Půda k průkazu a stanovení mléčných baktérií

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

ÚVOD

Mléčné baktérie představují nejobávanější kontaminaci pivovarského provozu. Proto se jejich průkazu a stanovení věnuje velká pozornost. Různí autoři doporučují různé druhy živných půd. Krátký přehled nejužívanějších půd jsme uveřejnili v předešlém sdělení (*Šavel* 1973).

Jednotlivé půdy se liší specifitou i množstvím kmenů mléčných baktérií, které na nich lze prokázat. Velkého rozšíření dosáhly známé půdy VLB L 41 a VLB S 7, dodávané firmou Sartorius, Membranfilter (*Wackerbauer* a *Emeis* 1967, 1969). Na prvních z nich se stanovují laktobacily, na druhé pediokoky. Podle údajů literatury (*Mändl* a *Seidel* 1971, *Hodaň* a *Augustin* 1971) i vlastních zkušeností umožňují tyto půdy dokonalý a specifický průkaz mléčných baktérií.

V poslední době se objevila zpráva o nové půdě BNBS (*Kretschmer* et al. 1972), v níž lze prokázat bakteriální kontaminanty piva i divoké kvasinky. Nelze v ní však stanovit počet baktérií a také rozlišení mléčných baktérií a ostatní bakteriální kontaminace je značně obtížné.

Protože v ČSSR dosud chyběly živné půdy podobných vlastností jako VLB L 41, VLB S 7 a suroviny, z nichž lze tyto půdy připravit, jsou v ČSSR nedostupné, sestavili jsme podobné médium převážně z tuzemských surovin.

Specifity německých půd se dosahuje především přídavkem β-fenyletanolu. Tato látka, která velmi dokonale potlačuje ostatní bakteriální kontaminanty (koliformní baktérie, Obesumbacterium sp., octové baktérie) však podle údajů literatury (*Harris* a *Watson* 1960, *Ault* a *Woodward* 1965, *Engel* 1971) částečně inhibuje i růst mléčných baktérií. Proto jsme živné médium připravovali bez přídavku β-fenyletanolu i s ním.

MATERIÁL A METODY

Živné půdy

Půdy VLB L 41 a VLB S 7 byly výrobkem firmy Sartorius Membranfilter v Göttingen.

Živné médium podle našeho návrhu (dále B) obsahovalo prokvašenou sladinu, kaseinový hydrolyzát a další látky podporující růst mléčných baktérií. Po přídavku agaru (2 %) se půda sterilovala v autoklávu a rozlévala do sterilních Petriho misek. Používalo se dvou modifikací živného média: B+ s přídavkem 0,3 % (objemových) β-fenyletanolu a B− bez β-fenyletanolu. K potlačení kvasinek se použilo aktidionu nebo fungicidinu.

Očkování vzorků

Vzorky z různých míst pivovarského provozu se očkovaly na živné půdy (inokulum 0,1—0,2 ml). Vzorky s nízkým obsahem baktérií se filtrovaly membránovými filtry Synpor (póry 0,40 μm), vzorky s vysokým obsahem baktérií se ředily sterilní vodou.

Inkubace

Zaočkované plotny živných půd se anaerobně kultivovaly v atmosféře kysličníku uhličitého při 28 °C po dobu 6 dní.

VÝSLEDKY POKUSŮ

Kultivace provozních vzorků na různých půdách

Vzorky z různých míst pivovarského provozu se souběžně očkovaly na půdy B+, B−, VLB L 41 a VLB S 7. Po kultivaci se ověřovala přítomnost různých druhů mikroorganismů v kolonií stejného typu, přičemž se mikroskopovalo vždy několik kolonií stejného vzhledu. Protože mléčné baktérie rostou na živných půdách jako tyčinko-

vité baktérie různé délky nebo jako koky, diplokoky a tetrády, rozlišovaly se podle mikroskopického vzhledu pouze tyto skupiny baktérií: tyčinkovité baktérie (T) a pediokoky (P), které zahrnovaly všechny zmíněné morfologické formy mléčných baktérií. Kvasinkovité mikroorganismy se v žádném případě neprokázaly.

Počet kolonií na půdě B⁻ byl zpravidla největší, a proto se celkový počet kolonií vyrostlých ze vzorků kultivovaných na různých půdách vyjadřoval rovněž v % počtu kolonií na půdě B⁻. Výsledky uvádí *tabulka 1.*

Průkaz tyčinkovitých baktérií a pediokoků v sedlinách piv a násadních kvasnicích

Na plotny půd (B⁻, B⁺, VLB L 41, VLB S 7) se očkovací jehlou očkovaly sedliny zkažených piv, které podle mikroskopického nálezu obsahovaly tyčinkovité baktérie, popř. ještě pediokoky. Stejným způsobem se očkovaly i vzorky várečných kvasnic. Po kultivaci se přítomnost jednotlivých druhů baktérií (tyčinkovitých nebo pediokoků) ověřovala mikroskopicky. Výsledky uvádí *tabulka 2.*

Stejné vzorky, očkované na různé půdy, se lišily i intenzitou nárůstu. Zejména u vzorků várečných kvasnic bylo množství narostlých pediokoků na půdě B⁻ větší než na ostatních půdách s pozitivním nálezem.

Tabulka 3. Porovnání kultivačního stanovení laktobacilů s přímým počítáním bakteriálních buněk

Vzorek číslo	Počet buněk stanovený				
	Thomovou komůrkou	na půdě B⁻	%	na půdě B⁺	%
1	300	281	93,7	220	73,3
2	500	480	96,0	470	94,0
3	60	42	66,6	11	18,3
4	320	330	103,1	260	81,3
5	240	242	100,8	235	97,9

movou komůrkou určil jejich počet. Po příslušném zředění pasterovaným pivem se vzorky piva pipetovaly na půdu B⁺ a B⁻. Výsledky obou metod stanovení počtu laktobacilů uvádí *tabulka 3.*

DISKUSE

Získané výsledky ukazují, že nová půda s přídavkem β-fenyletanolu umožňuje průkaz a stanovení mléčných baktérií přibližně ve stejném rozsahu jako půdy VLB L 41 a VLB S 7. To vyplývá jak z porovnání počtu kolonií vzorků souběžně očkovaných na zkoušené půdy, tak z výsledků kultivace čistých kmenů laktobacilů na těchto půdách.

Tabulka 1. Množství baktérií stanovených na různých půdách

Druh vzorku	Počet vzorků	Celkový počet kolonií na půdě							
		B⁻		B⁺		VLB L 41		VLB S 7	
		T	P	T	P	T	P	T	P
mladina	4	4842	0	2014	0	1648	0	1994	0
zakvašená mladina	4	3251	1373	33	1313	34	1084	55	848
pivo ze spilky	4	34	2328	16	642	41	800	50	690
pivo ze sklepa	3	4	2000	5	1365	6	1585	8	1520
stočené pivo	3	1369	18	273	11	27	50	147	68
celkem	18	9500	5719	2341	3331	1756	3519	2254	3126
%	—	100	100	23,7	58,1	18,4	61,2	21,5	54,3

T: tyčinkovité baktérie, P: koky, diplokoky, tetrády

Tabulka 2. Průkaz baktérií v pivních sedlinách a várečných kvasnicích

Druh vzorku	Počet vzorků	Počet vzorků s pozitivním nálezem							
		tyčinkovité baktérie				pediokoky			
		půda							
		B⁻	B⁺	VLB L 41	VLB S 7	B⁻	B⁺	VLB L 41	VLB S 7
pivní sedlina	16	13	13	12	12	10	5	2	2
várečné kvasnice	16	7	3	3	3	16	7	8	10

Růst čistých kmenů laktobacilů na různých půdách

Plotny půd (B⁻, B⁺, VLB L 41, VLB S 7) se očkovací jehlou zaočkovaly 10 sbírkovými kmeny laktobacilů izolovaných ze sedlin zkažených piv. Řadou biochemických testů (podle *Eschenbechera* 1968, 1969) se potvrdila příslušnost těchto kmenů k rodu Lactobacillus. Tyto kmeny se po zpětném zaočkování do piva rychle rozmnožovaly.

Všechny zkoušené kmeny laktobacilů rostly dobře na všech půdách, i když v jednom případě byl nárůst na půdě B⁺ o něco slabší než na půdě B⁻.

Porovnání kultivačního stanovení laktobacilů s metodou přímého počítání buněk

Ve vzorcích piva čerstvě zkaženého laktobacily se Tho-

Ani jedna z půd neumožňuje stanovit odděleně laktobacily a pediokoky. Tyto baktérie společně rostou na všech půdách. K stejnému závěru dospěli Hodaň a Augustin (1971, 1972), podle nichž na půdách VLB L 41 a VLB S 7 rostou společně laktobacily i pediokoky, přičemž růst pediokoků je lepší na půdě VLB S 7. To se shoduje s výsledky získanými v naší práci.

Zajímavé je porovnání počtu baktérií narostlých na půdě s β-fenyletanolem a na půdě B⁻. Na půdě bez β-fenyletanolu byl počet tyčinkovitých i kokovitých baktérií podstatně vyšší než na půdě s touto látkou.

Snížení počtu bakteriálních kolonií má pravděpodobně dvě příčiny. β-fenyletanol se k půdám na stanovení mléčných baktérií přidává k potlačení gramnegativních bak-

térií, které jinak rostou spolu s mléčnými baktériemi. Protože největší část gramnegativní bakteriální kontaminace pivovarské výroby tvoří tyčinkovité baktérie (např. koliformní baktérie, Obesumbacterium sp. ap.), lze větší část výrazného snížení počtu kolonií tyčinkovitých baktérií přídavkem β-fenyletanolu přičíst zmíněnému účinku této látky na doprovodnou kontaminaci.

Tomu odpovídá i zjištění, že vliv β-fenyletanolu na růst čistých kmenů laktobacilů byl podstatně menší než při sledování jeho vlivu na veškerou tyčinkovitou kontaminaci v provozních vzorcích. Tak tomu bylo i při očkování sedlin čerstvě zkaženého piva, obsahujícího laktobacily, na obě půdy.

Literatura se však zmiňuje i o negativním vlivu β-fenyletanolu na mléčné baktérie. Potlačení růstu je výraznější u pediokoků, než u laktobacilů (*Harris* a *Watson* 1960, *Ault* a *Woodward* 1965, *Engel* 1971). Na druhé straně je pravděpodobnost kontaminace provozních vzorků bakteriálními druhy (např. Micrococcus sp., Sarcina sp.), které by bylo možno zaměnit za pediokoky, nižší, než tomu bylo v analogickém případě u tyčinkovitých baktérií.

Na základě těchto skutečností lze soudit, že se při analýzách provozních vzorků uplatňují oba diskutované způsoby vlivu β-fenyletanolu. Proto se zdá výhodnější přidávat při stanovení laktobacilů do půdy β-fenyletanol, neboť tím se dosáhne potlačení doprovodné gramnegativní kontaminace a částečně i snížení počtu pediokoků, zatímco pro stanovení pediokoků je výhodnější β-fenyletanol vynechat a totožnost jednotlivých kolonií ověřovat mikroskopicky. To je ovšem nutné i při stanovení laktobacilů.

Pro práci s čistými kmeny mléčných baktérií je výhodnější půda bez β-fenyletanolu, neboť tak se neomezuje ani částečně jejich růst. Tyto závěry je však nutno experimentálně ověřit.

Pokusy se stanovením množství baktérií přímým počítáním a kultivací ukazují, že navržená půda je dostatečně citlivá. Malé rozdíly mezi přímým a nepřímým stanovením baktérií mohou spočívat jak v nepřesnosti stanovení, tak v přítomnosti mrtvých bakteriálních buněk v sledovaném vzorku.

Podrobné složení půdy B a způsob její přípravy sdělí na požádání autoři článku.

Poděkování

Děkujeme firmě **Sartorius Membranfilter** v Göttingen za ochotné a rychlé poskytnutí vzorků půd.

Literatura

[1] AULT, R. G. — WOODWARD, J. D., J. Inst. Brewing **71**, 1965, s. 36
[2] ENGEL, E. L., ASBC Proceedings 1971, s. 89—95.
[3] ESCHENBECKER, F., Brauwiss. **21**, 1986, s. 424—437, 464—471.
[4] ESCHENBECHER, F., Brauwiss. **22**, 1969, s. 14—28.
[5] HARRIS, J. O. — WATSON, W. J., J. Inst. Brewing **66**, 1960, s. 151.
[6] HODAŇ, J. — AUGUSTIN, S., Kvas. prům. **17**, 1971, s. 49—51.
[7] HODAŇ, J. — AUGUSTIN, S., Kvas. prům. **18**, 1972, s. 75—77.
[8] KRETSCHMER, K. — KRETSCHMANN. W. — KRETSCHMER, H., Brauwelt **112**, 1972, s. 1815—1820.
[9] MÄNDL, B. — SEIDEL, H., Brauwiss. **24**, 1971, s. 105—109.
[10] ŠAVEL, J., Kvas. prům. **19**, 1973, s. 76—78, 101—104.
[11] WACKERBAUER, K. — EMEIS, C. C., Mschr. f. Brauerei **20**, 1967, s. 160—164.
[12] WACKERBAUER, K. — EMEIS, C. C., Mschr. f. Brauerei **22**, 1969, s. 3—8, 8—11.

Šavel, J. - Prokopová, M.: Půda k průkazu a stanovení mléčných baktérií. Kvas. prům. **20**, 1974, č. 3, s. 49—51.

Článek pojednává o nové půdě k průkazu a stanovení mléčných baktérií, sestavené převážně z tuzemských surovin. Půda obsahuje prokvašenou sladinu, kaseinový hydrolyzát a další látky podporující růst mléčných baktérií. Tato půda připravená s přídavkem β-fenyletanolu i bez něho se porovnávala s půdami VLB L 41 a VLB S 7 firmy Sartorius Membranfilter. Očkování různých provozních vzorků i čistých kmenů mléčných baktérií prokázalo, že nová půda umožňuje stanovit laktobacily a pediokoky přibližně ve stejném rozsahu jako půdy VLB L 41 a VLB S 7. Na živné půdě bez β-fenyletanolu rostl výrazně vyšší počet baktérií než na stejné půdě s ním. Diskutují se příčiny tohoto jevu.

Шавел, Я. — Прокопова, М.: Новый вид питательной среды для установления присутствия и определения молочнокислых палочек. Квас. прум. **20**. 1974, № 3, стр. 49—51.

В статье описан новый вид питательной среды составленной для установления присутствия и определения молочнокислых бактерий. Среда состоит из сброженного сусла, казеинового гидролизата и вещества способствующего размножению бактерий. Два варианта нового вещества, т. е. с добавкой β — фенилэтанола и без него, сравнивались с питательными средами VLB L41 и VLB S7 изготовляемыми фирмой Сарториус Мембранфильтер. Для посева применялись как эксплуатационные заквасочные культуры, так и чистые штаммы. Результаты экспериментов показали, что новая среда дает примерно такую-же возможность определения молочнокислых бактерий и педиококков как среды VLB L41 и VLB S7. В среде без β-фенилэтанола бактерии размножались интенсивнее чем в среде содержащей это вещество. Рассматриваются причины этой разницы.

Šavel, J. - Prokopová, M.: A New Culture Medium for Ascertaining the Presence and Identification of Lactobacilli. Kvas. prům. **20**, 1974, No. 3, p. 49—51.

The article deals with a new culture medium which has been developed for ascertaining the presence and determination of lactobacilli. It consists of fermented wort, casein hydrolysate and a substance stimulating the propagation of lactobacilli. Two modifications of the medium, viz. one containing β-phenylethanol the other without it were compared with two sorts of media manufactured by Sartorius Membranfilter, viz. VLB L 41 and VLB S 7. Beside normal cultures, applied in industry, several strains of pure cultures were used for inoculation. It has been found that the new medium permits to ascertain and identify lactobacilli and pediococci practically as reliably as the mentioned media VLB L 41 and VLB S 7. In medium without β-phenylethanol propagation was more vigorous than in the medium with this substance. The aithors analyze the reason of difference.

Šavel, J. - Prokopová, M.: Nährboden zum Beweis und zur Bestimmung der Milchsäurebakterien. Kvas. prům. **20**, 1974, No. 3, S. 49—51.

Der Artikel berichtet über einen Nährboden zum Beweis und zur Bestimmung der Milchsäurebakterien, welcher grösstenteils aus inländischen Rohstoffen zubereitet wurde. Der Nährboden enthält vergorene Würze, Kasein-Hydrolysat und weitere Substanzen, welche das Wachstum der Milchsäurebakterien fördern. Dieser Nährboden, mit sowie auch ohne Zugabe von β-Phenyläthanol zubereitet, wurde mit den Nährböden VLB L 41 und VLB S 7 der Firma Sartorius Membranfilter verglichen. Durch Inoculierung verschiedener Betriebsproben und reiner Milchsäurebakterienstämme wurde bewiesen, dass der neue Nährboden die Bestimmung der Lactobacillen und Pediokokken in ungefähr gleichem Ausmass wie die Böden VLB L 41 und VLB S 7 ermöglicht. Auf dem Nährboden ohne β-Phenyläthanol wuchs eine beträchtlich höhere Zahl der Bakterien als auf dem gleichen Nährboden mit β-Phenyläthanolzusatz. Es werden die Ursachen dieser Erscheinung diskutiert.