

# Pivovarství a sladařství

## Stanovení baktérií rychle kazících pivo

663.41:578.8

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

### 1. ÚVOD

Bakteriální kontaminace představuje zejména v letních měsících vážné nebezpečí pro pivovarskou výrobu. V poměrně krátké době se baktérie mohou pomnožit v sudovém i lahovém pivu a znehodnotit je zákalem, popř. nepříjemnou chutí. V pivu v uzavřených obalech rostou především mléčné baktérie, laktobacily a pediokoky.

V pivovarské výrobě se vyskytuje mnoho kmenů mléčných baktérií, které se značně liší rychlostí růstu a tím i schopností kazit pivo. Růst baktérií závisí především na koncentraci živin, hořkých látek a oxidu uhličitého.

Mléčné baktérie se v mikrobiologické kontrole stanovují na půdách bohatých živinami, jejichž složení se výrazně odlišuje od složení piva. Tyto půdy dovolují rychle prokazovat baktérie v pivovarské výrobě, ale neumožňují odlišit nebezpečné druhy baktérií, které rychle kazí pivo, od druhů relativně neškodných.

V minulém sdělení [1] jsme navrhli půdu k specifickému průkazu mléčných baktérií, které rychle rostly v pivu. Malým množstvím agaru (0,16 %) ztužené pivo sloužilo jako základní substrát, v němž se množily pouze mikroorganismy s relativně vysokou růstovou rychlostí. Tím se co nejvíce napodobily přirozené podmínky kažení piva. Půda se mohla používat pouze ve vysoké vrstvě (ve zkumavkách), což stěžovalo stanovení baktérií na membránových filtroch.

Pro množení mikroorganismů v pivu má velký význam oxid uhličitý, který výrazně potlačuje růst některých baktérií i kvasinek [2]. Zcela inhibuje růst křísovitých mikroorganismů, které by jinak rušily stanovení baktérií v nízké vrstvě agaru (v Petriho miskách). Oxid uhličitý je selektivním inhibitorem nežádoucích mikroorganismů v pivovarské mikrobiologické kontrole v teplých, polopevných i tuhých půdách.

Zkušenosti získaných v pracích [1, 2] jsme využili k zdokonalení techniky průkazu a stanovení škodlivých mikroorganismů piva.

### 2. MATERIÁL A METODY

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

10%, popř. 12% pivo se zbabí třepáním oxidu uhličitého, rozplní do pivních lahviček téměř po okraj a po uzavření korunkou se pasteruje 30 min při 60 °C. Takto připravené pivo se uchovává v zásobě.

Tabulka 1. Mikrobiologická kontrola stáčecích cest v půdě P<sub>3</sub> z 12% piva (příklad)

Druh vzorku	Počet baktérií ve 100 ml piva	Druh baktérií
Výstup křemelinového filtru	25	laktobacily
Výstup deskového filtru	2	laktobacily
Plnič sudového piva	10	laktobacily
Pivo v transportním sudu	40	laktobacily
Lahvové pivo	200	laktobacily

2 g agaru a 25 mg aktidionu ve 100 ml vody se steriluje v autoklávu 20 min při 0,12 MPa. Před přípravou půdy P<sub>3</sub> se agar s aktidionem rozebrá na vodní lázně nebo v autoklávu, 10 ml horkého agaru se asepticky připeče do nakloněných erlemeyrových baňek, po stěně se přidá 90 ml vytřepněho pasterovaného piva a krátce promíchá. Tato půda se rozlévá do Petriho misek, které se uloží na 30 min do chladničky. Doporučuje se vrstva

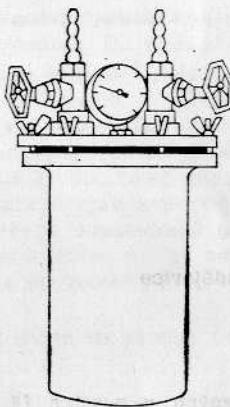
půdy vysoká 3 až 5 mm. Půda v chladničce částečně ztuhne a získá gelovitou konzistenci. Misky se musí přenášet ve vodorovné poloze, neboť při větším sklonu misky půda teče.

#### Očkování vzorků

Vzorky v provozu (mladina, pivo) se asepticky pipetuji do Petriho misek (0,1 až 1 ml) a přelévají půdou  $P_3$ . Membránové filtry se zachycenými mikroorganismy se vloží na dno misky a opatrně převrství půdou  $P_3$ . Při přímém očkování do polopevné půdy se vzorky (např. pivní sedliny) očkují ponořením očkovací jehly s mikroorganismy do půdy. Tímto způsobem se ověruje schopnost mikroorganismů kazit pivo.

#### Kultivace pod tlakem oxidu uhličitého

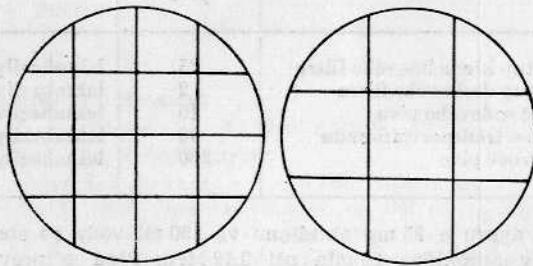
Zaočkované plotny se vloží do tlakového inkubátoru (obr. 1), který se krátce propláchne oxidem uhličitým a tlak nastaví na 0,12 až 0,14 MPa. Inkubuje se 7 dní při 28 °C.



Obr. 1. Tlakový inkubátor (výrobek Vědeckovo-výzkumné a vývojové základny)

#### 3. DISKUSE

Polopevná pivní půda umožňuje sledovat růst baktérií v přirozeném prostředí, v pivu. Nízká koncentrace agaru usnadňuje difuzi živin k bakteriálním buňkám a dovoluje stanovit jejich počet. Rychlosť průkazu vzniká s klesající koncentrací agaru; pro snadnou manipulaci doporučujeme 0,2 % agaru v půdě. Nad tuto hranici citlivost průkazu klesá, půda s nižší koncentrací se při přenosu misek snadno naruší. Vkládání kovových mřížek (obr. 2) do misek dovoluje snížit koncentraci agaru na 0,1 %.



Obr. 2. Mřížky do misek na polopevnou půdu

Při přípravě půdy se pivo co nejméně řeď, aby se nezměnily podmínky pro růst baktérií. V praxi se mohou vyskytovat bakteriální kmeny, které rychle rostou

v 10% pivu, ale 12% pivo kazí pomalu. Jsou to často kmeny citlivé na hořké látky, jak se prokázalo srovnávacími pokusy s půdou  $P_3$  připravenou z prokvašené sladiny nebo mladiny.

V popsané modifikaci se vodným agarem pivo řeď 1,1X, tzn., že z piva původní stupňovitosti 12 % se získá přibližně 11 % pivo. Mírné zředění průkaz škodlivých baktérií neovlivňuje, zvýšením koncentrace základního agaru na 3 nebo 4 % lze zředění ještě snížit.

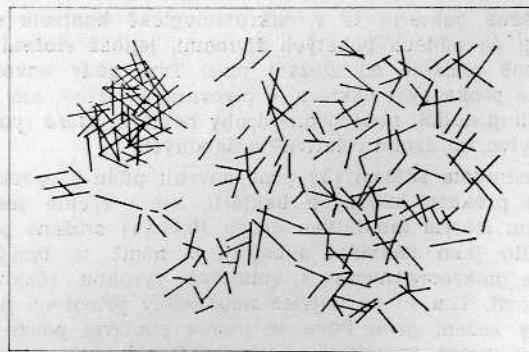
Polopevná půda se po zaočkování sytí oxidem uhličitým. Misky s půdou se ponechávají v oxidu uhličitém po celou inkubaci. Konzistence půdy znemožňuje uvolňování bublinek  $CO_2$ , po opatrném snížení tlaku a vyjmout misek, oxid uhličitý pomalu difunduje z půdy do vzduchu bez pqrúšení půdy. Oxid uhličitý potlačí růst křísových baktérií a inhibuje baktérie, kazící pivo pouze za nepřítomnosti kyslíku.

Křísovorné baktérie je možné inhibovat rovněž přidavkem 0,18 % β-fenyletanolu, který se může přidat přímo do základního agaru (1,8 ml ve 100 ml) s aktidionem. Plotny polopevné půdy se mohou inkubovat anaerobně za normálního tlaku, nebo pouze na vzduchu, počet baktérií kazících pivo bývá však nižší než při použití tlakového  $CO_2$ .

Pro stanovení „rychle“ rostoucích kmenů baktérií doporučujeme kultivaci 7 dní při 28 °C. V praxi se mohou vyskytovat kmeny, které v pivu dobře rostou již za 3 až 4 dny. Tyto kmeny jsou velmi nebezpečné a podařilo se je izolovat z piv reklamovaných pro nízkou trvanlivost. Pro účely mikrobiologické kontroly v určitém pivovaru je vhodné volit dobu průkazu individuálně.

Úseková mikrobiologická kontrola s půdou  $P_3$  umožňuje nalézt zdroje nebezpečné kontaminace (tab. 1). Očkováním bakteriálních sedlin vráceného piva se přibližně stanoví potřebná doba průkazu a pak se tyto baktérie prokazují v jednotlivých fázích výroby. Do půdy  $P_3$  se snadno očkují vzorky násadních kvasnic, křemelina z filtrační vrstvy, suspenze vzniklé třepáním kousků filtrační hmoty apod.

Narostlé kolonie se z polopevné půdy vyjmají piptkou, nebo očkovací jehlou. Mikroskopický obraz se srovnává se zvěřením baktérií z pivní sedliny. V polopevné půdě se zpravidla pomnožují dlouhé tyčinkovité baktérie, méně často i pediokoky (obr. 3). Prodlouží-li se doba kultivace, počet pomnožených baktérií vzniká, častěji se objevují pediokoky.



Obr. 3. Mikroskopický obraz laktobacilů z kolonie v půdě  $P_3$

Výsledky stanovení doporučujeme kombinovat s klasickou mikrobiologickou kontrolou na bohatých živných půdách, které zachycují širší bakteriální spektrum. Očkování mikroorganismů do pasteurovaného piva bylo vždy nutnou částí mikrobiologické provozní kontroly, je

však pracné a časově náročné. Polopevná pivní půda nahrazuje a zdokonaluje tuto osvědčenou techniku. Kromě toho se takto mohou studovat nejrůznější problémy pivovarské mikrobiologie, jako vliv surovin na růst pivovarských kontaminantů, růst baktérií v sladině, sladině a zředěném pivu (zbytky piva po nedokonalém čištění) apod.

#### Literatura

- [1] ŠAVEL, J. - PROKOPOVÁ M.: Kvas. prům. 24, 1978, s. 246—249  
[2] ŠAVEL, J. - PROKOPOVÁ M.: Kvas. prům. 26, 1980, s. 124—126

**Šavel, J. - Prokopová, M.: Stanovení baktérií rychle kazícího pivo.** Kvas. prům., 26, 1980, č. 12, s. 265—267.

Popisuje se technika, umožňující selektivně stanovit baktérie rychle kazící stojené pivo. Polopevná půda se skládá pouze z piva, 0,2 % agaru a aktidionu. Půdu se přelévají vzorky v Petriho miskách, membránové filtry s mikroorganismy apod., nebo se do částečně ztuhlé půdy vnášeji vzorky očkovací jehlou. Jako selektivní inhibitory baktérií rušicích stanovení slouží oxid uhličitý, kterým se půda sytí pod tlakem 0,12 až 0,14 MPa. Za rychle kazící druhy se považují kmeny, které vytvoří v půdě kolonie do 7 dnů při 28 °C. Diskutuje se možnosti použití této půdy v provozní mikrobiologické kontrole.

**Шавел, Я. — Прокопова, М.: Определение бактерий, вызывающих быструю порчу пива.** Квас. прум. 26, 1980, № 12, стр. 265—267.

В статье рассматривается метод, дающий возможность селективного определения бактерий, вызывающих быструю порчу разлитого пива. Применяемая полутвердая среда состоит из пива, 0,2 % агара и актидиона. Среду наливают на образцы в чашках Петри, на мембранные фильтры с микроорганизмами и т.п. Можно также обсеменять полутвердую среду пробами с помощью инъекционной иглы. В качестве селективного ингибитора, подавляющего бактерии, которые бы могли искать результаты анализа, применяется углекислый газ. Среда насыщается этим газом под давлением от 0,12 до 0,14 МПа. Штаммами, вызывающими быструю порчу пи-

ва, считаются такие, которые при температуре 28 °C образуют в течение 7 дней достаточно большие колонии.

**Šavel, J. - Prokopová, M.: Identification of Bacteria Rapidly Spoiling Beer.** Kvas. prům. 26, 1980, No. 12, pp. 265—267.

The article deals with a method permitting to identify selectively bacteria spoiling bottled beer. Semi-solid medium consists of beer, agar (0,2 %) and actidione. For analyses the medium is passed through samples on Petri dishes, membrane filters etc. Samples can be also inoculated into a partly solidified medium with a loop. Carbon dioxide can be used as an efficient inhibitor suppressing bacteria which may interfere with the identification. Medium must be saturated with CO<sub>2</sub> under pressure ranging from 0,12 to 0,14 MPa. As rapidly spoiling bacteria are classified strains capable at temperature 28 °C form colonies within 7 days. The authors maintain, that the described medium could be used to advantage for routine microbiologic analyses.

**Šavel, I. - Prokopová, M.: Bestimmung der Bakterien die das Bier schnell verderben.** Kvas. prům. 26, 1980, No. 12, S. 265—267.

Es wird die Technik der selektiven Bestimmung von Bakterien, beschrieben die das abgefüllte Bier schnell verderben. Der halbfeste Boden besteht nur aus Bier, 0,2 % Agar und Aktidion. Mit dem Boden werden die Proben auf Petrischalen, Membranfilter mit Mikroorganismen u. ä. übergossen, oder werden in den teilweise fest gewordenen Boden die Proben mit der Impföse eingeimpft.

Zur selektiven Inhibition der die Bestimmung störenden Bakterien dient Kohlendioxyd, mit dem der Boden unter Druck von 0,12 bis 0,14 MPa gesättigt wird.

Als schnellverderbende werden diejenige Bakterienstämme bezeichnet, welche in dem Boden binnen 7 Tagen bei 28 °C Kolonien ausbilden. Es werden die Möglichkeiten der Anwendung des beschriebenen Bodens in der mikrobiologischen Betriebskontrolle diskutiert.