

Elektivní půda pro zjištění kvasinkovité infekce v droždařství

BOŽENA BUREŠOVÁ, PAVEL ŘACH
Vyzkumný ústav kvasného průmyslu, Praha

663.12/14:576.8

Používání čistých kultur kvasinek při výrobě droždí usnadňuje výrobní proces a ovlivňuje příznivě jakost výrobku. Proto i nevelké množství kontaminačních mikroorganismů, jež se dostane do kvasné kádě a často se rychleji pomnoží než kulturní kvasinky, zhoršuje jakost výrobku.

Kvasinkovité mikroorganismy infikující droždařské kvašení patří ke sporogenním i k asporogenním kvasinkám, jež dosud se v technické praxi souhrnně označují jako „divoké kvasinky“. Ze sporogenních kvasinek jsou to rody *Pichia* (*P. membranaefaciens*), *Hansenula* (*H. anomala*), a z asporogenních rody *Candida* (*C. mycoderma*), *Torulopsis* (*T. colliculosa*), *Klöckera* (*K. apiculata*). Cukr z melasy dobře využívají *Candida*, *Torulopsis* a *Hansenula*, při čemž se rozmnožují tak, že nesnižují výtěžek kvasničné hmoty. Jsou škodlivé zejména tím, že zhoršují možnost kynutí a kvasivost droždí a ovlivňují ne-příznivě jeho trvanlivost.

Abychom zaručili standardní jakost výrobků, je nutné znát podmínky biologické čistoty provozních kultur droždařských ras *Saccharomyces cerevisiae* *Hansen*.

Problémem detekce a identifikace kontaminačních mikroorganismů a vypracování vhodných metodik zabývalo se již mnoho autorů [1, 2, 3, 4], ale přesto není známa jednoduchá metodika pro spolehlivé stanovení biologické čistoty provozních kultur droždařských kvasinek. K rozlišení kvasinkovité infekce od kulturních kvasinek a k vyjádření poměrného počtu se používá těchto metod:

a) Mikroskopické pozorování. — Touto metodou zkušený pracovník rychle, ale zato nedokonale

zjistí povahu a množství infikujících mikrobiů v kultuře nebo ve vzorku z provozního kvašení. Počítají se jednotlivé buňky infekčních mikroorganismů v zorném poli nebo v počítací komůrce. Tato metoda již nám nevyhovuje a není spolehlivá při zjištění druhového složení infekce, zvláště jde-li o přítomnost nežádoucích druhů kvasinek, z nichž některé se těžko vzájemně morfologicky odlišují pro velkou variabilitu a polymorfii. Lodderová [5] např. u druhu *Candida mycoderma* uvádí, že vytváří tři druhy buněk lišící se od sebe tvarem i velikostí. Mikroskopická metoda bývá někdy doplnována různou barvicí technikou pro zjištění množství infikujících mikroorganismů, hlavně bakterií.

b) Počítání a rozlišení kolonií na Petriho miskách je přesnější než metoda mikroskopická; předpokladem pro úspěšné zjištění množství a povahy bakteriální a kvasinkovité infekce je vhodný substrát, na němž by nerostly kulturní kvasinky nebo aby jejich růst byl omocien na minimum. Splnění tohoto požadavku není nesnadné, poněvadž nároky kulturních kvasinek na živiny jsou přibližně stejné jako kontaminujících mikroorganismů.

Růst kulturních kvasinek se potlačuje vhodnými elektivními antibiotiky nebo antiseptiky, čímž se usnadňuje růst ostatních mikroorganismů, nebo se využívá rozdílné asimilace C látek u „divokých“ a kulturních kvasinek. Whiffenová ve svých pracích [6, 7] upozornila na inhibiční účinek actidionu, antibiotika získaného z určitého kmene *Streptomyces griseus* při výrobě streptomycinu. Actidion

tumí růst kulturních kvasinek již v nízkých koncentracích, aniž ovlivní růst bakterií. Má však vliv i na růst asporogenních druhů kvasinek, jak uvádí Whiffenová [7], a na růst *Saccharomyces cerevisiae*; např. *Candida utilis* je inhibovana stejnou dávkou actidionu, tj. 10 µg/ml.

Bockelmann [8] zjišťoval sekundární infekci násadních pivovarských kvasnic metodou tzv. „potlačující kultivace“ (forcing test), kdy se ke standardnímu mediu přidával actidion pro potlačení růstu kulturních kvasinek a polymyxin s penicilinem pro potlačení bakteriální infekce.

Beech a Carr [9] zkoušeli inhibiční účinek 26 antibiotik a 24 antiseptik na 23 různých sporogenních i nesporogenních druzích kvasinek a zjistili rozličnou resistenci.

Elektivní antibiotika a antiseptika přidávali autoři [6–9] ke standardním živným půdám a výsevovou metodou na Petriho miskách zjišťovali jakost i množství infekce.

Elektivní asimilace C látek: Vhodný biochemický test pro rozlišování jednotlivých druhů kulturních a divokých kvasinek, použitelný též pro průkaz kvasinkové infekce, je asimilace určitých C látek. Jako uhlíkatých látek používali autoři k asimilačním testům pouze glukosu, fruktosu, mannosu, galaktosu, maltosu, sacharosu, laktosu a methylalkohol; později *Wickerham a Burton* [10] polysacharidy, organické kyseliny, vyšší alkoholy a podle výsledků je rozdělili do několika skupin.

Wiles [11] využil rozdílné asimilace uhlíkatých sloučenin k průkazu divokých kvasinek v kultuře pivovarských kvasinek.

Lodderová a Kreger van Rijová [5] stanovují u kvasinkovitých mikroorganismů asimilaci různých uhlohydrátů (mono- i disaccharidů) modifikovaných auxanografickým testem podle *Beijerincka* [13] a metodou *Wickerhamovou* [12] na tekutých substrátech.

White [14] doporučuje k průkazu bakteriální a kvasinkovité infekce při drožďářském kvašení substrát, kde zdrojem C jsou tzv. „nezkvasitelné cukry“ (rafinosa, laktosa), dále mannitol a glycerol. Principem tohoto testu je, že suspense kvasinek je zaočkována do media, jež obsahuje rafinosu popř. laktosu a mannitol s glycerolem, tj. vesměs látky, které kulturní kvasinky nedovedou asimilovat, ale jež jsou vyhovujícími živinami pro růst bakterií a infekce kvasinkových mikroorganismů.

Levi [15] zjišťoval infekční mikroorganismy pekařského droždí na dvou substrátech, které obsahovaly jako zdroj C látek xylosu (Xylose-Mineral Salts Agar-XMSA) nebo jantaran amonný (Ammonium Succinate-Mineral Salts Agar-ASMSA). Na druhé půdě (ASMSA) lépe rostly divoké kvasinky z rodu *Candida*, *Torulopsis*, *Trichosporon* než kulturní kvasinky.

Pokusná metodika

Na základě zkušeností získaných při identifikaci kvasinkovitých mikroorganismů infikujících drožďářské kvašení a prací s antibiotiky, zvláště s actidionem (dosud nepublikováno) jsme přistoupili

Seznam mikroorganismů k testování elektivní půdy

Označení kultury	Původ
Kvasinky:	
Čeleď Endomyctaceae	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Hansen	Drožďárna Libán
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Hansen, rasa Union I	V E B Backhefe-Leipzig - Ověčačský lihovar SSSR
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Hansen, rasa Ja	
<i>Saccharomyces</i> sp. Fleischmann, rasa 7754	ATCC -
<i>Saccharomyces</i> sp. Tanner, rasa 2631	ATCC -
<i>Saccharomyces carlsbergensis</i> , Tanner, rasa 2345	ATCC -
<i>Saccharomyces exiguis</i> Hansen	CBS -
<i>Saccharomyces fragilis</i> Jørgensen	VŠCHT (Dr. Řach) Sbírka prof. Niethammerové -
<i>Saccharomyces lactis</i> 1 Dombrowski	CBS
<i>Saccharomyces willianus</i> Saccardo	CBS
<i>Saccharomyces oviformis</i> Osterwalder	CBS
<i>Saccharomyces chodati</i> Steiner	CBS
<i>Saccharomyces uvarum</i> Beijerinck	CBS
<i>Pichia</i> sp., rasa 19	VŠCHT (prof. Šatava) - Kolachov, USA
<i>Pichia</i> sp., rasa 20	CBS
<i>Pichia membranaefaciens</i> Hansen, rasa 21	CBS
<i>Pichia fermentans</i> Lodder	CBS
<i>Pichia membranaefaciens</i> Hansen, rasa 25	Carlsberg -
<i>Pichia polymorpha</i> Klöcker	Kodaň
<i>Pichia membranaefaciens</i> Hansen, rasa 26	Carlsberg -
<i>Hansenula anomala</i> Hansen et P. Sydow	Kodaň
	VŠCHT (Dr. Řach)
Čeleď Cryptococcaceae	
<i>Candida utilis</i> Henneberg, rasa 8/V	Výroba toruly - Uničov
<i>Candida utilis</i> Henneberg, rasa 31	Sbírka prof. Niethammerové
<i>Candida mycoderma</i> Rees, rasa 179/3	VÚKP
<i>Candida mycoderma</i> Rees, rasa 1	VÚKP
<i>Candida guillermondi</i> Langeron et Guerra	B. Ú. ČSAV
<i>Candida catenulata</i> Diddens et Lodder	B. Ú. ČSAV
<i>Candida intermedia</i> Langeron et Guerra	B. Ú. ČSAV
<i>Candida pelliculosa</i> var. <i>cylindrica</i>	B. Ú. ČSAV
<i>Candida pelliculosa</i> Redaelli	B. Ú. ČSAV
<i>Candida pulcherrima</i> (Lindner) Windisch	B. Ú. ČSAV
<i>Candida tropicalis</i> (Cast.) Berkhoult	Laboratoř prof. E. A. Plevako - Moskva
<i>Candida pseudotropicalis</i> , rasa W.	Zellstoffwerk Wittenberge, NDR
<i>Candida pseudotropicalis</i> var. <i>lactosa</i>	B. Ú. ČSAV
<i>Torulopsis colliculosa</i> (Hartmann) Saccardo	CBS -
<i>Rhodotorula rubra</i> Lodder	VÚKP -

Označení kultury	Původ
Bakterie:	
Čeleď <i>Bacillaceae</i>	
<i>Bacillus subtilis</i>	Ú. E. M.
<i>Bacillus megatherium</i>	Ú. E. M.
<i>Bacillus cereus</i>	Ú. E. M.
<i>Bacillus cereus</i> var. <i>mycoides</i>	Ú. E. M.

Tabulka 1

Vysvětlivky:

ATCC — American Type Culture Collection, Washington,
USA

CBS — Centralbureau voor Schimmelcultures, Baarn,
Holland

VŠCHT — Vysoká škola chemicko-technologická, Praha

VÚKP — Výzkumný ústav kvasného průmyslu, Praha
B. Ú. ČSAV — Ústřední biologický ústav Čs. akademie věd,
Praha

Ú. E. M. — Ústav epidemiologie a mikrobiologie, Praha

Vypracování nové půdy vhodné pro kontrolu biologické čistoty droždařských kultur a kvašení.

Mikroorganismy: K vyzkoušení nové půdy byly použity různé druhy ascosporogenních i anasco- sporogenních kvasinek a některé druhy bakterii, jež se vyskytují často v melasových droždařských záparách. Seznam mikroorganismů je v tabulce 1.

Příprava elektivní půdy k rozlišení rodu *Saccharomyces* od rodu *Pichia* a *Hansenula* a čeledi *Cryptococcaceae*

Při přezkoušení elektivních agarových půd Leviho [15] s xylosou, popř. jantaranem amonným jako zdroji C jsme zjistili, že nedochází k potlačení růstu rodu *Saccharomyces*, takže elektivita půd je sporná. Vzhledem k tomu, že jsme i na pouhém vodním agaru (2,5 %) pozorovali pomalý, ale přesto zřetelný růst kvasinek rodu *Saccharomyces*, používali jsme nadále křemičitého gelu jako ztužovacího prostředku. Do tohoto gelu jsme pak přidávali uhlíkaté a dusíkaté látky, o nichž je známo, že nejsou rodem *Saccharomyces* asimilovány nebo jsou asimilovány jen po delší adaptaci.

Nejvhodnější byla kyselina jantarová (popř. její anhydrid) a betain (hydrochlorid). Množství betainového dusíku v živné půdě odpovídá množství obsaženého v normální melasové droždařské záparě.

Příprava křemičitého gelu: Ke kyselině solné (h. 1,08 až 1,10) se přidává za promíchávání stejně množství vodního skla (h. 1,06 až 1,08). Směs se povaří k vypuzení CO₂ a rozlévá po 20 ml do sterilních Petriho misek. Misky se po nalití nechají několik hodin stát, směs ztuhne v gel. Když je gel dostatečně tuhý, uloží se misky do čisté nádoby a promývají vodovodní vodou 2 až 3 dny. Po té se promyjí horkou destilovanou vodou, lehce osuší v thermostatu a nasycují příslušným roztokem.

Dusíkaté živiny (N amonný, N asparaginový) běžně používané jinými autory [11—15] byly nahrazeny betinem, který není asimilován kulturními kvasinkami, čímž se zvýšila elektivní účinnost půdy.

Testy elektivní půdy

Název kultury	Růst	
	48—72 hod	7 dnů
Čisté kultury:		
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Union I	—	—
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Libáň	—	—
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Ja	—	—
<i>Saccharomyces</i> sp., rasa 7754	—	—
<i>Saccharomyces</i> sp., rasa 2631	—	—
<i>Saccharomyces carlsbergensis</i> , rasa 2345	—	—
<i>Saccharomyces exiguum</i>	—	—
<i>Saccharomyces fragilis</i>	—	—
<i>Saccharomyces willianus</i>	—	—
<i>Saccharomyces oviformis</i>	—	—
<i>Saccharomyces chodati</i>	—	—
<i>Saccharomyces uvarum</i>	—	—
<i>Pichia</i> sp., rasa 19	++	++
<i>Pichia</i> sp., rasa 20	+-	+
<i>Pichia membranaefaciens</i> , rasa 21	++	+
<i>Pichia fermentans</i>	+	+
<i>Pichia membranaefaciens</i> , rasa 25	+	—
<i>Pichia polymorpha</i>	—	—
<i>Pichia membranaefaciens</i> , rasa 26	++	—
<i>Hansenula anomala</i>	++	—
<i>Candida utilis</i> 8/V.	++	—
<i>Candida utilis</i> , rasa č. 31	++	—
<i>Candida mycoderma</i> , rasa 179/1	++	—
<i>Candida mycoderma</i> 1	++	—
<i>Candida guilliermondii</i>	—	—
<i>Candida intermedia</i>	+-	+
<i>Candida mesenterica</i>	+	+
<i>Candida pelliculosa</i> var. <i>cylindrica</i>	++	—
<i>Candida pelliculosa</i>	++	+
<i>Candida pulcherrima</i>	+	++
<i>Candida pseudotropicalis</i> var. <i>lact.</i>	+	++
<i>Rhodotorula rubra</i>	++	—
<i>Candida tropicalis</i>	++	—
<i>Candida pseudotropicalis</i>	—	—
<i>Bacillus subtilis</i>	—	—
<i>Bacillus megatherium</i>	—	—
<i>Bacillus cereus</i>	—	—
<i>Bacillus cereus</i> var. <i>mycoides</i>	—	—
Směsi kultur:		
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Libáň	—	—
<i>Candida mycoderma</i>	++	++
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Libáň	—	—
<i>Candida tropicalis</i>	++	++
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Libáň	—	—
<i>Candida pseudotropicalis</i>	++	++
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Libáň	—	—
<i>Rhodotorula rubra</i>	++	++
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Ja	—	—
<i>Candida mycoderma</i>	++	++
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Ja	—	—
<i>Candida pseudotropicalis</i>	++	++
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Ja	—	—
<i>Candida tropicalis</i>	++	++
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Ja	—	—
<i>Rhodotorula rubra</i>	++	++
<i>Candida utilis</i> , rasa 8/V	++	++
<i>Candida pseudotropicalis</i>	++	++
<i>Candida utilis</i> , rasa 8/V	++	++
<i>Candida tropicalis</i>	++	++

Tabulka 2

Konečné složení elektivní půdy

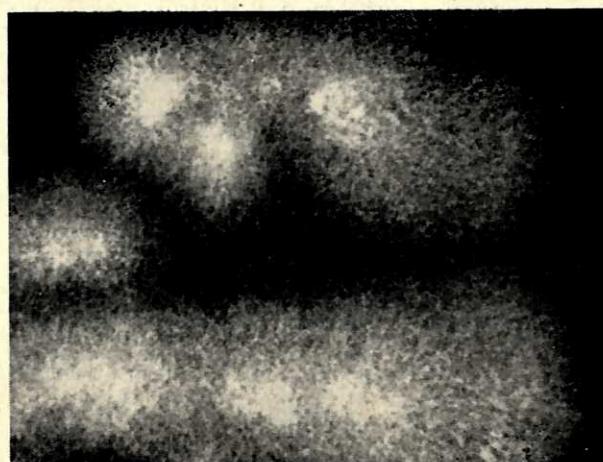
Anhydrid kyseliny jantarové	6,0 g
Betainhydrochlorid	0,18 g
KH ₂ PO ₄	2,5 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,5 g
Destilovaná voda	100 ml

Půda se steriluje 1× v páře po 40 minut, pH půdy 5,5.

Detekční zkouška: Petriho misky s 20 ml osušeného gelu se přelijí 4 ml uvedeného sterilního roztoku, který se nechá volně difundovat, přebytek vody se odparí vložením pootevřených misek do thermostatu při teplotě 50 až 55°C na dobu 3 až 4 hod; thermostat byl předem desinfikován. Misky se pak uzavřou a čárkovou nebo výsevovou metodou zaočkují zkoušenou suspensí mikroorganismů. Křemičitý gel při inkubaci snadno vysychá a proto je nutné vložit jej do větších skleněných uzavřených Petriho misek se sterilní vatou přesycenou sterilní vodou. Kultivační doba je 48 až 72 hod, případně až 7 dnů, teplota při kultivaci je 28—29°C.

Hodnocení výsledků zkoušek

Celkem bylo takto vyšetřeno 23 druhů sporogenních kvasinek z čeledi *Endomycetaceae*, 14 druhů



Candida pseudotropicalis, rasa W

asporogenních kvasinek z čeledi *Cryptococcaceae* a 4 druhy bakterií z čeledi *Bacillaceae*. Kvasinky byly zkoušeny v čistých kulturách i ve směsích dvou kultur v poměru 1 : 1, výsledky vyjádřené negativním nebo pozitivním růstem zkoušených kvasinek jsou uvedeny v tabulce 2. Příklady růstu některých druhů jsou zřejmý z připojených snímků.

Z výsledků v tabulce 2 vyplývá, že kvasinky z rodu *Saccharomyces* nerostou na této půdě, takže jejich růst nemusí být tlumen žádným jiným inhibitorem, což je předností nové půdy. Kvasinky z dalších zkoušených rodů (*Pichia*, *Candida* atd.) růstly na této půdě většinou dobře, vyjma některých druhů, jež se méně často vyskytuju při kontaminaci provozního kvašení.

Ve směsích kultur rodu *Saccharomyces* a rodů *Pichia*, *Hansenula* a čeledi *Cryptococcaceae* nerostly kulturní kvasinky *Saccharomyces*.

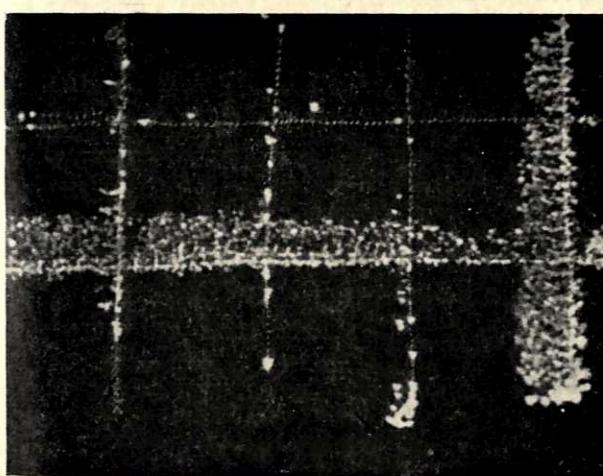
Ve zkoušení inhibice růstu dalších druhů bakterií se bude ještě pokračovat. S novou půdou bylo dosaženo dobrých výsledků při biologické kontrole provozu drožďáren v Kolíně, Plzni a Krásném Březnu, po zkouškách v dalších závodech bude podána souhrnná zpráva.

Souhrn

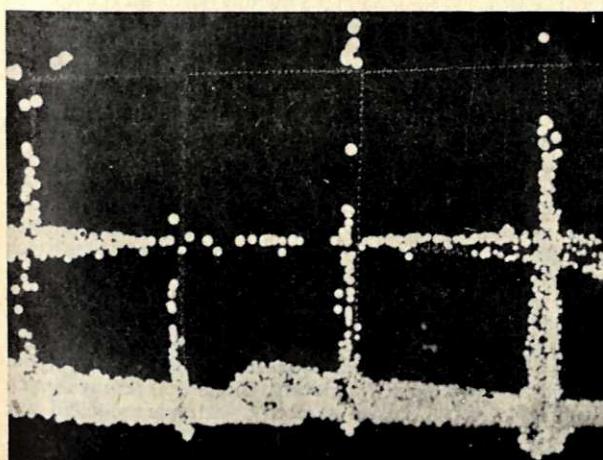
Byla připravena nová elektivní půda pro zjištění kontaminace v drožďářství rody *Candida*, *Torulopsis*, *Hansenula*, *Pichia*, *Rhodotorula*. Růst rodu *Saccharomyces* je touto půdou inhibován. Do prostředí není třeba přidávat inhibující látky. Růst bakterií je touto půdou tlumen. Elektivní půda s anhydridem kyseliny jantarové, betinem a anorganickými solemi je vhodná pro zkoušení čistých i směsných kultur mikroorganismů a kvasících tekutin odebraných z výroby.

Literatura

- [1] A. E. WILES: Yeast Infections and their Control, Brewer's Guild J., **40**, (1954), 343-57.
- [2] S. WINDISCH: Brauerei, **8**, (1954), 139-142.
- [3] R. G. AULT: Some Aspects of Mikrobiological Control, Brewers Guild J., **40**, (1954), 391-423.
- [4] B. BUREŠOVÁ, P. RACH: Zjištování mikroflory v melase, Kvasný průmysl, **3**, (1957), 152-155.
- [5] J. LODDEROVÁ, N. J. W. KREGER-VAN RIJOVÁ: The Yeasts · Amsterdam, (1952), North-Holland Publ. Company.



Candida mycoderma, rasa 1



Pichia membranaefaciens, rasa 26

- [6] A. J. WHIFFEN, N. BOHONOS a R. L. EMERSON: The Production of an antifungal Antibiotic by *Streptomyces griseus*. *J. Bact.*, 52, (1946), 610-611.
- [7] A. J. WHIFFEN: The Production, Assay and antibiotic Activity of Actidion, an Antibiotic from *Streptomyces griseus*. *J. Bact.*, 56, (1948), 285-291.
- [8] J. B. BOCKELMANN: Some Recent Advances in the biological Control of Brewers Yeast. *Brewers Dig.*, 29, (1954), 45-52.
- [9] F. W. BEECH A J. G. CARR: A Survey of Inhibitory Compounds for the Preparation of Yeast and Bacteria in Apple Juices and Ciders. *J. gen. Microbiology*, 12, (1955), 85-94.
- [10] L. J. WICKERHAM a K. A. BURTON: Carbon Assimilation Test for the Classification of Yeast. *J. Bact.*, 56, (1948), 365-371.
- [11] A. E. WILES: Identification and Significance of Yeast encountered in the Brewery. *J. of Instit. Brewing*, 59, (1953), 255-284.
- [12] L. J. WICKERHAM: A critical Evaluation of the nitrogen assimilation Tests commonly used in the Classification of Yeasts. *J. of Bact.*, 52, (1946), 293-301.
- [13] M. W. BEIJERINCK: Arch, néerland. physiol., 2, (1918), 609.
- [14] J. WHITE: Yeast Technology, London, (1954), Chapman & Hall Publ.
- [15] J. D. LEVI: Improved Media and Methods for the Estimation of Infecting Organisms in Baker's Yeast. *J. of Instit. Brewing*, 62, (1956), 261-264.

ВЫВОДЫ

Была приготовлена новая элективная среда для определения контаминации в дрожжевом производстве родом *Candida*, *Torulopsis*, *Hansenula*, *Pichia*, *Rhodotorulas*.

Рост рода *Saccharomyces* этой средой ингибируется. К среде не надо прибавлять ингибирующие вещества. Рост бактерий этой средой подавляется. Элективная среда с ангидридом

янтарной кислоты, бетанином и неорганическими солями пригодна для исследования чистых культур и смесей микроорганизмов и бродящих жидкостей взятых в производстве.

SUMMARY

New elective medium is described which has been prepared for detecting contamination of yeasts by geni *Candida*, *Torulopsis*, *Hansenula*, *Pichia*, *Rhodotorula*. Propagation of genus *Saccharomyces* in the new medium is effectively inhibited. No inhibitive additives are therefore necessary. Propagation of germs is restricted and suppressed. The medium based upon the succinic acid anhydride, betein and anorganic salts is suitable for testing pure culture, determining admixed microbes and checking samples of fermenting liquids.

Ve 2. čísle časopisu Kvasný průmysl na str. 43 byl uveřejněn článek Moskevská droždárna, jehož autorkou byla technickým nedopatréním označena H. A. Dustinova. Správně má znít A. D. Ustinova, což si čtenář lask. opraví.

Děkujieme