 50 % piva a 50 % vody
MRS B+ : pripravené z klasického MRS média obohatené o rozličné cukry a rastové faktory s prídavkom 10% piva.

Médiá boli skúmané v troch hlavných smeroch:

- Rast na povrchu v aeróbných podmienkach
- Rast na povrchu v anaeróbných podmienkach, anaeróbný valec vybavený Merck's Anaerocult. Prístroj udržiavajúci anaeróbnú atmosféru s 18–19 % CO₂
- Kinetika rastu v tekutých médiách.

3 VÝSLEDKY

3.1 Veľkosť kolónií

Tab. 1 ukazuje priemer priemerov kolónií v mm na povrchu v Petriho miskách pozorovaných po štvordňovej inkubácii pri 28 °C za aeróbných a anaeróbných podmienok.

Tab. 2 ukazuje priemer priemerov kolónií v mm podpovrchových kolónií v Petriho miskách pozorovaných po štvordňovej inkubácii pri 28 °C za aeróbných a anaeróbných podmienok.

Hodnotenie médií, čo sa týka veľkosti kolónií, je vo všetkých prípadoch rovnaké:

$$\text{MRS B+} > \text{MRS} > \text{NBB-P}$$

3.2 Kinetika rastu v tekutých médiách

3.2.1 Rast stanovený na základe optickej hustoty

Porovnanie MRS média s MRS B+ médiom bolo na základe rastových kriviek ako závislosti absorpcie od času pri 660 nm.

Obr. 1–4 ukazujú porovnanie rastových kriviek médií MRS a MRS B+ pre kmene *Lactobacillus brevis* DSM 1268, *Lactobacillus* sp. DSM 6265, *Pediococcus inopinatus* DSM 20872, *Lactobacillus lindneri* DSM 20691.

Porovnaním rastu v tekutých médiách sa ukazujú významné rozdiely medzi testovanými druhmi a testovanými médiami. K uľahčeniu porovnania sme v tab. 3 uviedli OD (optická hustota) po 10, 15, 20 a 25 hodinách rastu.

Tab. 3. Zmena optickej hustoty tekutých rastových médií MRS a MRS B+ medzi 10. až 25. hodinou inkubácie pri 28 °C

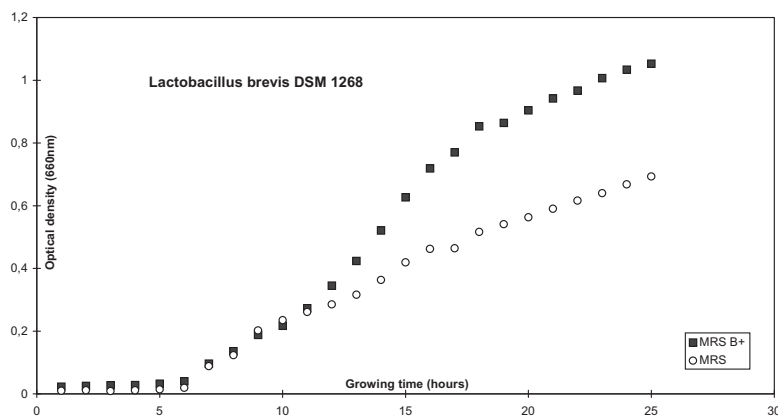
Kmeň	Inkubačný čas [h]	MRS	MRS B+
<i>L. brevis</i> DSM 1268	10	0,235	0,217
	15	0,419	0,627
	20	0,563	0,904
	25	0,693	1,053
<i>L. brevis</i> DSM 6235	10	1,335	1,402
	15	1,502	1,549
	20	1,607	1,576
	25	1,575	1,621
<i>L. lindneri</i> DSM 20691	10	0,240	0,420
	15	0,404	1,060
	20	0,699	1,311
	25	1,014	1,470
<i>L. parabuchneri</i> DSM 5708	10	0,243	0,380
	15	0,577	1,007
	20	0,992	1,446
	25	—	—
<i>L.sp.</i> DSM 6265	10	0,099	0,214
	15	0,365	0,629
	20	0,461	0,907
	25	0,649	0,990
<i>P. damnosus</i> ATCC 43013	10	1,305	1,392
	15	1,502	1,539
	20	1,547	1,616
	25	—	—
<i>P. inopinatus</i> ATCC 49902	10	1,167	1,280
	15	1,460	1,487
	20	1,647	1,596
	25	—	—
<i>P. inopinatus</i> DSM 20872	10	0,268	0,238
	15	0,395	0,867
	20	0,936	1,330
	25	—	—

Tab. 1 Priemer priemerov povrchových kolónií v mm na Petriho miskách po štvordňovej inkubácii pri 28 °C v aeróbných a anaeróbných podmienkach

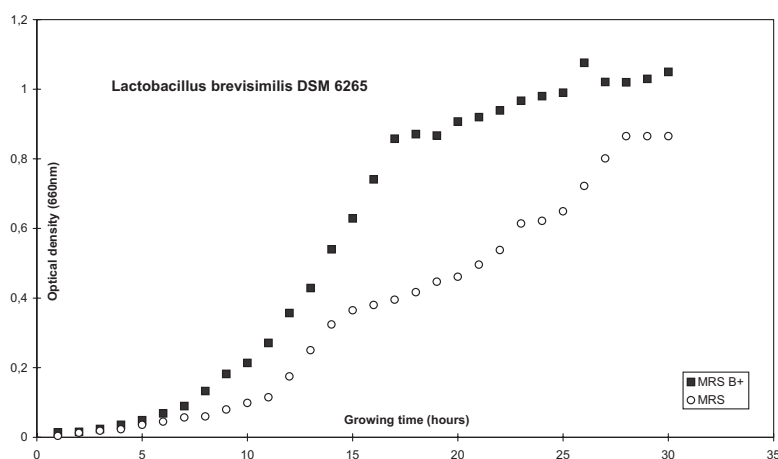
	Aeróbne podmienky [mm]			Anaeróbne podmienky [mm]		
	MRS med.	NBB-P med.	MRS B+ med.	MRS med.	NBB-P med.	MRS B+ med.
<i>L. brevis</i> DSM 1268	1,0	1,0	1,5	2,0	0,5	2,0
<i>L. brevis</i> DSM 6235	1,5	0,5	2,0	1,6	0,5	1,6
<i>L. lindneri</i> DSM 20691	0,5	1,0	1,5	1,5	1,0	2,0
<i>L. parabuchneri</i> DSM 5708	1,0	0,2	2,0	2,0	0,5	2,0
<i>L.sp.</i> DSM 6265	1,5	0,5	1,5	2,0	0,8	2,0
<i>P. damnosus</i> ATCC 43013	1,5	0,5	2,0	1,5	< 0,1	2,0
<i>P. inopinatus</i> ATCC 49902	0,5	< 0,1	0,5	1,0	< 0,1	1,5
<i>P. inopinatus</i> DSM 20872	0,7	0,2	1,0	1,0	0,5	1,5

Tab. 2 Priemer priemerov podpovrchových kolónií v mm na Petriho miskách po štvordňovej inkubácii pri 28 °C v aeróbných a anaeróbných podmienkach

	Aeróbne podmienky [mm]			Anaeróbne podmienky [mm]		
	MRS med.	NBB-P med.	MRS B+ med.	MRS med.	NBB-P med.	MRS B+ med.
<i>L. brevis</i> DSM 1268	1,0	0,5	1,0	1,2	0,5	1,0
<i>L. brevis</i> DSM 6235	1,3	0,3	1,3	2,0	0,4	2,0
<i>L. lindneri</i> DSM 20691	0,5	0,5	1,0	0,5	0,5	1,0
<i>L. parabuchneri</i> DSM 5708	0,8	0,5	1,0	0,5	0,5	1,0
<i>L.sp.</i> DSM 6265	1,0	0,5	1,2	1,0	1,2	1,0
<i>P. damnosus</i> ATCC 43013	1,3	0,3	1,3	1,8	0,3	1,8
<i>P. inopinatus</i> ATCC 49902	1,0	0,1	1,0	1,0	0,1	1,0
<i>P. inopinatus</i> DSM 20872	1,0	0,3	0,8	1,0	0,5	1,0



Obr. 1 Rastová krivka *Lactobacillus brevis* DSM 1268. Otvorené krúžky sú pre MRS médium a tmavé štvorce sú pre nové MRS B+ médium



Obr. 2 Rastová krivka *Lactobacillus* sp. DSM 6265. Otvorené krúžky sú pre MRS médium a tmavé štvorce sú pre nové MRS B+ médium

Tab. 4 Rast populácie (ktj) v tekutých rastových médiách MRS B+ a NBB medzi 0. až 72. hodinou inkubácie pri 28 °C

Kmeň	Inkubačný čas [h]	MRS B+	NBB
<i>L. brevis</i> DSM 1268	0	$8,9 \times 10^6$	$8,9 \times 10^6$
	20	$1,6 \times 10^6$	$1,6 \times 10^7$
	25	$7,0 \times 10^8$	$3,3 \times 10^7$
	30	$8,0 \times 10^8$	$3,4 \times 10^7$
	41	$1,0 \times 10^9$	$3,7 \times 10^7$
	72	–	$4,2 \times 10^7$
<i>L. brevis</i> DSM 6235	0	$2,7 \times 10^7$	$2,7 \times 10^7$
	10	$1,2 \times 10^9$	$2,1 \times 10^8$
	15	$2,0 \times 10^9$	$3,0 \times 10^8$
	20	$7,0 \times 10^9$	$3,2 \times 10^8$
	48	$3,8 \times 10^9$	$3,4 \times 10^8$
<i>L. lindneri</i> DSM 20691	0	$4,1 \times 10^8$	$3,4 \times 10^8$
	20	$7,6 \times 10^8$	$3,7 \times 10^8$
	25	$9,1 \times 10^8$	$4,3 \times 10^8$
	30	$1,6 \times 10^9$	$4,6 \times 10^8$
	41	$3,5 \times 10^9$	$6,7 \times 10^8$
	48	$6,8 \times 10^9$	$6,7 \times 10^8$
<i>L. parabuchneri</i> DSM 5708	0	$7,6 \times 10^6$	$7,6 \times 10^6$
	20	$6,0 \times 10^8$	$6,2 \times 10^7$
	25	$1,8 \times 10^9$	$1,7 \times 10^8$
	30	$1,7 \times 10^6$	$2,0 \times 10^8$
	41	$2,9 \times 10^9$	$3,4 \times 10^8$
	72	–	$8,3 \times 10^8$
<i>L.sp.</i> DSM 6265	0	$8,9 \times 10^5$	$8,9 \times 10^5$
	20	$3,2 \times 10^7$	$8,2 \times 10^6$
	25	$1,1 \times 10^8$	$6,5 \times 10^7$
	30	$1,2 \times 10^8$	$7,0 \times 10^7$
	41	$1,5 \times 10^8$	$7,5 \times 10^7$
	72	–	$1,0 \times 10^8$
<i>P. damnosus</i> ATCC 43013	0	$1,3 \times 10^7$	$1,3 \times 10^7$
	10	$5,6 \times 10^7$	$3,0 \times 10^7$
	15	$2,3 \times 10^8$	$3,8 \times 10^7$
	20	$7,3 \times 10^8$	$1,1 \times 10^8$
	48	$2,6 \times 10^8$	$2,8 \times 10^8$
<i>P. inopinatus</i> ATCC 49902	0	$9,6 \times 10^5$	$9,6 \times 10^5$
	10	$1,1 \times 10^6$	$2,5 \times 10^6$
	20	$7,5 \times 10^7$	$7,7 \times 10^6$
	30	$1,3 \times 10^8$	$3,5 \times 10^7$
	42	$2,0 \times 10^8$	$6,6 \times 10^7$
<i>P. inopinatus</i> DSM 20872	0	$9,4 \times 10^5$	$9,4 \times 10^5$
	10	$4,2 \times 10^6$	$8,0 \times 10^6$
	20	$1,4 \times 10^7$	$8,0 \times 10^6$
	30	$6,8 \times 10^7$	$2,4 \times 10^7$
	42	$1,9 \times 10^8$	$8,3 \times 10^7$

Výhody MRS B+ pred MRS môžu byť klasifikované v dvoch prípadoch v závislosti od kmeňa.

- Takmer identické krivky *L. brevis* DSM 6235, *P. damnosus* ATCC 43013 a *P. inopinatus* ATCC 49902.
- Markantný rozdiel v raste *L. brevis* DSM 1268, *L. lindneri* DSM 20691, *L. parabuchneri* DSM 5708, *L. sp.* DSM 6265 a *P. inopinatus* DSM 20872.

V ďalšej skupine sme našli špecifické ťažko rastúce kmene piva škodlivých baktérií.

3.2.2 Rast stanovený na základe počítania kolónií ktj (cfu)

Rast na NBB médiu nie je možné sledovať pomocou zmeny absorpcie, nakoľko obsahuje nerozpustné častice. Rast na tomto médiu bol stanovený ako závislosť ktj od času in-

kubácie a pre porovnanie rovnako aj pre MRS B+ médium.

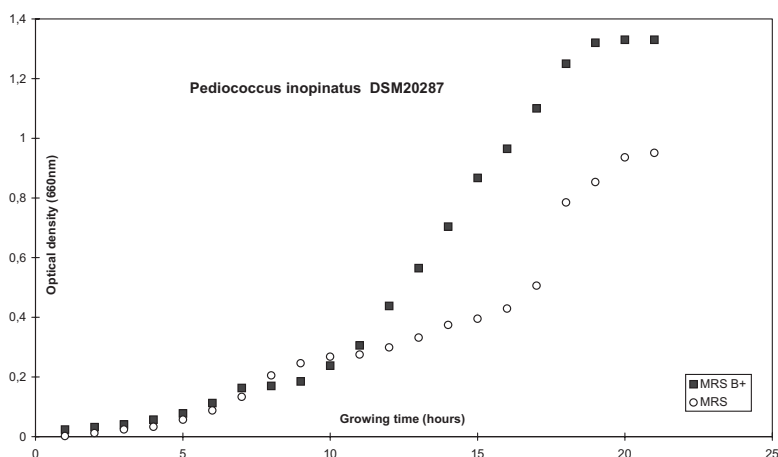
Výsledky sú uvedené v tab. 4.

V tomto prípade sú detegované len žijúce organizmy.

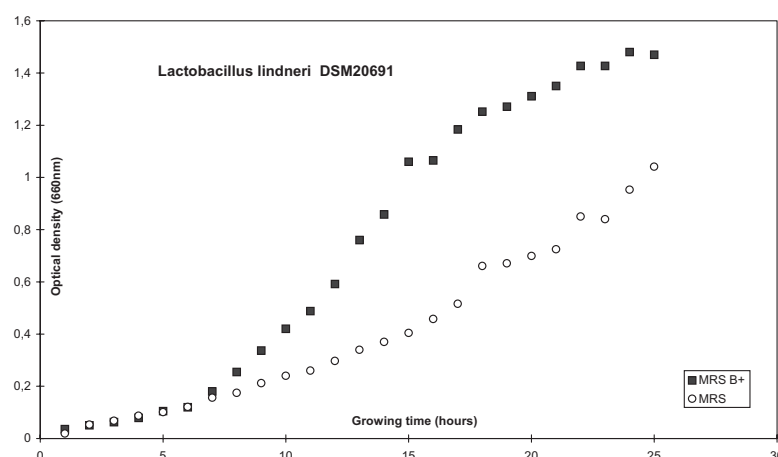
4 ZÁVER

Pomocou nového média môžeme ľahko kultivovať a počítať niektoré špecifické pivo škodlivé baktérie.

Jednako tieto výsledky dávajú nádej na dobré výsledky na získanie natívnych kmeňov z pokazeného piva alebo kvasníc. V tomto prípade je nevyhnutné pridať inhibítor zabráňujúci prerastaniu kvasníc s tým, že obohatené médium by si malo zachovať svoje dobré vlastnosti pre detekciu a rast piva škodlivých baktérií.



Obr. 3 Rastová krivka *Pediococcus inopinatus* DSM 20287. Otvorené krúžky sú pre MRS médium a tmavé štvorce sú pre nové MRS B+ médium



Obr. 4 Rastová krivka *Lactobacillus lindneri* DSM 20691. Otvorené krúžky sú pre MRS médium a tmavé štvorce sú pre nové MRS B+ médium

Literatúra

- [1] DeMan, J. D., Rogosa, M., Sharpe, M. E.: J. Appl. Bacteriol. **23**, 1960, s. 130–135.
- [2] Kozulis, J. A., Page, H. E.: Proc. Am., Soc. Brew. Chem., 1968, s. 52–58.
- [3] Emeis, C. C.: German Federal Republic Patent Application No. 1 673 280, 1972.
- [4] Saha, R. B., Sondag, R. J., Middlekauf, J. E.: Proc. Am., Soc. Brew. Chem. **5**, 1974 (1), s. 9–10.
- [5] Back, W.: Brauwelt **120**, 1980(43), s. 1562–1569.
- [6] Nishikawa, N., Kohgo, M.: Tech. Q. Master. Brew. Assoc. Am. **22**, 1985, s. 61.
- [7] Kindraka, J. A.: Tech. Q. Master. Brew. Assoc. Am. **24**, 1987, s. 146–151.
- [8] Taguchi, H., Ohkochi, M., Uchara, H., Kojima, K., Mawatari, M.: J. Am., Soc. Brew. Chem. **48**, 1990, s. 72–75.

Přeložil Ing. Miroslav Veselovský
Anglický originál: Monatsschrift für
Brauwissenschaft **56**, 2003 (1/2), s. 10–14
Vydáno se souhlasem redakce