

Mikrobiologie pivovarské výroby – Striktně anaerobní bakterie *Megasphaera*, *Pectinatus*, *Selenomonas* a *Zymophilus* a metody jejich detekce

Microbiology of brewing – Strictly Anaerobic Bacteria Megasphaera, Pectinatus, Zymophilus and Selenomonas and Methods for their Detection

Dagmar MATOULKOVÁ, Petra KUBIZNIAKOVÁ

Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, a.s. / Research Institute of Brewing and Malting, PLC, Lípová 15, 120 44 Prague
e-mail: matoulkova@beerresearch.cz

Recenzovaný článek / Reviewed paper

Matoulková, D. – Kubizniaková, P.: Mikrobiologie pivovarské výroby – Striktně anaerobní bakterie *Megasphaera*, *Pectinatus*, *Selenomonas* a *Zymophilus* a metody jejich detekce. Kvasny Prum. 60, 2014, č. 11–12, s. 285–295

Striktně anaerobní bakterie schopné kazit pivo nebo kontaminovat pivovarské kvasnice patří do rodů *Megasphaera*, *Pectinatus*, *Selenomonas* a *Zymophilus*. V článku je uveden přehled základních morfologických a fyziologických vlastností této skupiny bakterií, popsána jsou místa jejich výskytu v pivovarském provozu a jejich schopnost kazit pivo. Článek dále popisuje různé metody detekce a identifikace těchto mikrobů – kultivační, metody založené na PCR, MALDI-TOF MS a další.

Matoulková, D. – Kubizniaková, P.: Microbiology of brewing – Strictly anaerobic bacteria *Megasphaera*, *Pectinatus*, *Zymophilus* and *Selenomonas* and methods for their detection. Kvasny Prum. 60, 2014, No. 11–12, pp. 285–295

Strictly anaerobic bacteria capable of spoiling beer or contaminating brewer's yeast belong to the genera *Megasphaera*, *Pectinatus*, *Selenomonas* and *Zymophilus*. This article gives an overview of basic morphological and physiological properties of this group of bacteria, describes the sites of their occurrence in the brewing operation and their ability to spoil beer. It also describes various methods for detection and identification of these microbes – cultivation methods, methods based on PCR, MALDI-TOF MS, and others.

Matoulková, D. – Kubizniaková, P.: Mikrobiologie der Brauerherstellung – Strikt anaerobe Bakterien *Megasphaera*, *Pectinatus*, *Selenomonas* und *Zymophilus* und Methoden zur ihren Detektion. Kvasny Prum. 60, 2014, Nr. 11–12, S. 285–295

Strikt anaerobe Bakterien, fähig das Bier zu verderben oder die Hefe zu kontaminieren, gehören zu den Stämmen *Megasphaera*, *Pectinatus*, *Selenomonas* und *Zymophilus*. Im Artikel wird die Übersicht von Grundmorphologischen und –physiologischen Eigenschaften dieser Bakteriengruppe angeführt, weiterhin werden ihre Fundorte im Braubetrieb und ihre Fähigkeit das Bier zu verderben beschrieben. Weiterhin wurden im Artikel verschiedene Methoden der Detektion und Identifikation von diesen Mikroben – Kultivierungsmethode, auf den PCR, MALDI-TOF MS Grund gegründete Methoden und weitere Methoden angeführt.

Klíčová slova: *Megasphaera*, *Pectinatus*, pivo, sekundární kontaminace, *Selenomonas*, striktně anaerobní bakterie, *Zymophilus*

Keywords: *Megasphaera*, *Pectinatus*, beer, secondary contamination, *Selenomonas*, strictly anaerobic bacteria, *Zymophilus*

1 ÚVOD

Striktně anaerobní bakterie, nacházené v souvislosti s výrobou piva, představují skupinu čtyř bakteriálních rodů: *Pectinatus*, *Zymophilus*, *Selenomonas* a *Megasphaera*. Jsou to mesofilní, nesporulující bakterie se striktně fermentativním typem metabolismu. Většina zástupců, s výjimkou rodu *Megasphaera*, má tyčkovitý tvar buněk a vyznačuje se velmi aktivním pohybem. Metodou podle Grama se tyto bakterie barví gramnegativně či gramvariabilně (Schleifer et al., 1990). V současné době jsou tyto rody řazeny do čeledi *Veillonellaceae* (Marchandin et al., 2010).

Jako původci kažení piva jsou striktně anaerobní bakterie nacházeny méně často než např. mléčné bakterie. Avšak na rozdíl od mléčných bakterií, u nichž se vyskytují kmeny pivo-kazící i nekazící, jsou *Pectinatus* a *Megasphaera* bakterie obligátně pivo-kazící (Sakamoto a Konings, 2003). Bakterie *Zymophilus* a *Selenomonas* jsou sporadicky izolovány z kontaminovaného piva a kvasnic (Schleifer et al., 1990).

Do rodu *Pectinatus* jsou řazeny tři druhy (*P. cerevisiophilus*, *P. frisingensis*, *P. haikarae*), které jsou nacházeny vždy pouze ve spojení se zkaženým pivem a pivovarskými provozy (Schleifer et al., 1990; Juvonen a Suihko, 2006). Další dva popsané druhy jsou nacházeny v prostředí mimo pivovarský provoz – *Pectinatus brassicae* v odpadu z výroby nakládáných okurek (Zhang et al., 2012) a *Pectinatus sottacetonis* z nádrže na zkažené kvašené okurky (Caldwell et al., 2013).

Bakterie rodu *Pectinatus* jsou rovné až mírně zakřivené pohyblivé tyčky uspořádané po jedné nebo po dvou buňkách, jen výjimečně v krátkých řetězcích. Starší buňky v kultuře mohou mít spirálovitý, v případě *P. haikarae* také smyčkovitý či kyjovitý tvar. Název rodu je odvozen z latinského „pecten“ = hřeben, je tedy charakteristický tvarem hřebene – bičíky (v počtu 1–23) totiž vystupují pouze z jedné strany buňky a buňka tak tvarem připomíná hřeben (Haikara et al., 1981b). Pohyb mladých buněk připomíná písmeno X, což je dáno

1 INTRODUCTION

Strictly anaerobic bacteria found in connection with the production of beer include four bacterial genera: *Pectinatus*, *Zymophilus*, *Selenomonas* and *Megasphaera*. They are mesophilic, non-sporulating bacteria with a strictly fermentative type of metabolism. Most of their representatives, with the exception of the genus *Megasphaera*, have a rodlike cell shape and a very active movement. Their staining according to Gram is either Gram-negative or Gram-variable (Schleifer et al., 1990). Currently, these genera are included in the family *Veillonellaceae* (Marchandin et al., 2010).

Strictly anaerobic bacteria are found less frequently as organisms causing beer spoilage than e.g. lactic acid bacteria. However, unlike lactic acid bacteria, which include both beer-spoiling and non-spoiling strains, *Pectinatus* and *Megasphaera* bacteria are obligate beer spoilers (Sakamoto and Konings, 2003). *Zymophilus* and *Selenomonas* bacteria have been rarely isolated from contaminated brewery yeast (Schleifer et al., 1990).

The genus *Pectinatus* includes three species (*P. cerevisiophilus*, *P. frisingensis*, *P. haikarae*) that were found only in connection with spoiled beer and brewery operations (Schleifer et al., 1990; Suihko and Juvonen, 2006). Two other described species have been found in the environment outside the brewing operation – *Pectinatus brassicae* in salty pickle wastewater (Zhang et al., 2012) and *Pectinatus sottacetonis* in pickle spoilage tank (Caldwell et al., 2013). Bacteria of the genus *Pectinatus* are straight to slightly curved motile rods arranged occurring as single cells or in pairs, rarely in short chains. Older cells in the culture may be helical, in the case of *P. haikarae* also looplike or clublike shape. The genus name is derived from the Latin „pecten“ = comb since the characteristic shape is that of a comb – flagella (numbered 1–23) are situated only on one side of the cell and the cell shape thus resembles a comb (Haikara et al., 1981b). The movement of young cells resembles the letter X, which is due to the unusual arrangement of the flagella. Older cells move in a snake-

neobvyklým uspořádáním bičíků. Starší buňky se pohybují hadovitě, popřípadě nemusí být vůbec pohyblivé (Haikara et al., 1981b; Chelack a Ingledew, 1987; Lee et al., 1980). Rostou v teplotním rozmezí 15–40 °C, s optimem při 28–32 °C. Při teplotách nad 50 °C dochází k jejich odumírání (Tholozan a Jacquemont, 1999). Pro spolehlivé usmrcení *Pectinatus* postačuje působení teplot 58–60 °C po dobu 1 minuty, tedy mírnější podmínky nežli je běžná pasterace piva (Watier et al., 1995). Jednotlivé druhy se mezi sebou liší svou citlivostí ke zvýšeným teplotám – druh *P. cerevisiophilus* je více citlivý nežli *P. frisingensis* (Flahaut et al., 2000).

V rámci rodu *Megasphaera* je rozlišováno pět druhů: *M. cerevisiae*, *M. paucivorans*, *M. sueciensis*, *M. elsdenii* a *M. micronuciformis*. Druhy *M. cerevisiae*, *M. paucivorans*, *M. sueciensis* jsou nacházeny pouze v souvislosti se zkaženým pivem, v jednom případě byla tato bakterie izolována z pivovarských kvasnic (Engelmann a Weiss, 1985; Haikara, 1989; Juvonen a Suihko, 2006). Druhy *M. elsdenii* a *M. micronuciformis* jsou izolovány z prostředí mimo pivovarský provoz – *M. elsdenii* se vyskytuje v bacheru ovcí a dobytka a ve střevním traktu a stolici člověka, *M. micronuciformis* je izolována z klinického materiálu (Marchandin et al., 2003). Bakterie rodu *Megasphaera* jsou nepohyblivé, mají tvar mírně oválných koků, které se vyskytují jednotlivě nebo po dvou (Haikara a Lounatmaa, 1987; Marchandin et al., 2009).

Do rodu *Selenomonas* je v současné době řazeno 10 druhů, z nichž pouze jediný, *Selenomonas lacticifex*, byl izolován ve spojitosti s kontaminovanými pivovarskými kvasnicemi (Schleifer et al., 1990) a nedávno také v biofilmu na povrchu zařízení ve stáčené lahvi (Vávrová et al., 2014). Ostatní druhy se vyskytují např. v ústní dutině člověka, v bacheru býložravců a ve střevech prasat a některých hlodavců (Dighe et al., 1998; Kingsley a Hoeniger, 1973; Moore et al., 1987; Zhang a Dong, 2009). Buňky *Selenomonas* mají měsíkovitý až helikální tvar buněk (název rodu pochází z řeckého „selenē“ = měsíc a „monas“ = jednotka) s několika bičíky vycházejícími ze svazku z centrální části konkávní strany buněk. Buňky se vyskytují jednotlivě, po dvou, nebo jsou uspořádány v krátkých řetících. Pohyb *Selenomonas* lze popsat jako převalující se (Shouche et al., 2009).

Rod *Zymophilus* zahrnuje dva druhy: *Z. paucivorans* a *Z. raffinovorans* nacházené vždy v souvislosti s pivovarskými provozy – v násadních kvasnicích a v odpadech vzniklých při výrobě piva. Název *Zymophilus* je odvozen od nejčastějšího místa výskytu – kvasnic, z řeckého „zyme“ = kvasnice a „philos“ = milovník (Schleifer et al., 1990). Na základě morfologické podobnosti byl *Zymophilus* dříve chybně identifikován jako *Pectinatus* (Motoyama a Ogata, 2000a). Bakterie rodu *Zymophilus* jsou rovné, mírně zakřivené až helikální pohyblivé tyčky vyskytující se nejčastěji jednotlivě nebo po dvou, nebo méně často v krátkých řetících. Pohyblivost buněk se může po opakovaném přeočkování vytratit (Schleifer et al., 2009).

2 VÝSKYT V PIVU/PIVOVARSKÉM PROVOZU

Bakterie *Pectinatus* (původně omylem považované za rod *Bacteroides*), byly poprvé zaznamenány ve zkažených pivech v 60. letech 20. století (Lee et al., 1980), bakterie *Megasphaera* v roce 1976 v Německu (Weiss et al., 1979). V následujících letech byly *Pectinatus* a *Megasphaera* izolovány ze zkažených piv v různých zemích Evropy, v Japonsku a USA, v souvislosti s modernizací plnicích technologií, zajišťujících snížení obsahu kyslíku v pivu (Back et al., 1988; Haikara, 1989; Haikara a Lounatmaa, 1987; Juvonen a Suihko, 2006; Schleifer et al., 1990; Takahashi, 1983).

Jako hlavní zdroje kontaminace piva jsou uváděny voda a vzduch. Bakterie *Pectinatus* byly detekovány v plnicích, v mazacích olejích smíchaných s pivem a vodou, v kanalizaci a drenážních systémech, ve vzduchu a na podlaze stáček haly, v kondenzní vodě na stropě stáček haly, biofilmu na členitých površích ve stáčírně lahví. *Megasphaera* byla izolována z vodovodního potrubí, z podlahy ve stáček hale a ze vzduchu v okolí pivovaru (Back, 1994, 2003; Henriksson a Haikara, 1991; Matoulková et al., 2012b; Paradh et al., 2014; Seidel-Rüfer, 1990; Vaughan et al., 2005; Vávrová et al., 2014). Mimo prostor stáček haly byla přítomnost bakterií *Pectinatus* potvrzena ojedinelé také v pivu v ležáckých tancích, v přetlačných tancích a v odpadních kanálech v podlaze na úseku filtrace piva (Matoulková et al., 2012b). Předpokládá se, že *Megasphaera* se může vyskytovat již v mladině při hlavním kvašení, detekována byla i v kvasnicích a v potrubí s CO₂ (Haikara a Helander, 2006; Watier et al., 1996). Zjištěna byla i přítomnost *Megasphaera* sou-

like manner, or they may not be moving at all (Haikara et al., 1981b; Chelack a Ingledew, 1987; Lee et al., 1980). They grow within the temperature range of 15–40 °C, with an optimum at 28–32 °C. At temperatures above 50 °C they die (Tholozan and Jacquemont, 1999). Sufficient for reliable killing of *Pectinatus* is an exposure of the temperature of 58–60 °C for 1 minute, which is a milder treatment than the normal pasteurization of beer (Watier et al., 1995). Individual species differ from each other in their sensitivity to elevated temperatures – the species *P. cerevisiophilus* is more sensitive than *P. frisingensis* (Flahaut et al., 2000).

Five species are distinguished within the genus *Megasphaera*: *M. cerevisiae*, *M. paucivorans*, *M. sueciensis*, *M. elsdenii* and *M. micronuciformis*. The species *M. cerevisiae*, *M. paucivorans* and *M. sueciensis* are found only in connection with spoiled beer; in one case this bacterium was isolated from brewer's yeast (Engelmann and Weiss, 1985; Haikara, 1989; Suihko and Juvonen, 2006). The species *M. elsdenii* and *M. micronuciformis* were isolated from outside of the brewing operation – *M. elsdenii* occurs in the rumen of sheep and cattle and in the intestinal tract and feces of man, *M. micronuciformis* was isolated from clinical material (Marchandin et al., 2003). Bacteria of the genus *Megasphaera* are stationary, are shaped like slightly oval cocci and occur singly or in pairs (Haikara and Lounatmaa, 1987; Marchandin et al., 2009).

The genus *Selenomonas* currently includes 10 species, of which only one, *Selenomonas lacticifex*, was isolated in association with contaminated brewer's yeast (Schleifer et al., 1990) and more recently also from the biofilm on the surface of a device in the bottling plant (Vávrová et al., 2014). Other species are found in the oral cavity of humans, in rumen and intestine of herbivores and in the intestine of pigs and some rodents (Dighe et al., 1998; Kingsley and Hoeniger, 1973; Moore et al., 1987; Zhang a Dong, 2009). Cells of *Selenomonas* have a moonlike to helical cell shape (name of the genus comes from the Greek „selenē“ = moon and „monas“ = unit) with several flagella projecting from a bunch in the central part of the concave side of the cell. Cells occur singly, in pairs or are arranged in short chains. *Selenomonas* movements can be described as tumbling (Shouche et al., 2009).

The genus *Zymophilus* includes two species: *Z. paucivorans* and *Z. raffinovorans*, always found in the context of brewing operations – in pitching yeast, and in wastes from beer production. The name *Zymophilus* is derived from the most common site of occurrence – yeast, from the Greek „zyme“ = yeast and „philos“ = lover (Schleifer et al., 1990). On the basis of morphological similarities, *Zymophilus* was previously erroneously identified as *Pectinatus* (Motoyama and Ogata, 2000a). Bacteria of the genus *Zymophilus* are straight, slightly curved to helical motile rods occurring most frequently singly or in pairs, or less often in short chains. Cell motility may disappear after repeated subculturing (Schleifer et al., 2009).

2 OCCURRENCE IN BEER AND IN BREWING OPERATIONS

Pectinatus bacteria (originally mistaken for the genus *Bacteroides*) were first recorded in spoiled beers in the 60s of the 20th century (Lee et al., 1980), *Megasphaera* bacteria in 1976 in Germany (Weiss et al., 1979). In the following years *Pectinatus* and *Megasphaera* were isolated from contaminated beers in different countries of Europe, Japan and the USA, in the context of the modernization of filling technologies ensuring reduced oxygen content in beer (Back et al., 1988; Haikara, 1989; Haikara and Lounatmaa, 1987; Juvonen and Suihko, 2006; Schleifer et al., 1990; Takahashi, 1983).

Water and air are listed as major sources of contamination of beer. *Pectinatus* bacteria were detected in fillers, in lubricating oils mixed with beer and water, in the sewer and drainage systems, in the air and on the floor of the bottling hall, in water condensed on bottling hall ceiling, and in biofilm on rugged surfaces in bottling halls. *Megasphaera* was isolated from water pipelines, from the bottling hall floor and in the air in the vicinity of the brewery (Back 1994, 2003; Haikara and Henriksson, 1991; Matoulková et al., 2012b; Paradh et al., 2014; Seidel-Rüfer, 1990; Vaughan et al., 2005; Vávrová et al., 2014). Outside the bottling hall space the presence of *Pectinatus* bacteria was confirmed occasionally also in beer in the lager cellar, in the finished beer in bright beer tanks and in drainage channels in the area of beer filtration (Matoulková et al., 2012b). It is assumed that *Megasphaera* may occur already in the wort during the main fermentation; it was also detected in yeast and in pipelines with CO₂ (Haikara and Helander, 2006; Watier et al., 1996). The presence of *Megasphaera* bacteria simultaneously with *Pectinatus* was also detected (Back, 2005). Sele-

časně s bakteriemi *Pectinatus* (Back, 2005). Bakterie *Selenomonas* a *Zymophilus* jsou spojovány převážně s pivovarskými kvasnicemi. Uváděna je přítomnost *Z. raffinosivorans* v odpadech a kanálech v pivovaru (Schleifer et al., 1990; Seidel-Rüfer, 1990). V posledních studiích byl prokázán častý výskyt bakterií *Selenomonas lactificifex* v biofilmu v prostředí stáčírny lahví (Felsberg et al., 2014; Vávrová et al., 2014).

Mikroorganismy jsou zanášeny do pivovaru např. prostřednictvím špinavých lahví – turbulence vzduchu ve stáček hale pak zajišťuje jejich neustálý pohyb v prostředí stáček haly. Zdrojem kontaminace piva během jeho plnění do obalů mohou být dopravníkové pásy, zejména v případech, kdy nejsou zahrnuty do procesu sanitace linky. Po sanitaci pak dochází k rychlé rekontaminaci prostředí plniče a pivo se snadno kontaminuje díky nepřetržité aerosolizaci piva v prostoru plniče, resp. monobloku (Haikara a Helander, 2006; Matoulková et al., 2012b). *Pectinatus* zřejmě není náhodnou kontaminací, ale trvale obývá určitá prostředí v pivovarech. Serologicky identické kmeny *Pectinatus* byly izolovány z jednoho provozu s intervaly čtyř let mezi jednotlivými izolacemi (Haikara, 1983; Hakalehto a Finne, 1990).

Perzistence mikroorganismů v prostředí stáček haly je podporována vysokou vlhkostí a zvýšenou teplotou, která se, zejména v letním období, blíží optimální teplotě růstu většiny pivo-kazících mikroorganismů. S rostoucí teplotou a vlhkostí stoupá počet mikroorganismů ve vzduchu (Back, 1994). *Pectinatus* je však schopen perzistovat při teplotách nižších než 10 °C – riziko kontaminace piva ve stáčkárnách, kde je udržována nízká teplota, je pak závislé zejména na kvalitě sanitčního procesu (Chowdhury et al., 1995; Suzuki, 2011).

Přestože je *Pectinatus* striktně anaerobní, je zřejmě schopný přežít po nějakou dobu v aerosolu. Obecně nejvyšší počty mikroorganismů jsou nacházeny ve vzduchu v plniči lahví, zřejmě z důvodu nepřetržité aerosolizace piva na tomto místě (Haikara a Helander, 2006). Důležité je umístění zařízení ve stáček hale. Při testování přítomnosti a počtu mikroorganismů ve vzduchu stáček haly ve finských pivovarech bylo zjištěno, že počet bakterií ve vzduchu v plniči je nižší při větší vzdálenosti plniče od myčky lahví. Dalším faktorem je technické řešení myčky lahví s výstupem na opačné straně nežli vstup lahví – takové uspořádání snižuje riziko rekontaminace lahví (Back, 1994; Henriksson a Haikara, 1991; Matoulková et al., 2012b).

Výhodné je pro anaerobní bakterie přežívání v biofilmu. Primárními kolonizátory povrchů jsou mikroorganismy produkující extracelulární polymery; v pivovarském provozu jsou to octové bakterie (Storgards et al., 2006). Ty zároveň velice rychle spotřebují kyslík a vytvoří tak anaerobní podmínky podporující růst dalších mikroorganismů, např. mléčných bakterií a *Pectinatus*. Mléčné bakterie produkují kyselinu mléčnou, která je pro bakterie *Pectinatus* vhodným substrátem. Postupným odumíráním mikroorganismů se navíc zvyšuje pH v biofilmu, což také podporuje růst *Pectinatus* a *Megasphaera* (Back, 1994). Biofilm chrání bakterie proti působení kyslíku, vysušení a účinkům dezinfekčních látek. Tvorba biofilmu je podporována nedokonalým mechanickým čištěním před chemickou částí sanitace – biofilm se pak stává trvalým zdrojem kontaminace. Pivo, které se dostává do kontaktu s biofilmem, vytváří ideální prostředí pro přežití a rozvoj mikroorganismů, obzvláště v místech, která nejsou přístupná pro dokonalé mechanické a chemické čištění – např. v prasklinách v podlaze, stěnách či stropě ve stáček hale nebo i jinde v provozu (Back, 1994, 2003; Matoulková et al., 2012b).

V tab. 1 je uveden přehled druhů bakterií *Megasphaera*, *Pectinatus*, *Selenomonas* a *Zymophilus*, včetně druhů, které jsou nacházeny v prostředí mimo pivovarskou výrobu.

3 SCHOPNOST STRIKTNĚ ANAEROBNÍCH BAKTERIÍ KAZIT PIVO

Pivo zkažené bakteriemi *Pectinatus* a *Megasphaera* je charakteristické masivním zákalem a intenzivním zápachem připomínajícím zkažená vejce. Schopnost těchto bakterií využívat různé zdroje uhlíku, např. laktát a neobvyklé cukry, je obzvláště nebezpečná v případech, kdy dojde ke smíšené infekci piva, nebo u dietních piv, u kterých se normálně předpokládá snížená náchylnost ke kažení právě z důvodu velmi nízkého obsahu zkvasitelných cukrů (Chelack a Ingledew, 1987). V současné době je podle odhadů *Pectinatus* původcem 20–30 % případů bakteriálního kažení lahvového, velmi často nepasterovaného piva. Náchylnější ke kažení touto bakterií jsou dále piva nealkoholická, nízkalkoholická a méně chmelená. Kontaminované pivo se zakalí během 2–14 dnů, v závislosti na počátečním počtu buněk, druhu piva a podmínkách jeho skladování. Pro *Megasphaera* se uvádí odhad 3–7 % (Sakamoto a Konings,

nomonas and *Zymophilus* are associated mainly with brewer's yeast. The presence of *Z. raffinosivorans* in waste and canals in the brewery was reported (Schleifer et al., 1990; Seidel-Rüfer, 1990). Recent studies have shown a high incidence of *Selenomonas lactificifex* bacteria in the bottling plant biofilm (Felsberg et al., 2014; Vávrová et al., 2014).

Microorganisms are introduced back to the brewery e.g. by dirty bottles. The air turbulence in the bottling hall then ensures their constant movement in the bottling hall environment. A source of contamination during beer filling into the containers can be conveyor belts, especially when they were not included in the sanitizing process of the line. Rapid recontamination of the beer filler environment then occurs after the sanitizing and beer is easily contaminated due to its continuous aerosolization in the filler space and/or the monoblock (Haikara and Helander, 2006; Matoulková et al., 2012b). *Pectinatus* is very likely not an accidental contamination, but permanently inhabits certain environments in breweries. Serologically identical *Pectinatus* strains were isolated from a single operation with intervals of four years between isolations (Haikara, 1983; Hakalehto and Finn, 1990).

The persistence of microorganisms in the bottling hall environment is supported by high humidity and elevated temperature, which, especially in the summer, approaches the optimum growth temperature for most beer-spoilage microorganisms. The number of microorganisms in the air increases with increasing temperature and humidity (Back, 1994). *Pectinatus* is however able to persist but at temperatures lower than 10 °C – the risk of contamination of beer in filling halls, which are maintained at a low temperature, is then particularly dependent on the quality of the sanitation process (Chowdhury et al., 1995; Suzuki, 2011).

Although *Pectinatus* is strictly anaerobic, it is apparently able to survive for some time in an aerosol. Generally, the highest numbers of microorganisms are found in the air in the bottle fillers, apparently because of continuous aerosolization of beer in this location (Haikara and Helander, 2006). Important is the location of the device in the bottling hall. Tests for the presence and number of microorganisms in the air filling hall in Finnish breweries showed that the number of bacteria in the air in the filler is the lower the greater is its distance from the bottle washer. Another factor is the technical solution of the bottle washer – an arrangement with an outlet at the opposite side than the bottle inlet reduces the risk of recontamination of bottles (Back, 1994; Haikara and Henriksson, 1991; Matoulková et al., 2012b).

Convenient for anaerobic bacteria is the survival in a biofilm. The primary colonizers of surfaces are microorganisms that produce extracellular polymers; in the brewing operation this involves acetic acid bacteria (Storgards et al., 2006). They also consume oxygen very quickly and thus create anaerobic conditions supporting the growth of other microorganisms, e.g. lactic bacteria and *Pectinatus*. Lactic bacteria produce lactic acid, which is a suitable substrate for *Pectinatus*. Moreover, gradual death of microorganisms increases the pH of the biofilm, which also promotes the growth of *Megasphaera* and *Pectinatus* (Back, 1994). The biofilm protects the bacteria against the action of oxygen, desiccation and disinfecting agents. Biofilm formation is supported by imperfect mechanical cleaning before chemical sanitizing – biofilm then becomes a permanent source of contamination. The beer that comes in contact with biofilm creates an ideal environment for the survival and development of microorganisms, especially in places that are not accessible for perfect mechanical and chemical cleaning – e.g. cracks in the floor, walls and ceiling in the bottling hall or elsewhere in the operation (Back 1994, 2003; Matoulková et al., 2012b). Table 1 gives an overview of the types of *Megasphaera*, *Pectinatus*, *Selenomonas* and *Zymophilus* bacteria, including species that are found in the environment outside brewing.

3 THE ABILITY OF STRICTLY ANAEROBIC BACTERIA TO SPOIL BEER

Beer spoiled by *Megasphaera* and *Pectinatus* bacteria is characterized by massive haze and an intense odor reminiscent of rotten eggs. The ability of these bacteria to utilize different carbon sources, e.g. lactate and unusual sugars is particularly dangerous in those cases where there is a mixed infection of beer, or in diet beer, which are normally expected to have reduced susceptibility to spoilage precisely because of the very low content of fermentable sugars (Chelack and Ingledew, 1987). Currently it is estimated that *Pectinatus* is responsible for 20–30 % of cases of bacterial spoilage of bottled, often non-pasteurized beer. More prone to bacterial spoilage are also non-alcoholic, low alcohol and low hopped beers. Contaminated beer becomes turbid within

Tab. 1 Základní charakteristika rodů *Megasphaera*, *Pectinatus*, *Selenomonas* a *Zymophilus* / Table 1 Basic characteristics of genera *Megasphaera*, *Pectinatus*, *Selenomonas* and *Zymophilus*

Rod / Genus	Druh / Species	Morfologie buněk / Cell morphology	Výskyt / Occurrence	Schopnost kazit pivo / Beer-spoilage ability
<i>Megasphaera</i>	<i>M. cerevisiae</i>	koky, mírně prodloužené / cocci, slightly elongated	pivo, pivovarský provoz / beer, brewery plant	+
	<i>M. paucivorans</i>	koky / cocci	pivo / beer	+
	<i>M. sueciensis</i>	koky / cocci	pivo / beer	+
	<i>M. micronuciformis</i>	koky / cocci	klinický materiál / clinical specimens	není známo / not known
	<i>M. elsdenii</i>	koky / cocci	bachor ovcí a dobytka, střevní trakt člověka a prasat / rumen of sheep and cattle, intestine of man and pigs	není známo / not known
<i>Pectinatus</i>	<i>P. cerevisiophilus</i>	pohyblivé tyčky, starší buňky mají hadovitý tvar / motile rods, older cells have snake-like shape	pivo, pivovarský provoz / beer, brewery plant	+
	<i>P. frisingensis</i>	pohyblivé tyčky, starší buňky mají hadovitý tvar / motile rods, older cells have snake-like shape	pivo, pivovarský provoz / beer, brewery plant	+
	<i>P. haikarae</i>	pohyblivé tyčky, starší buňky mají hadovitý tvar / motile rods, older cells have snake-like shape	pivo, pivovarský provoz / beer, brewery plant	+
	<i>P. brassicae</i>	zakřivené tyčky / curved rods	odpad z výroby nakládaných okurek / salty pickle wastewater	není známo / not known
	<i>P. sottacenotis</i>	pohyblivé tyčky, starší buňky mají hadovitý tvar / motile rods, older cells have snake-like shape	nádrž na zkažené kvašené okurky / pickle spoilage tank	není známo / not known
<i>Selenomonas</i>	<i>S. lactificex</i>	pohyblivé zakřivené tyčky / motile curved rods	kvasnice, pivovarský provoz / brewing yeasts, brewery plant	+
	<i>S. artemidis</i>	pohyblivé zakřivené tyčky / motile curved rods	klinický materiál / clinical specimens	není známo / not known
	<i>S. bovis</i>	pohyblivé zakřivené tyčky / motile curved rods	bachor jaka / rumen of yak	není známo / not known
	<i>S. diana</i>	pohyblivé zakřivené tyčky / motile curved rods	klinický materiál / clinical specimens	není známo / not known
	<i>S. flueggei</i>	pohyblivé zakřivené tyčky / motile curved rods	klinický materiál / clinical specimens	není známo / not known
	<i>S. infelix</i>	pohyblivé zakřivené tyčky / motile curved rods	klinický materiál / clinical specimens	není známo / not known
	<i>S. lipolytica</i>	pohyblivé zakřivené tyčky / motile curved rods	odpad z výroby jedlých olejů / wastes from an edible oil mill	není známo / not known
	<i>S. noxia</i>	pohyblivé zakřivené tyčky / motile curved rods	klinický materiál / clinical specimens	není známo / not known
	<i>S. ruminantium</i>	pohyblivé zakřivené tyčky / motile curved rods	bachor ovcí a dobytka, střevní trakt prasat / rumen of sheep and cattle, intestine of pigs	není známo / not known
	<i>S. sputigena</i>	pohyblivé zakřivené tyčky / motile curved rods	klinický materiál / clinical specimens	není známo / not known
<i>Zymophilus</i>	<i>Z. paucivorans</i>	pohyblivé zakřivené tyčky / motile curved rods	kvasnice, odpady / yeasts, brewery wastes	+
	<i>Z. raffinivorans</i>	pohyblivé zakřivené tyčky / motile curved rods	kvasnice, odpady / yeasts, brewery wastes	+

2003). *Megasphaera* kontaminuje nejčastěji nepasterovaná piva. Zákal se v pivu vytváří velmi pomalu, po dobu 4–6 týdnů, dokonce i v nízkoalkoholickém pivu (Haikara a Lounatmaa, 1987).

Hlavním faktorem ovlivňujícím růst striktních anaerobů v pivu je obsah kyslíku. *Pectinatus* a *Megasphaera* se množí v pivu s obsahem kyslíku menším než 0,3 mg/l, kontaminace je tedy problémem zejména ve velkých moderních pivovarech (Back, 2005). Druh *P. frisingensis* toleruje kyslík lépe než *P. cerevisiophilus* – u obou druhů byla v laboratorní studii prokázána schopnost růstu v pivech s obsahem rozpuštěného kyslíku v rozmezí 0,4–0,8 mg/l (Chowdhury et al., 1995). Riziko kontaminace piva tedy závisí na různých faktorech – obsahu kyslíku, alkoholu, pH, množství kontaminujících bakterií atd.

2–14 days depending on the initial number of cells and the type of beer storage conditions. Spoilage frequency of 3–7 % is estimated for *Megasphaera* (Sakamoto and Konings, 2003). *Megasphaera* contaminates mostly non-pasteurized beer. Haze in beer is created very slowly, for 4–6 weeks, even in low-alcoholic beer (Haikara and Lounatmaa, 1987). The main factor influencing the growth of strict anaerobes in beer is oxygen content. *Pectinatus* and *Megasphaera* proliferate in beer with an oxygen content of less than 0.3 mg/l, contamination is therefore a particular problem in large modern breweries (Back, 2005). The species *P. frisingensis* tolerates more oxygen than *P. cerevisiophilus* – a laboratory study of both species demonstrated their ability to grow in beers with a content of dissolved oxy-

Hlavním produktem metabolismu bakterií *Pectinatus* je propionát v množství až 100 mmol/l, dále acetat, acetoin, sirovodík, methylmercaptan a dimethylsulfid a stopová množství butyrátu (Membré a Tholozan, 1994; Schleifer et al., 1990). *Megasphaera* produkuje butyrát jako hlavní produkt, dále pak izobutyřát, propionát, valerát, izovalerát, kaproát a sirovodík (Chelack a Ingledew, 1987). Druh *M. cerevisiae* produkuje navíc octovou kyselinu a *M. sueciensis* stopová množství acetoinu (Juvonen a Suihko, 2006). Pro růst v pivu jsou tyto mikroorganismy dobře přizpůsobeny – tolerují pH v rozmezí 3,5–8,0 (u *Megasphaera* se uvádí rozmezí 4,0–7,5) a alkohol v koncentraci až 4,5 % (w/v) u *Pectinatus* a do 3,5 % u bakterií *Megasphaera* (Haikara a Lounatmaa, 1987; Haikara et al., 1981b; Chihib et al., 1999). Tolerance k pH je však závislá na obsahu alkoholu a dalších vlastnostech piva (Suzuki, 2011). Druh *P. frisingensis* vykazuje vyšší rezistenci k působení kyslíku a alkoholu a je schopen využívat širší spektrum zdrojů uhlíku nežli *P. cerevisiiphilus* (Tholozan et al., 1994, 1996, 1997).

Selenomonas lacticifex je uváděna jako pivo-kazící bakterie, přestože nebyla nikdy izolována ze zkaženého piva, ale pouze z pivovarských kvasnic (Schleifer et al., 1990; Vaughan et al., 2005) a z biofilmů v prostředí stáčírny lahví (Vávrová et al., 2014). Při zaočkování do piva je schopna růstu při pH nad 4,3–4,6 (Seidel-Rüfer, 1990). *S. lacticifex* zkvašuje glukosu na mléčnou kyselinu jako hlavní produkt, s kyselinami octovou a propionovou jako vedlejšími produkty (Haikara, 1989). Tím se také liší od většiny ostatních druhů rodu *Selenomonas*, které zkvašují glukosu za vzniku kyselin propionové a octové (Shouche et al., 2009).

Zymophilus poškozuje pivo produkcí kyselin octové a propionové, *Z. paucivorans* navíc produkuje stopová množství mléčné kyseliny (Schleifer et al., 1990). *Zymophilus* roste při pH nad 4,6 (druh *Z. paucivorans* nad 5,0) a při obsahu alkoholu do 5 % (w/v) a jeho schopnost kazit pivo je uváděna jako podobná rodu *Pectinatus* (Seidel-Rüfer, 1990).

4 METODY DETEKCE

4.1 Kulturní metody

Mikrobiologická kontrola v pivovarech využívá převážně klasické kulturní metody kombinované s jednoduchým fenotypovým určením izolátů. Detekce kontaminantů v pivu spočívá v jejich zachycení (nakoncentrování) z vhodného objemu (100–500 ml) membránovou filtrací a kultivací na vhodném médiu. Pro detekci bakterií *Pectinatus* a ostatních anaerobů v pivu nelze tuto techniku použít – membránová filtrace není úspěšná ani v případě, že se použije předredukováná půda a filtrace probíhá v atmosféře CO₂ (Haikara, 1984; Haikara, 1985).

V provozních laboratořích se ke stanovení přítomnosti anaerobů (v případě *Pectinatus* a *Megasphaera*) používá tzv. „shelf-life test“, při kterém se pivo uloží při pokojové teplotě a po dobu až šesti týdnů je sledována tvorba zákalu. Rychlejší variantou je tzv. forcing test, při kterém se uzavřené lahve inkubují při teplotě 28–30 °C. Dobu inkubace z 6 na 4 týdny může zkrátit přidavek koncentrovaného MRS bujónu s fruktosou do vyšetřovaného piva v poměru 1:5 (Juvonen et al., 1999) nebo 1:1 (Brandl a Geiger, 2003), případně NBB-C médium, které je jako součást forcing testu doporučováno v metodikách EBC (Hage et al., 2005).

Většina doporučovaných půd pro anaeroby je tekutá, s obsahem látek snižujících redoxpotenciál média (např. askorbová kyselina, thioglykolát sodný, cysteinhydrochlorid atd.). Pro kultivaci všech čtyř uvedených rodů je nejvhodnější teplota 28–32 °C a pH v rozmezí 5,0–7,0. Pro kultivaci bakterií *Pectinatus* a ostatních popisovaných anaerobů lze použít MRS bujón s běžným či modifikovaným složením (Chaban et al., 2005; Gares et al., 1993; Jespersen a Jakobsen, 1996; Schleifer et al., 1990; Suiker et al., 2007; Watier et al., 1993). MRS-bujón je používán také pro kulturní krok před PCR identifikací (viz dále). Pro kultivaci striktně anaerobních bakterií je dále doporučován komerčně dodávaný bujón Raka-Ray (Taidi et al., 2003) a médium podle Nakagawy (Foster a Andersen, 1999; Chaban et al., 2005; Takahashi, 1983).

Pro účely taxonomických studií a sledování produkce metabolitů *Pectinatus* je používán PYF-bujón, původně určený pro kultivaci bakterií *Megasphaera* (Engelmann a Weiss, 1985; Haikara et al., 1981b; aj.). Podle použitého zdroje uhlíku je půda označována PYF (fruktosa), PYG (glukosa) nebo PYL (laktát). Při přípravě půdy pro kultivaci *Megasphaera* je nutné zdroj uhlíku (např. fruktosu) autoklávkovat, aby byl touto bakterií využíván (Haikara a Lounatmaa, 1987). PYF bujón je, vedle MRS bujónu,

gen in the range of 0.4–0.8 mg/l (Chowdhury et al., 1995). The risk of contamination of beer thus depends on various factors – oxygen content, alcohol, pH, amount of contaminating bacteria, etc. The main product of *Pectinatus* metabolism is propionate in an amount of up to 100 mmol/l, as well as acetate, acetoin, hydrogen sulfide, methyl mercaptan and dimethyl sulfide, and trace amounts of butyrate (Membré and Tholozan, 1994; Schleifer et al., 1990). *Megasphaera* produces butyrate as the major product, together with isobutyrate, propionate, valerate, isovalerate, caproate, and hydrogen sulfide (Chelack and Ingledew, 1987). In addition, the species *M. cerevisiae* produces acetic acid and *M. sueciensis* traces of acetoin (Juvonen and Suihko, 2006). The microorganisms are well adapted to growth in beer – they tolerate pH in the range of 3.5 to 8.0 (with *Megasphaera* the range is stated from 4.0 to 7.5) and an alcohol in a concentration of up to 4.5 % (w/v) for *Pectinatus* and to 3.5 % for *Megasphaera* (Chihib et al., 1999; Haikara and Lounatmaa, 1987; Haikara et al., 1981b). The pH tolerance is dependent on alcohol content and other properties of the beer (Suzuki, 2011). *P. frisingensis* has a higher resistance to oxygen and alcohol and is able to use a broader range of carbon sources than *P. cerevisiiphilus* (Tholozan et al., 1994, 1996, 1997).

Selenomonas lacticifex is referred to as a beer-spoilage bacterium although it has never been isolated from spoiled beer, but only from brewer's yeast (Schleifer et al., 1990; Vaughan et al., 2005) and from biofilms in the bottling plant environment (Vávrová et al., 2014). When inoculated into the beer it is capable of growth at pH of 4.3–4.6 (Seidel-Rüfer, 1990). *S. lacticifex* ferments glucose to lactic acid as the major product, with acetic acid and propionic acid as by-products (Haikara, 1989). In this it also differs from most other species of the genus *Selenomonas*, which ferment glucose to form propionic and acetic acids (Shouche et al., 2009). *Zymophilus* damages beer by producing acetic acid and propionic acid, *Z. paucivorans* additionally produces trace amounts of lactic acid (Schleifer et al., 1990). *Zymophilus* grows at pH above 4.6 (*Z. paucivorans* above 5.0), and at alcohol content up to 5% (w/v) and its ability to spoil beer is stated to be similar to the genus *Pectinatus* (Seidel-Rüfer, 1990).

4. DETECTION METHODS

4.1 Cultivation methods

Microbiological control in breweries uses mainly classical culture methods combined with a simple phenotypic identification of isolates. Detection of contaminants in beer consists in their capture (concentration) from a suitable volume (100–500 ml) by membrane filtration and cultivation in a suitable medium. This technique cannot be used for the detection of *Pectinatus* and other anaerobes in beer; membrane filtration is not successful even if a pre-reduced medium is used and the filtration takes place in a CO₂ atmosphere (Haikara, 1984; Haikara, 1985). In brewery laboratories, the determination of the presence of anaerobes (*Pectinatus* and *Megasphaera*) makes use of the so-called „shelf-life test“, in which the beer is stored at room temperature for up to six weeks and turbidity formation is observed. A faster variant is called a forcing test, in which sealed bottles were incubated at 28–30 °C. The incubation period can be reduced from 6 to 4 weeks by the addition of concentrated MRS broth with fructose into the investigated beer in a 1: 5 (Juvonen et al., 1999) or 1: 1 (Brandl and Geiger, 2003) ratio, or NBB-C medium, which is recommended by EBC as part of the forcing test methodologies (Hage et al., 2005).

Most media recommended for anaerobes are liquid and contain substances lowering redox potential of the medium (e.g. ascorbic acid, sodium thioglycolate, cysteine hydrochloride, etc.). The suitable temperature for the culturing of the four genera is 28–32 °C and pH in the range of 5.0 to 7.0. The cultivation of *Pectinatus* and other described anaerobes can be performed in MRS broth with a conventional or modified composition (Chaban et al., 2005; Gares et al., 1993; Jespersen and Jakobsen, 1996; Schleifer et al., 1990; Suiker et al., 2007; Watier et al., 1993). MRS-broth is also used for the culture step prior to the PCR identification (see below). For the cultivation of strictly anaerobic bacteria is further recommended the commercially available Raka-Ray broth (Taidi et al., 2003) and the medium according Nakagawa (Foster and Andersen, 1999; Chaban et al., 2005; Takahashi, 1983).

Taxonomic studies and monitoring of the production of *Pectinatus* metabolites make use of PYF broth, originally designed for the cultivation of *Megasphaera* (Engelmann and Weiss, 1985; Haikara et al., 1981b, etc.). Depending on the carbon source the PYF broth is denoted PYF (fructose), PYG (glucose) or PYL (lactate). When preparing the medium for cultivation of *Megasphaera* it is necessary

používán pro kultivaci sbírkových kmenů *Selenomonas* (Juvonen et al., 2008).

Doporučovaným médiem pro detekci bakterií *Pectinatus* a *Megasphaera* v pivu je SMMP (selective medium for *Megasphaera* and *Pectinatus*; selektivní médium pro *Megasphaera* a *Pectinatus*), které se přidává do vyšetřovaného piva (Anonymous, 1998; Lee, 1994). SMMP obsahuje látky snižující redoxpotenciál, laktát jako jediný zdroj uhlíku, aktidion pro inhibici růstu kvasinek, krystalovou violet a sodium fusidát pro inhibici růstu gram pozitivních bakterií. Alkohol (přítomný v pivu, nebo doplněný do půdy při analýze nealkoholického piva) a hořké chmelové látky inhibují bakterie čeledi *Enterobacteriaceae*. Půda se inokuluje tak, že se 130 ml vyšetřovaného piva přidá do baňky s 20 ml SMMP, uzavře, promíchá a inkubuje 14 dní při teplotě 28–30 °C. Každý den je sledována tvorba zákalu a sedimenty a změny v zabarvení média. Zákal média je možno považovat za předběžný průkaz přítomnosti *Pectinatus* nebo *Megasphaera*. Půda by také měla změnit zabarvení: při růstu *Pectinatus* zůstane půda fialová se sedimentem, při růstu *Megasphaera* se zbarví žlutě. Laktát jako jediný zdroj uhlíku zabrání růstu *Zymomonas* (Anonymous, 1998; Lee, 1994).

Starší studie doporučují pro detekci *Pectinatus* LL-agar (lactate lead acetate agar; agar s laktátem a octanem olovnatým) používaný v kombinaci s tzv. Leeho zkumavkami (Lee et al., 1981; Ogg et al., 1979). Tyto zkumavky mají dvojitou stěnu – bakterie v nich rostou v půdě mezi dvěma stěnami a vytváří počítatelné kolonie. LL-agar obsahuje β-fenylethanol pro inhibici aerobních a fakultativně anaerobních gramnegativních bakterií, sodium laktát jako jediný zdroj uhlíku (vylučuje růst *Zymomonas*) a octan olovnatý pro odlišení gram pozitivních bakterií (bílé kolonie) od *Pectinatus*, který produkuje H₂S (černé kolonie). *Pectinatus* vytvoří na LL-agaru viditelné kolonie za 2–3 dny, černé zbarvení se projeví za další 2–3 dny (Chelack a Ingledew, 1987; Lee et al., 1981). Omezením metody je nedostupnost Leeho zkumavek (nevyrábí se komerčně) a nízká citlivost – vzhledem k malému objemu inokula (0,1 ml) metoda neumožňuje detekci nízkých počtů bakterií ve vzorku.

NBB (Nachweismedium für bierschädliche Bakterien; médium pro stanovení pivo-škodlivých bakterií, Döhler, Darmstadt, Německo) je běžně používané v pivovarské praxi pro detekci mikroorganismů schopných kazit pivo. Půda je používána v různých modifikacích pro různé účely (Back, 2005; Jespersen a Jakobsen, 1996). Půdu vyrábí firma Döhler (Darmstadt, Německo) ve formě bujónu, agaru a koncentrátu. Koncentrát (NBB-C) se v různém poměru smíchává s vodou a analyzovaným pivem podle účelu stanovení – pro detekci bakterií kazících pivo obligátně, potenciálně nebo pro obecné stanovení přítomnosti bakterií v pivu (Back, 2005).

MRS bujón s modifikovaným složením, tzv. MRS-T obsahující směs tetrahydroiso-α-kyselin a β-fenylethanol pro inhibici doprovodné bakteriální mikroflóry, umožňuje detekci bakterií *Pectinatus* ve vzorku stěru odebraného z provozních zařízení. Půda je odběrová a zároveň i kultivační. Inkubace probíhá při teplotě 28–30 °C a sleduje se tvorba zákalu ve spodní části zkumavky. Typické hadovité buňky bakterií *Pectinatus* lze mikroskopicky zjistit už po 24–48 hodinách od inokulace (Matoulková et al., 2012a). Půda MRS-T bez obsahu β-fenylethanolu byla použita pro izolaci a následnou PCR-identifikaci bakterií *Selenomonas lacticifex* z prostředí stáček haly pivovaru (Felsberg et al., 2014; Vávrová et al., 2014).

Selektivní půdy pro specifickou detekci bakterií *Zymophilus* a *Selenomonas* nebyly vyvinuty.

4.2 Metody založené na PCR

Principem PCR (polymerasové řetězové reakce) je amplifikace vybraného („hledaného“) úseku DNA. Syntézu kopií provádí enzym DNA-polymerasa a oblast na DNA určená k amplifikaci je ohraničena dvojicí krátkých oligonukleotidů (tzv. primerů). Cílem PCR reakce je zvýšení počtu kopií hledané sekvence DNA na detekovatelnou koncentraci. Produkty PCR-reakcí lze pak následně porovnávat, zjišťovat jejich velikost (např. pomocí gelové elektroforézy při tzv. end-point neboli standardní PCR), sekvenci a např. přítomnost míst rozpoznávaných a štěpených restriktivními enzymy (např. RFLP metoda).

Při použití PCR pro detekci bakterií *Pectinatus* v pivu je nutné zvýšit citlivost metody přípravou vzorku před zpracováním, zahrnutím kultivačního kroku, neboť PCR v základním provedení (reakce probíhá nejčastěji v objemu 25–50 µl) neumožňuje přímo detekovat několik bakteriálních buněk v pivu (Satokari et al., 1998). Kontaminované pivo obsahuje většinou nízké počty mikroorganismů. Proto je vhodné vyšetřovaný vzorek piva před samotnou analýzou převést do vhodného média a inkubovat za účelem zvýšení počtu bakterií (Ju-

to autoclave the carbon source (e.g. fructose) to make it utilisable by this bacterium (Haikara and Lounatmaa, 1987). Apart from the MRS broth PYF broth is used for the culture of collection strains of *Selenomonas* (Juvonen et al., 2008).

The recommended medium for detecting *Pectinatus* and *Megasphaera* in beer is SMMP (selective medium for *Megasphaera* and *Pectinatus*), which is added to the tested beer (Anonymous, 1998; Lee, 1994). SMMP contains substances lowering the redox potential, lactate as a sole carbon source, actidione for inhibiting the growth of yeasts, crystal violet, and sodium fusidate for inhibiting the growth of Gram-positive bacteria. Alcohol (present in beer or added to the medium when analyzing non-alcoholic beer) and bitter substances inhibit bacteria of the family *Enterobacteriaceae*. The medium is inoculated as follows: 130 ml of the tested beer is poured into a flask with 20 ml of SMMP, sealed, mixed and incubated for 14 days at 28 to 30 °C. The formation of turbidity or sediment and change in the medium color are monitored each day. Turbidity of the medium can be considered as a preliminary evidence of the presence *Megasphaera* or *Pectinatus*. The medium should also change its color: during the growth of *Pectinatus* the medium will remain purple with sediment, the growth of *Megasphaera* turns it yellow. Lactate as the sole carbon source prevents the growth of *Zymomonas* (Anonymous, 1998; Lee, 1994).

For the detection of *Pectinatus*, earlier studies suggest LL-agar (lactate lead acetate agar) used in combination with so-called Lee tubes (Lee et al., 1981; Ogg et al., 1979). These tubes have a double wall and the bacteria grow in the medium between the two walls and produce readily counted colonies. LL-agar contains β-phenylethanol to inhibit aerobic and facultatively anaerobic Gram-negative bacteria, sodium lactate as a sole carbon source (prevents *Zymomonas* growth) and lead acetate for differentiation of Gram-positive bacteria (white colonies) from *Pectinatus* which produces H₂S (black colonies). On LL-agar, *Pectinatus* produces visible colonies after 2–3 days; the black color appears in the next 2–3 days (Chelack and Ingledew, 1987; Lee et al., 1981). The limiting feature of the method is unavailability of Lee tubes (not available commercially) and low sensitivity – due to the small volume of the inoculum (0.1 ml) the method cannot detect low numbers of bacteria in the sample.

NBB (Nachweismedium für bierschädliche Bakterien, Döhler, Darmstadt, Germany) is commonly used in brewing practice for the detection of microorganisms capable of spoiling beer. The medium is used in various forms for different purposes (Back, 2005; Jespersen and Jakobsen, 1996). It is produced by Döhler (Darmstadt, Germany) as a broth, agar and concentrate. The concentrate (NBB-C) is mixed in varying proportions with water and analyzed beer according to the purpose of the test – for the detection of obligate or potential beer spoilage bacteria or for the general determination of the presence of bacteria in beer (Back, 2005).

MRS broth with a modified composition, the so-called MRS-T containing a mixture of tetrahydroiso-α-acids and β-phenylethanol for inhibiting accompanying bacterial microflora, allows the detection of *Pectinatus* in a swab sample taken from brewery operation devices. The medium is suitable for sampling and is also for cultivation. Incubation is carried out at a temperature of 28–30 °C and the formation of turbidity at the bottom of the tube is monitored. Typical snake-like *Pectinatus* cells can be detected microscopically already after 24–48 hours from inoculation (Matoulková et al., 2012a). The MRS-T medium without β-phenylethanol was used for the isolation and subsequent PCR-identification of *Selenomonas lacticifex* bacteria in the brewery bottling hall environment (Felsberg et al., 2014; Vávrová et al., 2014). No selective media for the specific detection of *Zymophilus* and *Selenomonas* have so far been developed.

4.2 PCR-based methods

The principle of PCR (polymerase chain reaction) is the amplification of a selected („searched“) DNA region. The synthesis of the copies is done by the enzyme DNA polymerase and the DNA region designed for amplification is bounded by a pair of short oligonucleotides (called primers). The aim of the PCR reaction is to increase the number of copies of the DNA sequence sought to a detectable concentration. The products of the PCR reactions can subsequently be compared, their size determined (e.g. by gel electrophoresis with the so-called end-point or standard PCR), sequence, and for example the presence of sites recognized and digested by restriction enzymes (e.g. the RFLP method).

When using PCR for the detection of *Pectinatus* in beer it is necessary to increase the sensitivity of the method by sample preparation prior to processing by including the cultivation step, as PCR in the basic design (the reaction occurs most frequently in a volume of 25–50 ml) does not directly detect several bacterial cells in beer (Satoka-

vonen et al., 1999). Haikara et al. (2003) doporučují 2 x koncentrovaný MRS-bujón a inkubaci při teplotě 27 °C po dobu 3 dnů. V případě potřeby lze použít aktidion pro inhibici růstu kvasinek.

Specifičnost PCR-reakce je dána volbou primerů, a tedy cílovou sekvencí DNA. Vhodnými cílovými sekvencemi DNA pro identifikaci *Pectinatus* jsou tzv. mezerníkové oblasti (ITS = internal transcribed spacer) mezi geny 16S rDNA a 23S rDNA. Je tak umožněna i druhově specifická identifikace, neboť sekvence mezerníkových oblastí nejsou konzervované jako samotné geny kódující ribozomální podjednotky (Juvonen et al., 2003). Při použití cílové sekvence 16S rDNA byla v jednom případě pozorována zkřížená reakce s blízkou příbuznou bakterií *Zymophilus* spp., právě pro značnou konzervovanost sekvencí kódujících 16S rRNA (Motoyama a Ogata, 2000a; Motoyama a Ogata, 2000b). Jako cílové sekvence pro identifikaci *Pectinatus* na úrovni rodu a druhu mohou sloužit také geny kódující proteiny bíčků (Chaban et al., 2005) či proteiny vnější membrány (Pittet et al., 2014).

Na základě použitých primerů a způsobu vizualizace PCR-produktu existuje několik typů PCR-technik. Publikovány byly techniky detekce a identifikace *Pectinatus* založené na standardní PCR (Asano et al., 2008; Haikara et al., 2003; Juvonen et al., 1999, 2003; Sakamoto et al., 1997; Satokari et al., 1997; Takeuchi et al., 2005), real-time PCR (viz dále) a další.

Při real-time PCR (PCR v reálném čase) je možné sledovat nárůst koncentrace produktu reakce již během amplifikace. Detekce je založená na zvyšování fluorescenčního signálu v závislosti na nárůstu množství amplifikovaného produktu (Kiehne et al., 2003). Po ukončení real-time PCR je možné pomocí analýzy průběhu křivky tání potvrdit identifikaci mikroorganismu (Methner et al., 2004; Tsuchiya et al., 2003). K dispozici jsou různé komerční kity (Hage a Wold, 2003; Múcher a Schönling, 2000; Schönling et al., 2007). Další modifikací standardní PCR je RAPD-PCR (RAPD=random amplified polymorphic DNA; analýza náhodně amplifikované polymorfni DNA), umožňující identifikaci bakterií na úrovni druhu i kmene. Principem je použití jediného velmi krátkého primeru s náhodně zvolenou sekvencí – amplifikace pak vede k různému počtu fragmentů, protože primer se na DNA váže na náhodných místech. Soubor získaných fragmentů je typický pro určitý kmen a pro použitý primer (Tompkins et al., 1996). PCR-ELISA (ELISA=Enzyme linked immunoabsorbent assay; analýza s enzymem navázaným na imunoposorbent, tj. protilátku) je obdobou standardní PCR s tím rozdílem, že k vizualizaci produktu je využívána technika ELISA (Walker et al., 2003). Metoda rep-PCR (repetitive sequence based PCR) s primery komplementárními k repetitivním sekvencím, které se ve velkém počtu vyskytují v genomu bakterií, byla použita pro identifikaci izolátů *Pectinatus* do úrovně druhu. Autoři potvrdili skutečnost, že *P. frisingensis* je v rámci rodu *Pectinatus* detekován nejčastěji. Na základě analýzy genomu (tzv. fingerprintu) izolátů bylo dále zjištěno, že některé pivovary mají zřejmě jeden zdroj kontaminace, zatímco u jiných značně odlišné izoláty *Pectinatus* svědčí o několika zdrojích kontaminace (Suiker et al., 2007). Skupinově specifická PCR umožňující detekci bakterií rodů *Pectinatus*, *Megasphaera*, *Selenomonas* a *Zymophilus* v jediné reakci byla popsána v práci Juvonena et al. (2008). Metoda v uspořádání end-point PCR je při zahrnutí kroku štěpení PCR produktu specifickými restriktivními enzymy (tzv. RFLP-PCR) vhodná i pro odlišení jednotlivých rodů; v uspořádání real-time PCR toho lze dosáhnout analýzou křivky tání (Juvonen et al., 2008). Specifická PCR-detekce bakterií *Selenomonas lacticifex* byla popsána v aktuální práci Felsberga et al. (2014).

4.3 Ostatní metody

Pro charakterizaci *Pectinatus* je používána automatická ribotypizace, která využívá vnitrodruhového i mezidruhového DNA polymorfismu (Motoyama et al., 1998; Suihko a Haikara, 2001; Takeuchi et al., 2005).

Membránová filtrace kombinovaná s fluorescencí (DEFT) a imuno fluorescencí umožňuje odhalit kontaminaci piva 2–3 dny před vznikem viditelného zákalu u *Pectinatus* a 1–2 dny v případě detekce bakterií *Megasphaera* (Haikara, 1984, 1985). Před samotnou analýzou je nutný kultivační krok v PYG- nebo PYF-bujónu. Poté se vzorek zfiltruje a bakterie zachycené na membráně se barví akridinovou oranžou nebo fluorescenčně značenými protilátkami. Kontrolní stanovení bakterií v pivu trvá 7–8 dní. Detekční limit u obou způsobů je přibližně 1000 buněk na membráně. Autorka sama upozorňuje na skutečnost, že pomocí uvedených metod lze detekovat a určit *Pectinatus* a *Megasphaera* ve vzorku piva za 4–6 dní při použití aktivně rostoucích laboratorních kultur. Ze dvou jmenovaných způsobů je

ri et al., 1998). Contaminated beer contains mostly low numbers of microorganisms. It is therefore appropriate to transfer the examined beer sample prior to analysis into a suitable medium and incubate for the purpose of increasing the number of bacteria (Juvonen et al., 1999). Haikara et al. (2003) recommend a 2x concentrated MRS-broth and incubation at 27 °C for 3 days. If necessary, actidione can be used to inhibit the growth of yeast.

Specificity of PCR reactions is given by the choice of primers and therefore by the target DNA sequence. Suitable target DNA sequences for identification of *Pectinatus* are so-called spacer regions (ITS = internal transcribed spacer) between 16S rDNA and 23S rDNA genes. This makes possible and species-specific identification, because the sequences of spacer regions are not conserved as the genes encoding ribosomal subunits (Juvonen et al., 2003). When using a target sequence of 16S rDNA, cross-reactivity with closely related *Zymophilus* spp. bacteria was observed in one case because of the considerable conservation of sequences encoding the 16S rRNA (Motoyama and Ogata, 2000a,b). As the target sequences for identification of *Pectinatus* at genus and species level one can also use the genes encoding flagellar proteins (Chaban et al., 2005) and outer membrane proteins (Pittet et al., 2014).

There are several types of PCR techniques based on the primers used and the method of visualization of the PCR product. Other published techniques for detection and identification of *Pectinatus* based on standard PCR (Asano et al., 2008; Haikara et al., 2003; Juvonen et al., 1999, 2003; Sakamoto et al., 1997; Satokari et al., 1997; Takeuchi et al., 2005), real-time PCR (see below) and others.

In real-time PCR it is possible to monitor the increase in the concentration of the reaction product already during amplification. Detection is based on an increase in the fluorescent signal in dependence on the increase in the amount of amplified product (Kiehne et al., 2003). After completion of the real-time PCR it is possible to confirm the identity of the microorganism using a melting curve analysis (Methner et al., 2004; Tsuchiya et al., 2003). Various commercial kits are available for the purpose (Hage and Wold, 2003; Mucheru and Schönling, 2000; Schönling et al., 2007). Another modification of the standard PCR, RAPD-PCR (RAPD = random amplified polymorphic DNA), allows the identification of bacteria at the species and strain level. The principle is to use a single very short primer with a randomly selected sequence – the amplification then leads to different fragments as the primer binds to DNA at random locations. The set of fragments so obtained is typical for a particular strain and for the primer used (Tompkins et al., 1996). PCR-ELISA (ELISA = enzyme linked immunoabsorbent assay) is similar to a standard PCR with the difference that the product is used for visualization by the ELISA technique (Walker et al., 2003). The Rep-PCR method (repetitive sequence based PCR) with primers complementary to repetitive sequences which occur in the genome of a large number of bacteria, was used to identify *Pectinatus* isolates at species level. The authors confirmed that *P. frisingensis* is detected most frequently within the genus *Pectinatus*. Based on the analysis of the genome (so-called fingerprint) of the isolates it was found that some breweries seem to have one source of contamination, while in others very different *Pectinatus* isolates suggest several sources of contamination (Suiker et al., 2007). Group-specific PCR for detection of bacteria of the genera *Pectinatus*, *Megasphaera*, *Selenomonas* and *Zymophilus* and in a single reaction was described by Juvonen et al. (2008). The method, in an end-point PCR arrangement, when incorporating the step of the PCR product cleavage with specific restriction enzymes (called RFLP-PCR), is suitable for differentiation of individual genera; in real-time PCR arrangement this can be achieved by melting curve analysis (Juvonen et al., 2008). Specific PCR-detection of *Selenomonas lacticifex* has been recently described by Felsberg et al. (2014).

4.3 Other methods

Characterization of *Pectinatus* used automatic ribotyping, which uses intraspecies and interspecies DNA polymorphisms (Motoyama et al., 1998; Suihko and Haikara, 2001; Takeuchi et al., 2005).

Membrane filtration combined with fluorescence (DEFT) and immunofluorescence makes it possible to detect contamination of beer 2–3 days before the onset of visible turbidity with *Pectinatus* and 1–2 days in case of *Megasphaera* detection (Haikara, 1984, 1985). The actual analysis has to be preceded by a necessary cultivation step in PYG- or PYF-broth. The sample is then filtered and the bacteria trapped on the membrane are stained with acridine orange or fluorescently labeled antibodies. Control determination of bacteria in beer takes 7–8 days. The limit of detection for both modes is about 1000 cells per membrane. The author herself points out that, using these methods, one can detect and identify *Pectinatus* and *Megasphaera* in a sample of beer for 4–6 days when using actively growing

DEFT, tedy barvení akridinovou oranží, metoda nespecifická. Specifickou ji činí teprve použití půdy pro kultivační krok (Haikara, 1985).

Výsledky testování monoklonálních protilátek reagujících s povrchovými antigeny a s proteiny bičků *P. cerevisiophilus* publikovali Gares et al. (1993). Autoři uvádějí, že pomocí membránové filtrace vyšetřovaného piva a následnou reakcí na membráně zachycených mikroorganismů s fluorescenčně značenými protilátkami (metoda MF-FIA, membrane filter-based fluorescence immunoassay) lze detekovat 2–4 bakterie *P. cerevisiophilus* v 10 ml piva za dobu kratší než 3 hodiny. Ziola et al. (1999) doporučují použití monoklonálních protilátek reagujících s epitopy v peptidoglykanové vrstvě buněk pro rychlou společnou detekci přítomnosti *M. cerevisiae*, *P. cerevisiophilus*, *P. frisingensis*, *Selenomonas lactifex*, *Zymophilus paucivorans* a *Z. raffinivorans*.

Fluorescenční in situ hybridizace (FISH) využívá fluorescenčně značeného oligonukleotidu (fluorescenční sondy), který se specificky váže na 16S rRNA bakterií *Pectinatus*. Tato metoda umožňuje identifikaci na úrovni jedné buňky – testování však probíhalo na pomnožené laboratorní kultuře. Bakterie izolované z piva jsou fyziologicky mnohem méně aktivní, fluorescenční signál je pak tedy slabší a obtížnější detekovatelný. Autoři sami uvádějí, že metoda v základním provedení není dostatečně citlivá pro detekci bakterií v pivu; doporučují proto aplikaci několika specifických sond najednou pro zvýšení intenzity fluorescenčního signálu a použití kultivačního kroku pro zvýšení počtu kopií rRNA na detekovatelnou hladinu (Yasuhara et al., 2001).

Přítomnost bakterií *Pectinatus* a *Megasphaera* ve vzorku zkaženého piva lze prokázat na základě profilu syntetizovaných organických kyselin pomocí plynové chromatografie. *Pectinatus* může být v pivu identifikován i ve směsi s mléčnými bakteriemi (mléčné bakterie neprodukují kyselinu propionovou). *Megasphaera* je typická produkci propionátu, izobutyátu, butyátu, izovalerátu, valerátu, kaproátu a kapronátu (Foster a Andersen, 1999; Schisler et al., 1979). Haikara et al. (1981a) uvádí, že propionová kyselina může být ve vzorku zkaženého piva detekována 1 den před jeho viditelným zakažením.

Profil buněčných mastných kyselin stanovený pomocí plynové chromatografie a hmotnostní spektrometrie může sloužit pro identifikaci a určení fylogenetické příbuznosti bakterií (Helander a Haikara, 1995).

Publikovány byly práce popisující stanovení plazmalogenů bakterií *Pectinatus* (Řezanka et al., 2011, 2013). Plazmalogeny jsou běžnou složkou lipidů u živočichů včetně člověka, u prvoků a striktně anaerobních bakterií (Goldfine, 2010) a lze je stanovit např. metodou HILIC (hydrophilic interaction liquid chromatography; kapalinová chromatografie s hydrofilními interakcemi) (Řezanka et al., 2011).

Pro identifikaci striktně anaerobních bakterií a ostatních kontaminantů piva lze použít hmotnostní spektrometrii s laserovou desorcí a ionizací s průletovým analyzátozem (matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry; MALDI-TOF MS). V publikaci Vávrová et al. (2014) byla rozšířena referenční databáze o rody *Pectinatus*, *Megasphaera* a *Selenomonas* a prokázána byla spolehlivost metody MALDI pro identifikaci anaerobů s tím, že před samotnou analýzou je nutný kultivační krok. Detekční limit metody je kromě kultivačního kroku (tzv. pre-enrichment step) závislý na typu mikroorganismu (Šedo et al., 2011). Aplikace techniky MALDI-TOF MS pro identifikaci anaerobů v pivu/kvasnicích byla popsána v dalších dvou nezávislých studiích (Kern et al., 2014; Wieme et al., 2014).

Publikována byla chemiluminiscenční technika HPA (hybridisation protection assay) pro detekci bakterií *Pectinatus* a *Megasphaera* (Paradh et al., 2014). Principem metody je hybridizace cílové DNA se specifickou sondou značenou esterem akridinia, který emituje chemiluminiscenční signál. Po hybridizaci následuje separace hybridů z roztoku pomocí tzv. diferenciální alkalické hydrolyzy (nenavázané sondy jsou degradovány, jejich akridinester hydrolyzován). K odseparovaným hybridům je přidán induktor luminiscence a intenzita indukovaného světla je měřena v luminometru (Paradh et al., 2014).

5 ZÁVĚR

Stoupající počet případů kažení piva bakteriemi rodu *Pectinatus* a ostatními anaeroby je důsledkem modernizace plnicích technologií, které vedou ke snížení obsahu kyslíku v pivu na minimální hodnoty. Pivo se tak stává anaerobním prostředím vhodným pro růst a množení těchto mikroorganismů. Kontaminace piva anaerobními bakteriemi (zejména rody *Pectinatus* a *Megasphaera*) má specifické

laboratory cultures. Of the two ways mentioned DEFT i.e. acridine orange staining, is a non-specific method. It is only made specific by using the medium for the cultivation step (Haikara, 1985).

The results of testing of monoclonal antibodies reacting with surface antigens and flagellar proteins of *P. cerevisiophilus* were published by Gares et al. (1993). The authors report that by using membrane filtration of the tested beer and subsequent reaction of the membrane-captured microorganisms with fluorescently labeled antibodies (MF-FIA method, membrane filter-based fluorescence immunoassay) one can detect 2–4 *P. cerevisiophilus* bacteria in 10 ml of beer for a within less than 3 hours. Ziola et al. (1999) recommended the use of monoclonal antibodies reacting with epitopes in the peptidoglycan layer of cells for fast joint detection of the presence of *M. cerevisiae*, *P. cerevisiophilus*, *P. frisingensis*, *Selenomonas lactifex*, *Zymophilus paucivorans* and *Z. raffinivorans*.

Fluorescence in situ hybridization (FISH) uses fluorescently labeled oligonucleotide (fluorescent probe) that specifically binds to the *Pectinatus* 16S rRNA. This method allows identification at a single cell level, but one should note that the testing was conducted on a propagated laboratory culture. Bacteria isolated from beer are much less physiologically active and the fluorescent signal is thus weaker and less detectable. The authors themselves state that in the basic design the method is not sensitive enough to detect bacteria in beer; they therefore recommend using several specific probes at a time for increasing the intensity of the fluorescent signal using and a cultivation step to increase the copy number of rRNA to a detectable level (Yasuhara et al., 2001).

The presence of *Pectinatus* and *Megasphaera* in a sample of spoiled beer can be established by gas chromatography based on the profile of the synthesized organic acids. *Pectinatus* in beer can be identified in a mixture with lactic bacteria (lactic acid bacteria do not produce propionic acid). *Megasphaera* typically produces propionate, isobutyrate, butyrate, isovalerate, valerate, caproate and capronate (Foster and Andersen, 1999; Schisler et al., 1979). Haikara et al. (1981) state that propionic acid may be detected in the sample of spoiled beer one day before the visible turbidity appears.

The cell fatty acid profile determined by gas chromatography and mass spectrometry can be used to identify and determine the phylogenetic relationships of the bacteria (Helander and Haikara, 1995).

Some studies describe the determination of plasmalogens in *Pectinatus* (Řezanka et al., 2011, 2013). Plasmalogens are a common constituent of lipids in animals, including humans, protozoa and strictly anaerobic bacteria (Goldfine, 2010) and can be determined e.g. by using HILIC (hydrophilic interaction liquid chromatography) (Řezanka et al., 2011).

Identification of the strictly anaerobic bacteria and other beer contaminants can be performed by using matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). The publication by Vávrová et al. (2014) extended the reference database by genera *Pectinatus*, *Megasphaera* and *Selenomonas* and demonstrated the reliability of the method for MALDI identification of anaerobes, though a cultivation step is necessary prior to analysis. The detection limit of the method, apart from the addition of the culture of step (called a pre-enrichment step), is dependent on the type of microorganism (Gray et al., 2011). The application of the MALDI-TOF MS techniques for identification of anaerobes in beer and/or yeast was described in two other independent studies (Kern et al., 2014; Wieme et al., 2014).

An HPA (hybridization protection assay) chemiluminescent technique has also been used for the detection of *Megasphaera* and *Pectinatus* (Paradh et al., 2014). The principle of the method is the hybridization of target DNA with a specific probe labeled with acridinium ester, which emits a chemiluminescent signal. The hybridization is followed by separation of hybrids from the solution using the so-called differential alkaline hydrolysis (unbound probes are degraded, their acridine ester is hydrolyzed). The separated hybrids are supplied with luminescence inducer and the luminescence intensity of the induced light is measured by a luminometer (Paradh et al., 2014).

5 CONCLUSIONS

The increasing number of cases of beer spoilage by bacteria of the genus *Pectinatus* and other anaerobes is due to the modernization of the filling technology, which leads to the reduction of the oxygen content in the beer to a minimum. Beer thus becomes an anaerobic environment suitable for the growth and reproduction of these microorganisms. Contamination of beer by anaerobic bacteria (especially the genera *Megasphaera* and *Pectinatus*) has specific features:

rysy: kontaminovány nejsou celé šarže, ale pouze náhodně některé lahve/plechovky (ke kontaminaci dochází většinou prostřednictvím aerosolu při plnění piva do obalů); k vizuálnímu poškození piva (tj. k pomnožení bakterií) může dojít až několik týdnů od kontaminace, kdy je pivo už v tržní síti; v extrémních případech může docházet k explozi lahví vlivem nahromadění plynů; kontaminována mohou být i piva dietní (tyto bakterie jsou schopné využívat různé zdroje uhlíku, např. laktát a nezvyklé cukry); při použití běžných kultivačních metod nejsou tyto kontaminanty při provozní kontrole detekovány. Identifikaci anaerobních bakterií v pivu lze provést s použitím specifických kultivačních půd a podmínek, nebo metodami založenými na PCR/real-time PCR, MALDI-TOF MS a HPA.

PODĚKOVÁNÍ

Výsledky byly získány s využitím institucionální podpory Ministerstva zemědělství České republiky na dlouhodobý koncepční rozvoj VÚPS – Výzkum kvality a zpracování sladařských a pivovarských surovin (RO1914).

LITERATURA/REFERENCES

- Anonymous, 1997: Report of subcommittee on SMMP medium for selective isolation of *Megasphaera* and *Pectinatus*. J. Am. Soc. Brew. Chem. 55: 197.
- Anonymous, 1998: SMMP medium for the selective isolation of *Megasphaera* and *Pectinatus* (ICM). J. Am. Soc. Brew. Chem. 56: 212–214.
- Asano, S., Suzuki, K., Kuriyama, H., Yamashita, H., Kitagawa, Y., 2008: Application of multiplex PCR to the detection of beer spoilage bacteria. J. Am. Soc. Brew. Chem. 66: 37–42.
- Back, W., 1994: Secondary contaminations in the filling area. Brauwelt Int. 4: 326–334.
- Back, W., 2003: Biofilme in der Brauerei und Getränkeindustrie. Brauwelt online 24/25: 1–5.
- Back, W., 2005: Brewery. In: Colour atlas and handbook of beverage biology, W. Back, Ed. Verlag Hans Carl: Nürnberg, Germany.
- Back, W., Breu, S., Weigand, C., 1988: Infektionsursachen im Jahre 1987. Brauwelt 31/32: 1358–1362.
- Brandl, A., Geiger, E., 2003: Microbiological quality control in breweries by PCR – a demonstration of applied methods. Proc. Congr. Eur. Brew. Conv. 29: 1094–1104.
- Caldwell, J. M., Juvonen, R., Brown, J., Bredit, F., 2013: *Pectinatus sottacetoni* sp. nov., isolated from a commercial pickle spoilage tank. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 63: 3609–3616.
- Dighe, A. S., Shouche, Y. S., Ranade, D. R., 1998: *Selenomonas lipolytica* sp. nov., an obligately anaerobic bacterium possessing lipolytic activity. Int. J. Syst. Bacteriol. 48: 783–791.
- Engelmann, U., Weiss, N., 1985: *Megasphaera cerevisiae* sp. nov.: a new gram-negative obligately anaerobic coccus isolated from spoiled beer. Syst. Appl. Microbiol. 6: 287–290.
- European Brewery Convention, 2005: Detection of contaminants, Section 4.: 4.3.3.2. *Pectinatus* and *Megasphaera*. In Analytica-Microbiologica-EBC 2nd edn. ed. EBC Microbiology Subcommittee. Nürnberg: Verlag Hans Carl.
- Felsberg, J., Jelínková, M., Kubizniaková, P., Matoulová, D., 2014: Development of a species-specific PCR assay for identification of the strictly anaerobic bacterium *Selenomonas lacticifex* found in biofilm-covered surfaces in brewery bottling halls. J. Appl. Microbiol. 117: 1328–1335.
- Flahaut, S., Tierny, Y., Watier, D., Hornez, J. P., Jeanfils, J., 2000: Impact of thermal variations on biochemical and physiological traits in *Pectinatus* sp. Int. J. Food Microbiol. 55: 53–61.
- Foster, A., Andersen, L., Barney, M., Dull, C. L., Haikara, A., Huijberts, G., Karr, T., Kawasaki, M., Sobczak, J., Thompson, A., Tompkins, T., Yamauchi, H., Bendiak, D., SMMP Medium for the Selective Isolation of *Megasphaera* and *Pectinatus* (ICM). J. Am. Soc. Brew. Chem. Publication no. J-1998-1112-110, 212–214, 1998.
- Foster, A., Andersen, L. B., 1999: Gas chromatographic technique for the confirmation of *Megasphaera* and *Pectinatus* spp. J. Am. Soc. Brew. Chem. 57: 91–93.
- Gares, S. L., Whiting, M. S., Ingledew, W. M., Ziola, B., 1993: Detection and identification of *Pectinatus cerevisiiphilus* using surface-reactive monoclonal antibodies in a membrane filter-based fluoroimmunoassay. J. Am. Soc. Brew. Chem. 51: 158–163.
- Goldfine, H., 2010: The appearance, disappearance and reappearance of plasmalogens in evolution. Prog. Lipid Res. 49: 493–498.
- Hage, T., Wold, K., 2003: Practical experiences on the combat of a major *Pectinatus* and *Megasphaera* infection with the help of TaqMan Realtime-PCR. Proc. EBC, Dublin, 1145–1148.
- Haikara, A., 1983: Immunological characterization of *Pectinatus cerevisiiphilus* strains. Appl. Environ. Microbiol. 46: 1054–1058.
- Haikara, A., 1984: Detection of *Pectinatus* contaminants in beer. J. Am. Soc. Brew. Chem. 43: 43–46.
- Haikara, A., 1985: Detection of anaerobic, gram-negative bacteria in beer. Monats. Brauwiss. 6: 239–243.
- Haikara, A., 1989: Invasion of anaerobic bacteria into pitching yeast. Proc. EBC, Zürich, 537–544.
- Haikara, A., Enari, T. M., Lounatmaa, K., 1981a: The genus *Pectinatus*, a new group of anaerobic beer spoilage bacteria. Proc. EBC, Copenhagen, 229–240.
- Haikara, A., Helander, I., 2006: *Pectinatus*, *Megasphaera* and *Zymophilus*. In: The Prokaryotes Vol. 4, M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K. H. Schleifer and E. Stackebrandt, Eds., Springer-Verlag: New York, pp. 965–981.
- Haikara, A., Juvonen, R., 2009: Genus XV. *Pectinatus*. In: De Vos, P., Garrity, G., Jones, D., Krieg, N. R., Ludwig, W., Rainey, F. A., Schleifer, K. H., Whitman, W. B. (editors). Bergey's manual of systematic bacteriology. 2nd ed. Vol. 3. New York (NY): Springer. p. 1094–1099.
- Haikara, A., Juvonen, R., Koivula, T., Schuhbeck, T., Brandl, A., Vogeser, G., Storgards, E., 2003: Microbiological quality control in breweries by PCR—the BREWPROC approach. Proc. EBC, Dublin, 1036–1046.
- Haikara, A., Lounatmaa, K., 1987: Characterization of *Megasphaera* sp., a new anaerobic beer spoilage coccus. Proc. EBC, Madrid, 473–480.
- Haikara, A., Mattila-Sandholm, T., Manninen, M., 1990: Rapid detection of contaminants in pitching yeast using automated turbidometry. J. Am. Soc. Brew. Chem. 48: 92–95.
- Haikara, A., Penttilä, L., Enari, T. M., Lounatmaa, K., 1981b: Microbiological, biochemical, and electron microscopic characterization of a *Pectinatus* strain. Appl. Environ. Microbiol. 41: 511–517.
- Hakalehto, E., Finne, J., 1990: Identification by immunoblot analysis of major antigenic determinants of the anaerobic beer spoilage bacterium genus *Pectinatus*. FEMS Microbiol. Lett. 67: 307–312.
- Helander, I. M., Haikara, A., Sadovskaya, I., Vinogradov, E., Salkinoja-Salonen, M. S., 2004: Lipopolysaccharides of anaerobic beer spoilage bacteria of the genus *Pectinatus* – lipopolysaccharides of a gram-positive genus. FEMS Microbiol. Rev. 28: 543–552.
- Helander, I. M., Haikara, A., 1995: Cellular fatty acyl and alkenyl residues in *Megasphaera* and *Pectinatus* species: contrasting profiles and detection of beer spoilage. Microbiol. 141: 1131–1137.
- Henriksson, E., Haikara, A., 1991: Airborne microorganisms in the brewery filling area and their effect on microbiological stability of beer. Monat. Brauwiss. 1: 4–8.
- Chaban, B., Deneer, H., Dowgiert, T., Hymers, J., Ziola, B., 2005: The flagellin gene and protein from the brewing spoilage bacteria *Pectinatus cerevisiiphilus* and *Pectinatus frisingensis*. Can. J. Microbiol. 51: 863–874.
- Chelack, B. J., Ingledew, W. M., 1987: Anaerobic gram-negative bacteria in brewing – A review. J. Am. Soc. Brew. Chem. 45: 123–127.

- Chihib, N. E., Monnerat, L., Membré, J. M., Tholozan, J. L., 1999: Nitrogen, temperature and pH effects on growth and viability of *Pectinatus frisingensis*, a gram-negative, strictly anaerobic beer-spoilage bacterium. *J. Appl. Microbiol.* 87: 438–446.
- Chowdhury, I., Watier, D., Hornez, J. P., 1995: Variability in survival of *Pectinatus cerevisiiphilus*, strictly anaerobic bacteria, under different oxygen conditions. *Anaerobe* 1: 151–156.
- Chowdhury, I., Watier, D., Leguerinel, I., Hornez, J. P., 1997: Effect of *Pectinatus cerevisiiphilus* on *Saccharomyces cerevisiae* concerning its growth and alcohol production in wort medium. *Food Microbiol.* 14: 265–272.
- Jespersen, L., Jakobsen, M., 1996: Specific spoilage organisms in breweries and laboratory media for their detection. *Int. J. Food Microbiol.* 33: 139–155.
- Juvonen, R., Koivula, T., Haikara, A., 2003: PCR detection of gram-negative brewery contaminants – present state. *Proc. EBC, Dublin*, 1047–1056.
- Juvonen, R., Koivula, T., Haikara, A., 2008: Group-specific PCR-RFLP and realtime PCR methods for detection and tentative discrimination of strictly anaerobic beer-spoilage bacteria of the class Clostridia. *Int. J. Food Microbiol.* 128: 162–169.
- Juvonen, R., Satokari, R., Mallison, K., Haikara, A., 1999: Detection of spoilage bacteria in beer by polymerase chain reaction. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 57: 99–103.
- Juvonen, R., Suihko, M. L., 2006: *Megasphaera paucivorans* sp. nov., *Megasphaera sueciensis* sp. nov. and *Pectinatus haikarae* sp. nov., isolated from brewery samples, and emended description of the genus *Pectinatus*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56: 695–702.
- Kern, C. C., Vogel, R. F., Behr, J., 2014: Identification and differentiation of brewery isolates of *Pectinatus* sp. by Matrix-Assisted-Laser Desorption-Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS). *Eur. Food Res. Technol.* 238(5): 875–880.
- Kiehne, M., Berghof-Jäger, K., Fandke, M., Grönewald, C., 2003: Detection of beer spoilage organisms by real-time PCR. *Proc. EBC, Dublin*, 1073–1080.
- Kingsley, V. V., Hoeniger, J. F. M., 1973: Growth, structure and classification of *Selenomonas*. *Bacteriol. Rev.* 37: 479–521.
- Lee, S. Y., Mabee, M. S., Jangaard, N. O., Horiuchi, E. K., 1980: *Pectinatus*, a new genus of bacteria capable of growth in hopped beer. *J. Inst. Brew.* 86: 28–30.
- Lee, S. Y., Moore, S. E., Mabee, M. S., 1981: Selective-differential medium for isolation and differentiation of *Pectinatus* from other brewery microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* 2: 386–387.
- Lee, S. Y., 1994: SMMP – A medium for selective isolation of *Megasphaera* and *Pectinatus* from the brewery. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 52: 115–119.
- Marchandin, H., Haikara, A., Juvonen, R., 2009: Genus XII. *Megasphaera*. In: De Vos, P., Garrity, G., Jones, D., Krieg, N. R., Ludwig, W., Rainey, F. A., Schleifer, K. H., Whitman, W. B. (editors). *Bergey's manual of systematic bacteriology*. 2nd ed. Vol. 3. New York (NY): Springer. p. 1082–1090.
- Marchandin, H., Jumas-Bilak, E., Gay, B., Teyssier, C., Jean-Pierre, H., de Buochberg, M. S., Carriere, C., Carlier, J. P., 2003: Phylogenetic analysis of some *Sporomusa* sub-branch members isolated from human clinical specimens: description of *Megasphaera micronuciformis* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53: 547–553.
- Marchandin, H., Teyssier, C., Campos, J., Jean-Pierre, H., Roger, F., Gay, B., Carlier, J. P., Jumas-Bilak, E., 2010: *Negativicoccus succinivorans* gen. nov., sp. nov., isolated from human clinical samples, emended description of the family *Veillonellaceae* and description of *Negativicutes* classis nov., *Selenomonadales* ord. nov. and *Acidaminococcaceae* fam. nov. in the bacterial phylum *Firmicutes*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 60: 1271–1279.
- Matoulková, D., 2008: Strictly anaerobic bacteria in beer and in breweries. *Kvasny Prum.* 54: 338–343.
- Matoulková, D., Kosař, K., Sigler, K., 2012a: Rapid, simple and specific cultivation-based method for detection of *Pectinatus* sp. in brewery samples. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 70: 29–34.
- Matoulková, D., Kosař, K., Slabý, M., Sigler, K., 2012b: Occurrence and species distribution of strictly anaerobic bacterium *Pectinatus* in brewery plants. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 70: 262–267.
- Membré, J. M., Tholozan, J. L., 1994: Modeling growth and off-flavours production of spoiled beer bacteria, *Pectinatus frisingensis*. *J. Appl. Bacteriol.* 77: 456–460.
- Methner, F. J., Schuster, E., Schackman, A., 2004: Screening of beer-spoilage bacteria using the LightCycler PCR Workflow System. *Biochemica* 1: 9–11.
- Moore, L. V. H., Johnson, J. L., Moore, W. E. C., 1987: *Selenomonas noxia* sp. nov., *Selenomonas flueggei* sp. nov., *Selenomonas infelix* sp. nov., *Selenomonas diana* sp. nov., and *Selenomonas artemidis* sp. nov., from the human gingival crevice. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 37: 271–280.
- Motoyama, Y., Ogata, T., Sakai, K., 1998: Characterization of *Pectinatus cerevisiiphilus* and *P. frisingensis* by ribotyping. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 56: 19–23.
- Motoyama, Y., Ogata, T., 2000a: 16S-23S rDNA spacer of *Pectinatus*, *Selenomonas* and *Zymophilus* reveal new phylogenetic relationships between these genera. *Int. J. Syst. Evolution. Microbiol.* 50: 883–886.
- Motoyama, Y., Ogata, T., 2000b: Detection of *Pectinatus* spp. by PCR using 16S-23S rDNA spacer regions. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 58: 4–7.
- Mücher, G., Schönling, J., 2000: PCR-Nachweis von Bierschändlern mit dem First-Bier-Kit. *Brauwelt* 39/40: 1570–1572.
- Ogg, J. E., Lee, S. Y., Ogg, B. J., 1979: A modified tube method for the cultivation and enumeration of anaerobic bacteria. *Can. J. Microbiol.* 25: 987–990.
- Paradh, A. D., Hill, A. E., Mitchell, W. J., 2014: Detection of beer spoilage bacteria *Pectinatus* and *Megasphaera* with acridinium ester labelled DNA probes using a hybridisation protection assay. *J. Microbiol. Meth.* 96: 25–34.
- Paradh, A. D., Mitchell, W. J., Hill, A. E., 2011: Occurrence of *Pectinatus* and *Megasphaera* in the major UK breweries. *J. Inst. Brew.* 117: 498–506.
- Pittet, V., Haakensen, M., Chaban, B., Ziola, B., 2014: Detection and identification of *Pectinatus* brewery contaminants based on the gene for the major outer membrane protein. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 72:169–174, 2014.
- Řezanka, T., Matoulková, D., Kyselová, L., Sigler, K., 2013: Identification of plasmalogen cardiolipins from genus *Pectinatus* by liquid chromatography-high resolution electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Lipids* 48: 1237–1251.
- Řezanka, T., Širšťová, L., Matoulková, D., Sigler, K., 2011: Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) – ESI-MS/MS of plasmalogen phospholipids from *Pectinatus* bacterium. *Lipids* 46: 765–780.
- Sakamoto, K., Konings, W. N., 2003: Beer spoilage bacteria and hop resistance. *Int. J. Food Microbiol.* 89: 105–124.
- Satokari, R., Juvonen, R., von Wright, A., Haikara, A., 1997: Detection of *Pectinatus* beer spoilage bacteria by using the polymerase chain reaction. *J. Food Protect.* 60: 1571–1573.
- Satokari, R., Juvonen, R., Mallison, K., von Wright, A., Haikara, A., 1998: Detection of beer spoilage bacteria *Megasphaera* and *Pectinatus* by polymerase chain reaction and colorimetric microplate hybridization. *Int. J. Food Microbiol.* 45: 119–127.
- Seidel-Rüfer, H., 1990: *Pectinatus* und andere morphologisch ähnliche gram-negative, anaerobe Stäbchen aus dem Brauereibereich. *Monats. Brauwissen.* 3: 101–105.
- Shouche, Y. S., Dighe, A. S., Dhotre, D. P., Patole, M. S., Ranade, D. R., 2009: Genus XXI. *Selenomonas*. In: De Vos, P., Garrity, G. M., Jones, D., Krieg, N. R., Ludwig, W., Rainey, F. A., Schleifer, K. H., Whitman, W. B. (editors). *Bergey's manual of systematic bacteriology*. 2nd ed. Vol. 3. New York (NY): Springer. p. 1106–1112.
- Schisler, D. O., Mabee, M. S., Hahn, C. W., 1979: Rapid identification of important beer microorganisms using gas chromatography. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 37: 69–76.
- Schleifer, K. H., Leuteritz, M., Weiss, N., Ludwig, W., Kirchhof, G., Seidel-Rüfer, H., 1990: Taxonomic study of anaerobic, gram-negative, rod-shaped bacteria from breweries: Emended description of *Pectinatus cerevisiiphilus* and description of *Pectinatus frisingensis* sp. nov., *Selenomonas lactifex* sp. nov., *Zymophilus raffinivorans* gen. nov., sp. nov., and *Zymophilus paucivorans* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 40: 19–27.
- Schleifer, K. H., Leuteritz, M., Weiss, N., Ludwig, W., Kirchhof, G., Seidel-Rüfer, H., 2009: Genus XXVI. *Zymophilus*. In: De Vos, P., Garrity, G. M., Jones, D., Krieg, N. R., Ludwig, W., Rainey, F. A., Schleifer, K. H., Whitman, W. B. (editors). *Bergey's manual of systematic bacteriology*. 2nd ed. Vol. 3. New York (NY): Springer. p. 1119–1120.
- Schönling, J., Mücher, G., Erxlebe, U., 2007: Real-time multiplex PCR-assay for simultaneous detection and differentiation of beverage spoilage bacteria and yeasts. *Proc. EBC, Venice*, 1186–1189.
- Storgards, E., Närhi, M., Wirtanen, G., 2001: Disinfectant testing against brewery-related biofilms. *Proc. EBC, Budapest*, 857–866.