

Použitie aktidiónu v diferenciačnej diagnostike mikrobiologickej kontroly kvasiniek

JÁN ARPAI, VÁCLAV STUCHLÍK

Výskumný ústav potravinárskeho priemyslu, Bratislava

663.13

Metabolizmus, rastové požiadavky a fyziológiu pekárskych (*Saccharomyces cerevisiae*) a pivovarských (*S. carlsbergensis*) kvasiniek možno z mnohých hľadíšť uviesť na spoločného menovateľa. Zhodujú sa aj mierou ohrozenia znečistujúcimi infekčnými mikroorganizmami, ktoré môžeme rozdeliť na tri hlavné skupiny, t. j. na divoké kvasinky, plesne a baktérie. Predovšetkým sú to baktérie, ktoré znečisťujú kvasinkové kultúry, resp. výrobky, sú schopné tieto atakovať a znehodnocovať. Infikované kvasinky majú často narušenú enzymatickú činnosť, čo môže viesť k väzým technologickým poruchám v takých výrobných odvetviach, ktoré sú založené na životnej činnosti kvasiniek, najmä v droždiarenstve, v pivovarníctve i v pekárenstve (9). Preto sa v praxi k rýchľemu určovaniu mikrobiologickej akostí kvasiniek vyžaduje citlivá a pritom pomerne ľahko uskutočniteľná analytická metóda.

Dosiel používané metódy mikrobiologickej kontroly kvasiniek spočívali na dvoch princípoch. Prvý predstavuje metóda priameho mikroskopického sledovania ako rýchly orientačný test. Druhý princíp je kultivačný, ktorý má umožniť už dôkladnejši rozbor kvantitatívnych i kvalitatívnych mikrobiologických pomerov vo vzorke. Mikroskopické sledovanie, ktoré sa často aj dnes v teréne obmedzuje na vyšetrovanie kvasničného materiálu vo vysiacej kvapke Lindnerovej komôrky, nemôže prirodzene dávať spoloahlivé výsledky ani čo do kvantity. Ani zdokonalená, resp. spresnená modifikácia, pri ktorej sa používa počítacia komôrka podľa *Bürkera* alebo *Thoma*, neumožňuje rozoznávať živé mikróby od neživých. Kvantitatívne údaje sú pritom nekontrolovatelné skreslené zatlačovaním tej časti mikroflóry, ktorá má horšie predpoklady rastu vo vzorke počas testu, kde najmä do-

minujúce kvasinky premôžu baktérie. Takto stanovené výsledky treba brať s určitou rezervou aj preto, že vyšetrená časť vzorky, ktorá pri jednom vyšetrení má maximálny objem 0,01 ml, z hľadiska matematicko-štatistikého predstavuje len veľmi úzky výber, nezaručujúci požadovanú reprezentatívnosť, čo sa odráža v malej miere reprodukovateľnosti. Pri dosiaľ používanej metóde priameho mikroskopického sledovania bola by predpokladom reprodukovateľných výsledkov koncentrácia analyzovanej vzorky o 30 000 mikroorganizmov na 1 ml. Pre kultivačné skúšky by za tých istých podkladov počtu pravdepodobnosti stačila však už vzorka o tisícinásobne menšej koncentrácií na to, aby výberová časť základného súboru údajov mala reprezentatívny charakter, čiže aby vyhodnotenie údaje mohlo byť pokladané za spoloahlivé [4]. Uvedená výhoda kultivačnej metódy je však čo do pracovného času a techniky zafázená podstatne väčšími požiadavkami, preto neobstojí tam, kde treba počas prevádzky mikrobiologickej pomery zbežne kontrolovať.

Ako vyplýva z uvedeného náčrtu problematiky, treba hľadať nové formy identifikačnej a diferenciačnej diagnostiky, ktoré by boli v menšej miere zafázené spomenutými nedostatkami. Preto sa skúšajú rozličné elektívne kultivačné podmienky, najmä také, ktorými sa potlačuje rast kvasiniek, pričom sa však neinhibuje znečisťujúca mikroflóra, najmä baktérie, ktoré sú ako sme už spomenuli, najväčším nebezpečenstvom pre výrobnú technológiu a akosť výrobku.

Pri skúškach sa vychádzalo zo skúseností s jednoduchými úpravami kultivačnej pôdy. Diferenciácia média podľa obsahu chmeľu postačila na to, aby sa dosiahlo oddeľovanie gram-negatívnych

octových baktérií a termobaktérií od gram-pozitívnych kokov a laktobacilov, ktoré sú pomerne citlivé na antiseptické účinky chmeľu. V diferencovačích skúškach sa pokračovalo použitím bifluoridov ako inhibičného prípadku do živných pôd. Skúšal sa najmä amóniumbifluorid ako inhibitor rastu kvasiniek. Uspokojivé výsledky boli však dosiahnuté iba aplikáciou antibiotických substrátov.

Z antibiotických látok inhibujúcich špecifickým spôsobom rast kvasiniek osvedčil sa pre účely diferenciačnej diagnostiky predovšetkým aktidión. Toto antibiotikum, označované aj ako cykloheximid, je fermentačným produkтом určitých kmeňov *Streptomyces griseus*, používaných pri výrobe streptomycinu [2]. Prvú vzorku aktidiónu s informatívnymi údajmi o jeho aplikačných možnostiach sme získali zo zahraničia [8]. Avšak krátko nato dodal nám na našu žiadosť prepáčiť aktidiónu vlastnej výroby Výskumný ústav antibiotik v Roztokách pri Prahe. Podľa titračného stanovenia antibiotickej aktivity sme zistili, že obidva preparáty majú prakticky rovnakú inhibičnú účinnosť vôči kvasinkám. Fungistatická koncentrácia pre *Saccharomyces cerevisiae* bola určená na približne 2 mikrogramy/ml, pričom výsledky dosiahnuté s jednotlivými preparámi nevybočili z rozprácia $\pm 20\%$. Na proti tomu ani koncentrácia jedného mg/ml neinhivovala rast a rozmnrozenie *Lactobacillus pastorianus* a *Pediococcus* sp. (pivné koky).

Podľa informácií, ktoré sme dostali o pracovnom postupe diferenciačnej diagnostiky za použitia aktidiónu (zavedenom vo Versuchsanstalt für Gärungsgewerbe, Wien), vypracovali sme si pre kontrolnú prax dve aplikačné formy, resp. pracovné etapy, ktoré organicky na seba nadväzujú a dopĺňajú sa. Prvá predstavuje modifikáciu priameho mikroskopického počítania a má charakter kvantitatívnej analýzy. Druhá, spočívajúca na princípe elektívnej kultivácie, umožňuje i kvalitatívne vyhodnocovanie.

Princíp pracovného postupu pri mikroskopickom sledovaní je v tom, že sa kvasinky prítomné v skúšanom materiáli, ktorý sa uvedie do vodnej suspenzie, inhibujú vo svojom množení fungistatickou koncentráciou aktidiónu pridávaného do kultivačného média. Sprevádzajúca, t. j. kvasinky znečišťujúca baktériová mikroflóra, ktorá nie je účinkom aktidiónu dotknutá, rozmnrozenie sa v kultivačnom mediu pri vhodne volenej inkubačnej teplote tak dlho, kým sa nevytvoria mikroskopicky dobre vyhodnociteľné vegetatívne formy. Kvantity, resp. proporcia počtu štandardným spôsobom inhibovaných kvasiniek a rozmnrozených baktérií, sa stanoví pomocou počítacej komôrky a vyhodnocuje sa ako stupeň infekcie vyjadrený v relatívnych percentách. V praxi sa sledovanie baktérií zameriava, po prípadě sa obmedzuje výlučne na rešazcovité útvary, ktorých mikroskopická identifikácia a spočítanie nerobi ľahkosti ani mikrobiologicky menej erudovanému personálu prevádzkovej kontroly, pričom sa však zachovávaním štandardnej metódy dosahujú dobre vyhodnociteľné a porovnávateľné výsledky.

Sám pracovný postup vychádza z prípravy živnej pôdy s antibiotickou zložkou. Ako kultivačné médium používame štandardný mäsopeptónový bujón s prídavkom 5 % glukózy a 3,3 mg % aktidiónu. Tento nás predpis sa opiera o už citovaný prameň (Versuchsanstalt f. Gärgerwerbe, Wien), v ktorom sa uvádzá, že 25 g bujónu pre baktérie podľa Kuczynského Standard I-806/25 (E. Merck, Darmstadt) sa rozpustí v 1000 ml destilovanej vody a pridáva sa 100 g glukózy a 0,033 g aktidiónu. Podľa našich skúseností možno s dobrým úspechom používať i laboratórne pripravený svetlý bujón alebo štandardne pripravenú hotovú pôdu našej výroby (Lachema, n. p. Brno). Prídavok glukózy sme z 10 % pôvodného predpisu znížili na 5 % na základe experimentálnych výsledkov, ktoré svedčia o tom, že každé zväčšovanie glukózy v mediu spomaluje rast a rozmnrozenie mnohých druhov baktérií, čím sa v danom prípade znižuje citlivosť testu [1].

Kultivačná pôda sa rozdelí do skúmaviek po 10 ml a frakčne sa sterilizuje (3×20 minút v prúdiacej pare); pH pôdy sa neupravuje a pohybuje sa asi okolo 7. Tu zdôrazňujeme, že sterilizovaním, t. j. tepлом nestráca aktidión na účinnosť.

Ďalší postup práce sa týka prípravy vodnej suspenzie kvasiniek. Pripraví sa zriedenie s takou koncentráciou, aby sa dosiahli optimálne podmienky pri mikroskopickom sledovaní a počítaní mikróbnych častic v počítacej komôrke. Pri vylisovanom droždi sa na prípravu základnej kvasničnej suspenzie osvedčilo rozemiešať 10 g vzorky v 100 ml destilovanej sterilnej vody. Pri výkvassenom substráte sa kvasničný materiál berie zo sedimentu po dekantácii. Z takto pripravenej kvasničnej suspenzie sa odoberú 2 bakteriologické očká (s priemerom 2 mm) materiálu na zaočkovanie jednej skúmavky obsahujúcej 10 ml elektívnej kultivačnej pôdy. Po dôkladnom zamiešaní substrátu sa skúmavky nechajú 5 hodín inkubovať pri teplote 28°C ($\pm 2^{\circ}\text{C}$), aby sa potom odobral materiál na mikroskopické sledovanie v počítacej komôrke. Volba veľkosti a počtu vyhodnotených poličok môže byť podmienná druhom a koncentráciou vyšetrovanej vzorky, avšak sledovanie sa musí vykonáť v dokonale homogenizovanej suspenzii na takom počte paralelných opakovania, aby priemerné výsledky vyhovovali požiadavkám na základný súbor pri štatistikom vyhodnocovaní. Pre rutinovanú prácu stačí

aplikácia aritmetického priemeru ($\bar{x} = \frac{S(x)}{n}$)

kde $S(x)$ je súčet všetkých variantov x , kym n je počet variantov). Vo výskume sa však odporúča

výpočet strednej chyby priemeru ($s_x = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n-1}}$) a stanovenie relatívnej chyby ϵ podľa

$\epsilon = \frac{100 \cdot t}{\sqrt{S(x)}}$ kde $t = \frac{x - \bar{x}}{s_x}$). Týmto spôsobom možno vopred stanoviť

vít, kolko buniek sa má spočítať, podľa toho, aká chyba je vo výsledku prípustná [3].

Relatívneho ukazovateľa stupňa znečistenia, resp. infekcie v percentách nám udáva výraz:

$$\frac{\text{priemerný počet baktérií}}{\text{priemerný počet kvasiniek}} \cdot 100$$

ktorého hodnotu budeme ďalej označovať *ii* (infekčný index).

Pri laboratórnej práci sme spočítali 96 poličok (6×16) s plochou $1/25 \text{ mm}^2$. V prevádzke boli dobré výsledky aj s vyhodnocovaním menšieho počtu štvorčekov. Napríklad inž. L. Paštka [6] (Kvasný priemysel, n. p. Trenčín) vo svojom referáte o kontrole baktériovej infekcie v lisovanom droždi aktidiónom, ktorú na základe nášho materiálu robil pomocou mikroskopického sledovania, uvádza, že množstvo buniek spočítal v 30 štvorčekoch Thomovej komôrky. Na ilustráciu praktickej aplikácie differenciálnej metódy s priamym mikroskopickým počítaním v priemyselnej praxi uvedieme podrobne výsledky inž. L. Paštka pri kontrole baktériologickej čistoty kvasnej kade v droždiarni, pričom zároveň pripojíme i podrobny postup, podľa ktorého vypočítal stupeň infekcie:

„Kvapku zo zuspenzie nanesieme na plochu komôrky, prikryjeme krycím skličkom tak, aby v preparáte neostali vzduchové bubliny. Počkáme niekoľko minút, aby sa bunky usadili. Až potom začneme s počítaním pri zväčšení 300 až 400krát. V preparáte spočítame množstvo buniek v 30 štvorčekoch (6×5 štvorčekov), upravíme nový preparát a opäť obdobným spôsobom spočítame bunky.

Tabuľka 1

Kvasná kaďa č. 1. hl. č. 77.

Preparát s rozsahom 5 štvorčekov					1 kvasinky	2 baktérie	3 kvasinky	4 baktérie	kvasinky	baktérie
	1	2	3	4						
1	6	1	5	0	3	0	4	1	1	0
2	4	0	4	0	4	1	3	0	0	0
3	3	9	3	0	4	0	5	0	0	0
4	4	0	4	0	5	0	4	0	0	0
5	3	0	3	1	6	1	3	0	0	0
6	9	0	6	0	7	0	8	1	0	0
Priemer súčtov z 5 štvorčekov	4,8	0,16	4,1	0,16	4,8	0,33	4,5	0,33		

Kvas. bakt.

Preparát 1	4,8 — 0,16
Preparát 1 + 2	4,4 — 0,16
Preparát 1 + 2 + 3	4,6 — 0,21
Preparát 1 + 2 + 3 — 4	4,5 — 0,25
Priemer celého počtu	4,5 0,25

Thomova počítacia komôrka má objem $\frac{1}{4000} \text{ mm}^3$.

Pri počítaní prezeráme plochu $\frac{1}{4000} \text{ mm}^3$, v ktorej je:

4,5 kvasničných buniek a 0,25 baktériových buniek, v $\frac{1}{4000} \text{ mm}^3$ je 0,9 kvasničných buniek a 0,05 baktériových buniek,

v 1 mm^3 je $0,9 \times 4000 = 3600$ kvasničných buniek, $0,05 \times 4000 = 200$ baktériových buniek,

Pomer kvasničných buniek k baktériovým bunkám:

$$\frac{3600 : 200 = 100 : x}{x = \frac{200 \times 100}{3600} = 5,5}$$

$$x = 5,5 \%$$

Stupeň infekcie je 5,5 %

Pri seriáloch skúšok z bežnej droždiarenskej prevádzky bol stupeň infekcie v medziach 0 — 3,3 — 6,6 %. Mierne aglutinované droždie malo nižší stupeň infekcie, napríklad:

Hiľenie čís.	Stupeň infekcie v %	Poznámka
75	6,6	
76	4,8	
77	5,5	
78	0,0	mierne aglutinované
88	4,6	
89	0,0	mierne aglutinované
90	3,9	
91	3,3	
Priemer	3,6	

V Trenčíne dňa 29. júna 1956.

Pozoruhodná je iniciatíva inž. L. Paštka, ktorý kvantitatívne výsledky sledovania dopĺňuje kvalitatívnymi údajmi orientačnej povahy, ako je napríklad aglutinácia, pričom hľadá závislosť od stupňa infekcie.

K uvedenému pracovnému postupu treba však poznamenať, že pri výpočtoch možno vychádzať priamo z proporcie priemerneho počtu kvasničných a baktériových buniek, aby sme dostali ten istý percentuálny výsledok pre *ii*, t. j. v danom prípade:

$$4,5 : 0,25 = 100 : x$$

$$x = \frac{0,25 \times 100}{4,5} = 5,5$$

Ako ďalší príklad uvedieme výsledky jednej série rozborov rozličných druhov pekárskeho droždia a vzoriek pivovarských kvasiniek, ktoré O. Janotková a A. Pivodová z mikrobiologického oddelenia Výskumného ústavu potravinárskeho priemyslu v Bratislave vykonali. Výsledky sú zobrazené do tabuľky 2.

Z uvedených príkladov je zrejmé, že už samo mikroskopické sledovanie kombinované s predchádzajúcim elektívnom kultiváciou za použitia antibiotického inhibičného činidla predstavuje užitočný prostriedok pri kontrole mikrobiologických pomerov kvasničného materiálu v praxi. V snahe zdokonaliť a vniest kvalitatívny charakter do tohto postupu vypracovali sme ešte ďalšiu, t. j. druhú etapu sledovania, ktorá je založená na kultivačnom princípe. Obdobne ako pri predchádzajúcej metóde kultivovali sme mikroflóru na elektívnom médiu, iba s tým rozdielom, že sme živnú pôdu používali vo vystuženom stave, čo umožnilo pri-

Tabuľka 2

Č.	Materiál	Kvasinky							Baktérie							ii
		a ¹⁾	b ¹⁾	c ¹⁾	d ¹⁾	e ¹⁾	f ¹⁾	x ¹⁾	1)	b ¹⁾	c ¹⁾	d ¹⁾	e ¹⁾	f ¹⁾	x ¹⁾	
1	pekárske droždie z obchodu	4,3	5,8	3,9	5,2	4,2	4,9	4,71	0,2	0,5	0,0	0,1	0,5	0,0	0,21	4,4
2	pekárske droždie z Viedne v 50 g balení	5,2	5,5	5,8	5,0	4,8	5,5	5,30	0,1	0,8	0,3	0,5	0,4	0,5	0,43	8,1
3	pivné kvasinky z pivovaru A	4,1	4,6	4,3	4,6	4,0	4,8	4,40	0,2	0,0	0,3	0,6	0,0	0,3	0,23	5,2
4	pivné kvasinky z pivovaru B	4,6	5,2	4,3	4,9	5,3	4,5	4,80	0,0	0,1	0,3	0,0	0,1	0,2	0,11	2,2
4	materiál ako pod 1 po ďalšom týždenom skladovaní ³⁾	4,9	5,5	5,3	5,0	4,5	5,2	5,06	0,3	0,8	0,2	0,9	0,8	0,7	0,61	12,0
6	materiál ako pod 2 po ďalšom 2týždenom skladovaní ³⁾	4,5	4,8	5,2	5,8	5,6	5,0	5,15	0,9	1,2	0,7	0,4	0,8	1,0	0,83	16,1

¹⁾ Priemerný údaj o výsledkoch spočítania 16 poličok v rámci 1 opakovania.²⁾ Priemer zo 6 opakovani (6×16 = 96 poličok).³⁾ Doba skladovania počítaná od získania vzorky.

vhodnom zriedení základnej suspenzie získať oddelené kolónie, ktoré bolo možné kvalitatívne a kvantitatívne vyhodnocovať.

Pracovný postup tu opäť vychádza z prípravy živnej pôdy. Jej zloženie môže byť úplne analogické zloženiu použitej tekutej pôdy, pričom sa vystúpenie dosahuje príďavkom agaru, po prípade

Tabuľka 3

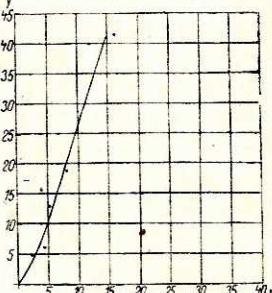
Číslo vzorky	Počet živých kvasiniek v 1 ml štandard. suspenzie	Počet živých baktérií v 1 ml štandard. suspenzie	ii ₁	ii
1	$2,51 \times 10^5$	$0,154 \times 10^5$	6,1	4,4
2	$2,20 \times 10^5$	$0,415 \times 10^5$	18,8	8,1
3	$1,40 \times 10^5$	$0,182 \times 10^5$	13,0	5,2
4	$1,51 \times 10^5$	$0,072 \times 10^5$	4,8	2,2
5	$0,65 \times 10^5$	$0,261 \times 10^5$	40,1	12,0
6	$0,48 \times 10^5$	$0,200 \times 10^5$	41,6	16,1

želatíny. Dobre sa nám osvedčilo pridávanie 0,002 g % brómrezolovej zelene ako indikátora do kultivačného média, ktoré v tomto prípade však musí mať pH upravené na 5,5. Takto zafarbená pôda indikuje zmenou farby kolónie producentov kyselin. Ako kultivačné pôdy sa osvedčili aj rozličné syntetické mediá typu Czapek-Doxa s príďavkom glukózy a kvasničného extraktu [7]. Príprava suspenzie kvasničného materiálu je úplne obdobná ako v predošej etape práce, odporúča sa však pri laboratórnych pokusoch vykonáť štandardizáciu na nefelometrickom základe. V našich pokusoch sme upravovali zákal približne na 50 % absorpciu, pri ktorej koncentrácia mikróbnych častic bola rádovo 10^7 /ml, alebo približne 1 mg/ml. Aj rozočkovanie sa líši len v tom, že obsah skúmaviek zahriatých na 40 °C sa rozleje do Petriho misiek, ktoré sa inkubujú a vyhodnocujú podľa bežných metód sledovania a počítania mikroorganizmov rozlievaním na Petriho miskách. Kolónie vyrásle za obvyklých inkubačných podmienok po-

skytnú východiskový materiál pre podrobnejšie identifikačné práce.

Ak paralelne s kultiváciou na pôdach obsahujúcich aktidiónu stanovíme množstvo živých kvasiniek za obdobných podmienok na pôdach bez aktidiónu, dostávame údaje, z ktorých môžeme vypočítať pomery počtu živých baktérií k počtu živých kvasiniek, ktorý po vynásobení 100 poskytuje ďalšieho ukazovateľa (ii₁). Tento infekčný index, ktorý nám dáva kultivačný test, môže slúžiť na porovnanie s percentuálnymi údajmi získanými na základe mikroskopického pozorovania. V tabuľke 3 uvedieme príklad, na ktorom môžeme porovnať hodnoty pre „ii“ s hodnotami pre „ii₁“. Vzťah týchto hodnôt je graficky vyhodnocovaný interpolovanou krivkou na obr. 1. Z výsledkov vidieť, že sa z hľadiska absolútnych čísel javia podstatné rozdiely medzi údajmi mikroskopických a kultivačných testov, ktoré sú podmienené jednak podielom mŕtvych mikróbnych foriem, jednak špecifickými kultivačnými podmienkami. Avšak obidve metódy poskytujú relatívnych ukazovateľov, kvalitatívne korelovaných, podľa ktorých možno posúdiť mikrobiologickej pomery v kvasničnom materiáli.

Vyhodnocateľnosť porovnávacej metódy možno ešte ďalej zlepšiť tým, že sa na ose x = hodnoty ii do pôdy určenej pre platné, na ose y = hodnoty ii₁ na ktorých sa kultivačne stanovi počet kvasiniek, pridáva antibiotikum opačnej aktivity než aktidión, t. j. antibiotikum, ktoré inhibuje baktérie, avšak neúčinkuje na kvasinky. Napríklad penicilín s koncentráciou približne 5 mg/ml, pridávaný po sterilizácii do pôdy ochladenej na 40 °C, vyčistí kultiváciu od väč-



Obr. 1

šiny baktériových foriem, najmä gram-positívnych a zláhuje tým počítanie kvasničných kolónii.

Ak celkovo zhrnieme svoje skúsenosti s aplikáciou aktidiónu ako elektívneho prostriedku pri diferenciačnej diagnostike mikrobiologickej kontroly pekárskych a pivovarskych kvasiniek, dochádzame k uzáveru, že uvedené jednoduché metódy, výhodné najmä v prevádzkovej praxi, dávajú podľa percentuálnych relatívnych ukazateľov dobré možnosti pre posúdenie mikrobiologických pomerov v kvasničnom materiáli. Vzhľadom na to, že podľa našich informácií [5] domáca výroba antibiotík môže v dostatočnom množstve dodávať aktidión, odporúčame aplikáciu aktidiónového testu ako zručnejšej metódy, po prípade jeho zavádzanie do JAM. Svoje doterajšie skúsenosti, ako aj tie,

ktoré získame priebehom ďalších prác s aktidiónom, v ktorých chceme pokračovať najmä so zreteľom na potreby moderného pekárenstva, dávame pritom ochotne k dispozícii iným pracoviskám.

Literatúra

- [1] ARPAI, J.: O niektorých účinkoch cukornatých roztokov na mikroorganizmy. *Výživa a zdravie* (v tlači), 1956.
- [2] BARON, A. J.: *Handbook of Antibiotics*. New-York, 1950.
- [3] FISHER, R. A.: *Statistical methods for research workers*. London, 1948.
- [4] GREEN, S. R., GRAY, P. P.: A differential procedure applicable to bacteriological investigation in brewing. *Wallerstein Lab. Comm.* 13 : 357, 1950.
- [5] HEROLD, M.: Osobné sdelenie 1956.
- [6] PÁSTEKA, L.: Kontrola baktériovej infekcie v lisovanom droždi aktidiónom, nepublikovaný referát, 1956.
- [7] STRANDSKOV, F. B., BOCKELMANN, J. B.: Microbiological control in beer breweries. *J. Inst. Brewing* 123, 1951.
- [8] STUCHLIK, V.: Nepublikovaná zpráva o služobnej ceste v zahraničí, 1956.
- [9] WITHE, J.: *Yeast technology*. New-York, 1954.