

# STRIKTNĚ ANAEROBNÍ BAKTERIE V PIVU A PIVOVARSKÉM PROVOZU

## STRICTLY ANAEROBIC BACTERIA IN BEER AND IN BREWERIES

DAGMAR MATOULKOVÁ, Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, a. s., Lípová 15, 120 44 Praha 2 / *Research Institute of Brewing and Malting, Plc., Lípová 15, CZ-120 44 Prague*, e-mail: matoulkova@beerresearch.cz

**Matoulková, D.: Striktně anaerobní bakterie v pivu a pivovarském provozu.** Kvasny Prum. 54, 2008, č. 11–12, s. 338–343.

Obsah kyslíku je jedním z hlavních faktorů ovlivňujících mikrobiologickou stabilitu piva. Současným trendem ve vývoji plnicích technologií je snížení koncentrace kyslíku v hotovém pivu na minimální hodnoty. Pivo se tak stává prostředím, kde se mohou uplatnit striktně anaerobní bakterie, které pro svůj růst a množení vyžadují velmi nízký nebo nulový obsah kyslíku. Striktně anaerobní bakterie schopné kazit pivo nebo kontaminovat pivovarské kvasnice patří do rodů *Pectinatus*, *Megasphaera*, *Zymophilus* a *Selenomonas*. Ke zvyšování počtu případů kažení piva těmito mikroorganismy přispívá také stoupající produkce piv, která jsou více náchylná k mikrobiálnímu kažení – piva nepasterovaná, nealkoholická, nízkookoholická a méně chmelená. V článku je uveden přehled základních morfologických, biochemických a fyziologických vlastností této skupiny bakterií.

**Matoulková, D.: Strictly anaerobic bacteria in beer and in breweries.** Kvasny Prum. 54, 2008, No. 11–12, p. 338–343.

The content of oxygen is one of the main factors affecting microbiological stability of beer. The current trend in the development of bottling technologies therefore accentuates lowering of oxygen tension in finished beer to a minimum. Beer thus becomes a medium in which strictly anaerobic bacteria that require for their growth and proliferation very low or zero oxygen level can thrive. Strictly anaerobic bacteria capable of spoiling beer or contaminating brewer's yeast belong to the genera *Pectinatus*, *Megasphaera*, *Zymophilus* and *Selenomonas*. The increasing frequency of beer spoilage cases is also promoted by increasing production of beers that have a higher propensity to microbial spoilage – nonpasteurized, nonalcoholic, low-alcoholic and low hopped beers. A survey is presented here of basic morphological, biochemical and physiological properties of this group of bacteria.

**Matoulková, D.: Die striktanaerobe Bakterien im Bier und in der Brauerei.** Kvasny Prum. 54, 2008, Nr. 11–12, S. 338–343.

Der Sauerstoffgehalt im Bier ist ein von den die mikrobiologische Bierstabilität meist beeinflussenden Hauptfaktoren. Der heutige Trend in der Entwicklung von Abfüllungsanlagen führt zur einen Sauerstoffkonzentrationsreduktion im Bier auf den minimalen Wert. Damit wird das Bier ein Medium, wo die strikt anaeroben Bakterien, die keine oder minimale Anforderung an Sauerstoffgehalt haben, gute Bedingungen für ihr Wachstum und weitere Vermehrung finden können. Die strikt anaeroben Bakterien, die das Bier verderben oder die Brauereihefe kontaminieren können, gehören zu den Stämmen *Pectinatus*, *Megasphaera*, *Zymophilus* und *Selenomonas*. Zu der steigenden Zahl der Fälle, wann das Bier durch diese Mikroorganismen verdorben wird, trägt auch die steigende Produktion von Bieren bei, die eine erhöhte Neigung zum mikrobiellen Verderben aufweisen – nicht pasteurisierte, alkoholfreie, alkoholarme oder weniger gehopfte Biere. In dem Artikel ist eine Übersicht von den grundlegenden morphologischen, biochemischen und physiologischen Merkmalen dieser Bakteriengruppe angeführt.

**Матюлкова, Д.: Бактерии категорически анаэробные в пиве и в пивоваренных заводах.** Kvasny Prum. 54, 2008, No. 11–12, стр. 338–343.

Содержание кислорода является одним из главных факторов влияющих на микробиологическую стабильность пива. Настоящим трендом в развитии розливочных технологий является понижение концентрации кислорода в готовом пиве к минимальному значению. Таким образом пиво становится средой, где могут найти применение категорически анаэробные бактерии, требующее для роста и размножения очень низкое или нулевое содержание кислорода. Категорически анаэробные бактерии способные повреждать пиво или загрязнять пивоваренные дрожжи принадлежат в рода *Pectinatus*, *Megasphaera*, *Zymophilus* и *Selenomonas*. Возрастающее производство непастеризованных, безалкогольных, низкоалкогольных пив и пив с более низким содержанием хмелевых веществ, т. е. пив более предрасположенных к извращению микроорганизмами, способствует повышению числа случаев извращения пив этими микроорганизмами. В статье приведена сводка основных морфологических, биохимических и физиологических свойств этой группы бактерий.

**Klíčová slova:** striktně anaerobní bakterie, *Pectinatus*, *Zymophilus*, *Selenomonas*, *Megasphaera*, kažení piva, kontaminace kvasnic

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

### ÚVOD

Hotové pivo, jeho meziprodukty a zařízení v pivovarských provozech představují prostředí, v němž nacházejí uplatnění jak pivovarské kvasinky, používané pro výrobu piva, tak i škodlivé mikroorganismy (bakterie, plísně, divoké kvasinky), jejichž přítomnost a metabolická činnost je při výrobě piva nežádoucí. V posledních třiceti letech nabývají mezi škodlivými bakteriemi na významu striktně anaerobní bakterie, které vyžadují pro svůj růst prostředí s minimálním nebo nulovým obsahem rozpuštěného kyslíku. Stoupající počet případů kažení piva těmito bakteriemi je v přímé souvislosti s modernizací plnicích technologií, jejichž cílem je snížit obsah kyslíku v pivu na minimální hodnoty. Pivo se tak stává anaerobním prostředím vhodným pro růst a množení striktních anaerobů [1].

Striktně anaerobní bakterie přizpůsobené prostředí pivovarských provozů představují skupinu čtyř bakteriálních rodů: *Pectinatus*, *Zymophilus*, *Selenomonas* a *Megasphaera*. V současné době jsou tyto rody řazeny do čeledi *Acidaminococcaceae* (doména *Bacteria*, kmen *Firmicutes*, třída *Clostridia*, řád *Clostridiales*) [2, 3]. Jejich výskyt je téměř výhradně vázán na moderní pivovarské provozy produkující pivo s velmi nízkým obsahem kyslíku (pod 1 mg/l). Rody *Pectinatus* a *Megasphaera* se ve většině případů vyskytují jako sekundární kontaminace piva [4]. Jsou nacházeny méně často než např. mléčné bak-

### INTRODUCTION

Finished beer, its intermediate products and brewery machinery are environments that may host not only brewer's yeast used for beer production but also unwanted microorganisms (bacteria, fungi, wild yeasts) whose presence and metabolic activity during beer production is highly undesirable. In the last decades, a prominent position among harmful bacteria has increasingly been taken by anaerobic bacteria that require for their growth an environment with minimum or zero level of dissolved oxygen. The rising incidence of beer spoilage by these bacteria is directly associated with the modern advances in bottling technologies, which aim at lowering oxygen content in beer to a minimum. Beer thus becomes an anaerobic environment suitable for growth and reproduction of strict anaerobes [1].

Strictly anaerobic bacteria adjusted to the brewery environment fall within four bacterial genera: *Pectinatus*, *Zymophilus*, *Selenomonas* and *Megasphaera*. These genera are currently classed into the family *Acidaminococcaceae* (domain *Bacteria*, phylum *Firmicutes*, class *Clostridia*, order *Clostridiales*) [2, 3]. Their occurrence is nearly exclusively linked with modern brewery plants producing beers with very low oxygen content (below 1 mg/l). The genera *Pectinatus* and *Megasphaera* are mostly found as secondary beer contaminants [4]. Their incidence is lower than that of lactic acid bacteria [1, 5] but, in

terie [1, 5]. Avšak na rozdíl od mléčných bakterií, u nichž se vyskytují kmeny pivo kazící i nekazící, jsou *Pectinatus* a *Megasphaera* bakterie obligátně pivo kazící [1]. Bakterie *Zymophilus* a *Selenomonas* jsou sporadicky izolovány z kontaminovaného piva a kvasnic [3, 6].

Pro rody *Pectinatus*, *Zymophilus*, *Selenomonas* a *Megasphaera* je dále charakteristické, že se jedná o mesofilní, nesporulující bakterie se striktně fermentativním typem metabolismu. Většina zástupců, s výjimkou rodu *Megasphaera* a druhu *Pectinatus portalensis*, má tyčkovitý tvar buněk a vyznačuje se velmi aktivním pohybem. Metodou podle Grama se tyto bakterie barví gramnegativně či gramvariabilně [3, 6].

V následujícím přehledu jsou uvedeny základní morfologické, biochemické a fyziologické vlastnosti jmenovaných bakteriálních rodů, jejich výskyt a škodlivost.

### **Pectinatus**

Do rodu *Pectinatus* jsou řazeny čtyři druhy: *P. cerevisiophilus*, *P. frisingensis*, *P. haikarae* a *P. portalensis*. První tři jmenované druhy jsou nacházeny vždy pouze ve spojení se zkaženým pivem a pivovarskými provozy, druh *P. portalensis* byl izolován z odpadů při výrobě vína [6, 7, 8].

Bakterie rodu *Pectinatus* jsou rovné až mírně zakřivené pohyblivé tyčky uspořádané po jedné nebo po dvou buňkách, jen výjimečně v krátkých řetězcích (obr. 1). Starší buňky v kultuře mohou mít spirálovitý, v případě *P. haikarae* také smyčkovitý či kyjovitý tvar [8, 9, 10]. Velikost buněk se pohybuje v rozmezí 0,4–0,9 x 2–50 µm. Uspořádání bičíků lze popsat jako hřebínkovité (obr. 2) – bičíky (v počtu 1–23) vystupují pouze z jedné strany buňky [10]. Katalasová reakce je negativní, pouze u *P. haikarae* pozitivní [6, 8]. Pohyb mladých buněk připomíná písmeno X, starší buňky se pohybují hadovitě, popřípadě nemusí být vůbec pohyblivé [8, 11, 12]. Základní charakteristika rodu je uvedena v tab. 1.

Tyto mikroorganismy jsou považovány za přechodovou formu mezi gramnegativními a grampozitivními bakteriemi – jejich buňky mají vnější membránu typickou pro gramnegativní bakterie a zároveň silnou peptidoglykanovou vrstvu a další znaky typické pro grampozitivní bakterie [12, 13, 14, 15].

Bakterie rodu *Pectinatus* mohou jako zdroj uhlíku využívat poměrně široké spektrum cukrů. Zkvašují glukosu, fruktosu, galaktosu, maltosu, ribosu, arabinosu a také laktát, pyruvát a glycerol. Ethanol není těmito mikroorganismy využíván ani produkován [9]. Hlavním produktem metabolismu bakterií *Pectinatus* je propionát v množství až 100 mmol/l [16], dále acetat, acetoin, sirovodík, methylmerkaptan a dimethylsulfid a stopová množství butyrátu [6].

*Pectinatus* byl poprvé izolován ze zkaženého piva na konci 60. let 20. století [9, 17]. V následujících letech docházelo, v souvislosti s modernizací plnicích technologií, k prudkému zvýšení počtu případů kažení piva touto bakterií [6, 14, 18]. *Pectinatus* je nejčastěji izolován ze zkažených piv v Německu, Švédsku, Norsku, Finsku, USA, Japonsku a Francii [8, 19, 20, 21, 22, 23, 24]. Zkažené pivo je charakteristické masivním základem a intenzivním zápachem připomínajícím zkažená vejce [12, 25].

Pro růst v pivu jsou tyto mikroby velmi dobře přizpůsobeny – tolerují pH v rozmezí 3,5–8,0 a alkohol v koncentraci až 4,5 % (w/v) [12, 26]. Druh *Pectinatus frisingensis* vykazuje vyšší rezistenci k působení kyslíku, alkoholu a toleranci k širšímu rozmezí hodnot pH nežli *P. cerevisiophilus*, a využívá také širší spektrum zdrojů uhlíku [27, 28].

V současné době je podle odhadů *Pectinatus* původcem 20–30 % případů bakteriálního kažení lahvového, velmi často nepasterovaného piva [1, 29, 30]. Náchylnější ke kažení touto bakterií jsou dále

contrast to lactic acid bacteria that include both beer-spoiling and -nonspoiling strains, *Pectinatus* and *Megasphaera* are obligate beer spoilers [1]. Bacteria *Zymophilus* and *Selenomonas* are sporadically isolated from contaminated beer and yeast [3, 6].

Genera *Pectinatus*, *Zymophilus*, *Selenomonas* and *Megasphaera* are characteristically mesophilic, nonsporulating bacteria with strictly fermentative metabolism. Most species, with the exception of genus *Megasphaera* and species *Pectinatus portalensis*, are represented by rod-like cells with very active motion. When stained according to Gram these bacteria appear either as gram-negative or gram-variable [3, 6].

The following survey gives basic morphological, biochemical and physiological properties of these bacterial genera, their occurrence and harmfulness.

### **Pectinatus**

The genus *Pectinatus* contains four species: *P. cerevisiophilus*, *P. frisingensis*, *P. haikarae* and *P. portalensis*. The former three species are found always only in connection with spoiled beer and brewery plants while *P. portalensis* was isolated from wine production wastes [6, 7, 8].

Bacteria of the *Pectinatus* species are straight to slightly curved rods found singly or in pairs, exceptionally as short chains (Fig. 1). Older cells in the culture may have spiral, with *P. haikarae* also loop-like or club-like shape [8, 9, 10]. Cell size varies in the range of 0.4–0.9 x 2–50 µm. The arrangement of flagella can be described as comb-like (Fig. 2) – flagella (numbered 1–23) emerge only on one side of the cell [10]. Catalase reaction is negative, in *P. haikarae* positive [6, 8]. The motion of young cells resembles the letter X, older cells exhibit a snake-like motion or are immotile [8, 11, 12]. The basic characteristics of the genus are given in Table 1.

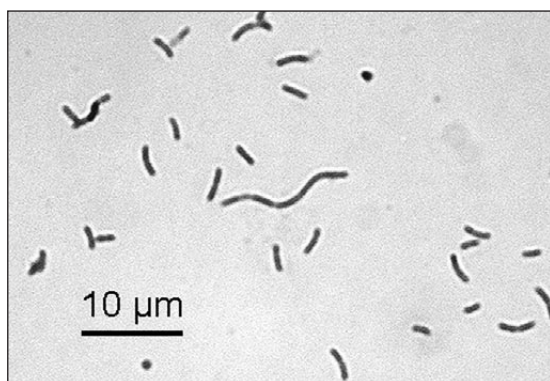
These microorganisms are taken to be a transitory form between gram-negative and gram-positive bacteria – the cells possess the outer membrane typical for gram-negative bacteria and, at the same time, a thick peptidoglycan layer and other features typical for gram-positive bacteria [12, 13, 14, 15].

Bacteria of the genus *Pectinatus* can utilize a broad range of sugars as carbon sources. They ferment glucose, fructose, galactose, maltose, ribose, arabinose and also lactate, pyruvate and glycerol. They neither utilize nor produce ethanol [9]. The main metabolic product of *Pectinatus* bacteria is propionate in amounts of up to 100 mmol/l [16], and also acetate, acetoin, hydrogen sulphate, methylmercaptan and dimethylsulfide, and trace amounts of butyrate [6].

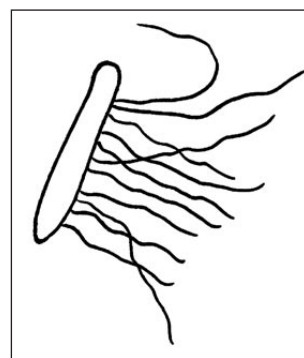
*Pectinatus* was isolated for the first time from spoiled beer at the end of 1960ies of the last century [9, 17]. In the following period the frequency of cases of beer spoilage by this bacterium sharply rose in connection with the introduction of modern bottling technologies [6, 14, 18]. *Pectinatus* is most often isolated from spoiled beers in Germany, Sweden, Norway, Finland, USA, Japan and France [8, 19, 20, 21, 22, 23, 24]. The spoiled beer is characterized by a massive haze and intense smell resembling addled eggs [12, 25].

These bacteria are well adapted for growth in beer – they tolerate pH in the range of 3.5 to 8.0 and alcohol concentrations of up to 4.5 % (w/v) [12, 26]. The species *Pectinatus frisingensis* displays a higher resistance to oxygen, alcohol and tolerance to a broader pH range than *P. cerevisiophilus*, and utilizes also a broader spectrum of carbon sources [27, 28].

At present, *Pectinatus* is estimated to be the source of 20 to 30 % cases of spoilage of bottled beer, very often nonpasteurized one [1, 29, 30]. More inclined to spoilage are also nonalcoholic, low-alcohol



Obr. 1 / Fig. 1 *Pectinatus* sp. RIBM 2-85 / *Pectinatus* sp. RIBM 2-85



Obr. 2 / Fig. 2 Hřebínkovité uspořádání bičíků *Pectinatus* / Comb-like arrangement of flagella in *Pectinatus*

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

Mikroorganismus Microorganism	Tyčky Rods	Koky Cocci	Velikost buněk Cell size ( $\mu\text{m}$ )	Pohyb Motion	Gramovo barvení Gram staining	Optimální teplota Optimum temperature	Rozmezí teplot Temperature range	Optimální pH Optimum pH	Katalasová reakce Catalase reaction	Výskyt Occurrence
<i>P. cerevisiophilus</i>	+	–	0.4-0.9 x 2-32	+	–/v	30–32 °C	15–40 °C	4.5–6.2	–	pivo. pivovarský provoz / beer. brewery plants
<i>P. frisingensis</i>	+	–	0.7-0.9 x 3-20	+	–/v	30–32 °C	15–40 °C	4.5–4.9	–	pivo. pivovarský provoz / beer. brewery plants
<i>P. portalensis</i>	+a	–	1.0	–	–/v	37 °C	12–42 °C	n	–	odpady při výrobě vína / wine production wastes
<i>P. haikarae</i>	+b	–	0.6-0.8 x 3-50	+/-	–/v	20–30 °C	15–30 °C	n	+	pivo. pivovarský provoz / beer. brewery plants
<i>Z. paucivorans</i>	+	–	0.8-1.0 x 5-30	+	–	30 °C	N	n	–	kvasnice. odpady / yeast. wastes
<i>Z. raffinosivorans</i>	+	–	0.7-0.9 x 3-15	+	–	30 °C	N	n	–	kvasnice. odpady / yeast. wastes
<i>S. lactificex</i>	+	–	0.6-0.9 x 5-15	+	–	30 °C	N	–	–	kvasnice / yeast
<i>M. cerevisiae</i>	–	+	1.3-1.6	–	–	30 °C	15–37 °C	6.3	–	pivo / beer
<i>M. paucivorans</i>	–	+	1.2-1.5	–	–	30 °C	15–37 °C	6.3	–	pivo / beer
<i>M. sueciensis</i>	–	+	1.0-1.2	–	–	30 °C	15–37 °C	6.3	–	pivo / beer

Pozn. / Note: + pozitivní reakce / positive reaction; – negativní reakce / negative reaction; v – variabilní reakce / variable reaction; a – oválný tvar buněk / oval cell shape; b – ve stacionární fázi může být tvar buněk kulovitý, kyjovitý nebo smyčkovitý / cell shape in stationary phase can be round club-like or loop-like; n – není známo / not known

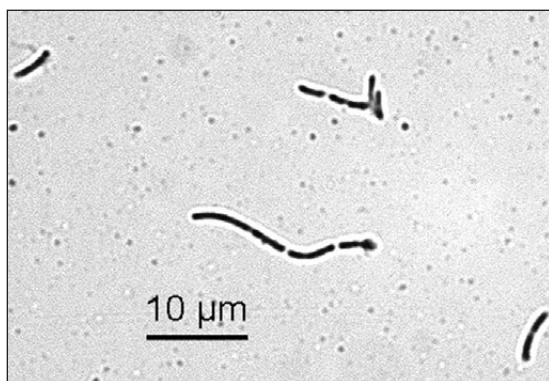
piva nealkoholická, nízkoalkoholická a méně chmelená. *Pectinatus* byl izolován ve stáček hale: z kanalizace, drenážních systémů, z mazadel smíchaných se zbytky piva, z plniče, z podlahy a kondenzované vody na stropě stáček haly [4, 9, 31, 32]. Jako hlavní zdroje kontaminace piva jsou uváděny voda a vzduch. Přestože je *Pectinatus* striktně anaerobní, dokáže zřejmě po určitou dobu přežít v prostředí stáček haly (např. v aerosolu) a kontaminovat pivo [14]. Vysoká vlhkost a zvýšená teplota ve stáček hale značně usnadňují přežívání těchto bakterií v provozu [4, 32]. *Pectinatus* pravděpodobně není náhodnou kontaminací, ale trvale obývá pivovarský provoz [12, 17, 33]. Přirozené prostředí, způsob přenosu do pivovarského provozu, rezervoár a způsob perzistence těchto bakterií v provozu nebyly dosud objasněny [1, 20, 29].

Charakteristika druhu *P. portalensis* se neshoduje s obecnou charakteristikou rodu *Pectinatus*. Buňky *P. portalensis* jsou oválné, nepohyblivé, velké přibližně 1  $\mu\text{m}$ . Vyskytují se jednotlivě, po dvou a v rané stacionární fázi růstu lze pozorovat řetízky tvořené až deseti buňkami. Optimálního růstu (s až dvojnásobnou rychlostí v porovnání s ostatními druhy rodu *Pectinatus*) je dosaženo při teplotě 37 °C. *P. portalensis* byl izolován z odpadů vzniklých při výrobě vína. Jedná se zatím o jediný případ výskytu *Pectinatus* v prostředí mimo pivovarský provoz [7].

### Zymophilus

Rod *Zymophilus* zahrnuje dva druhy, *Z. paucivorans* a *Z. raffinosivorans*, nacházené vždy v souvislosti s pivovarskými provozy – v násadních kvasnicích a v odpadech vzniklých při výrobě piva [1, 3].

Bakterie rodu *Zymophilus* jsou rovné, mírně zakřivené až helikální pohyblivé tyčky vyskytující se jednotlivě, po dvou nebo méně často v krátkých řetízcích (obr. 3). Pohyblivost *Zymophilus* se může po sub-

Obr. 3 / Fig. 3 *Zymophilus raffinosivorans* DSM 20765

and low-hopped beers. In bottling halls, *Pectinatus* was isolated from the sewer system, drainage system, from lubricants mixed with beer residues, from the filler, from the floor and water condensed on the ceiling of the bottling hall [4, 9, 31, 32]. The main sources of beer contamination are taken to be air and water. Although *Pectinatus* is strictly anaerobic, it can obviously survive for some period of time in the environment of the bottling hall (e.g. in aerosol) and contaminate beer [14]. High air humidity and high temperature in the bottling hall greatly facilitates the survival of these bacteria in the brewery [4, 32]. *Pectinatus* probably does not represent an accidental contaminant but persists permanently in brewery plants [12, 17, 33]. The natural environment, mode of transfer into the brewery, sources and reservoirs and the basis of persistence of these bacteria in breweries have not yet been elucidated [1, 20, 29].

The characteristics of the species *P. portalensis* differs from the general characteristics of the genus *Pectinatus*. Cells of *P. portalensis* are oval, nonmotile, about 1  $\mu\text{m}$  in size. They occur singly, in pairs and, in the early stationary phase, they may form chains consisting of up to ten cells. Optimum growth (with a growth rate up to twice that of other *Pectinatus* species) occurs at 37 °C. *P. portalensis* was isolated from the wastes of wine production. It represents as yet the only known example of *Pectinatus* occurrence outside brewery plants [7].

### Zymophilus

The genus *Zymophilus* comprises two species: *Z. paucivorans* and *Z. raffinosivorans*, which are found solely in connection with brewery plants, namely in pitching yeast and in brewery wastes [1, 3].

*Zymophilus* bacteria are straight, slightly curved to helical motile rods found singly, in pairs or less frequently in short chains (Fig. 3). The motility of *Zymophilus* cells may disappear after subculturing [3, 6]. These species were previously erroneously classified as *Pectinatus* based on morphological similarity [34]. The basic characteristics of the genus are given in Table 1.

*Z. paucivorans* utilizes a narrower range of sugars than *Z. raffinosivorans*. Main metabolic products are acetic and propionic acids, *Z. paucivorans* produces also trace amounts of lactic acid [6]. *Zymophilus* grows at pH above 4.3–4.6 and at alcohol concentrations of up to 5 % (w/v) [31, 35] and its ability to spoil beer is similar to that of *Pectinatus* [1].

### Selenomonas

The genus *Selenomonas* includes at present 10 species out of which only *Selenomonas lactificex* has been isolated from contaminated brewer's yeast [6]. Other species are found in the oral cavity of humans, in the rumen of herbivores and in the intestine of pigs and some rodents [3, 36].

*Selenomonas* are typically moonlike to helical, with some flagella



kultivací vytrátit [3, 6]. Na základě morfologické podobnosti byly dříve chybně identifikovány jako rod *Pectinatus* [34]. Základní charakteristika rodu je uvedena v tab. 1.

*Z. paucivorans* využívá v porovnání se *Z. raffinivorans* užší spektrum cukrů. Hlavními produkty metabolismu těchto bakterií jsou kyselina octová a propionová, *Z. paucivorans* navíc produkuje stopová množství kyseliny mléčné [6]. *Zymophilus* roste při pH nad 4,3–4,6 a při obsahu alkoholu do 5 % (w/v) [31, 35], a jeho schopnost kazit pivo je podobná rodu *Pectinatus* [1].

### Selenomonas

Do rodu *Selenomonas* je v současné době řazeno 10 druhů, z nichž pouze jediný, *Selenomonas lactificifex*, byl izolován ve spojitosti s kontaminovanými pivovarskými kvasnicemi [6]. Ostatní druhy se vyskytují v ústní dutině člověka, v bacheru býložravců a ve střevech prasat a některých hlodavců [3, 36].

Pro *Selenomonas* je typický měsíčkovitý až helikální tvar buněk s několika bičíky vycházejícími ze svazku nebo v krátké linii v centrální části konkávní strany buněk [3, 12]. Schematicky je toto uspořádání bičíků znázorněno na obr. 4. Buňky se vyskytují jednotlivě, po dvou nebo v krátkých řetězcích (obr. 5). Pohyb *Selenomonas* lze popsat jako převalující se [6, 36]. Základní charakteristika druhu *S. lactificifex* je uvedena v tab. 1.

*Selenomonas lactificifex* je mnohdy uváděna jako pivo-kazící bakterie, přesto však nebyla nikdy izolována přímo ze zkaženého piva, ale pouze z kontaminovaných kvasnic [1, 6, 29]. Glukosu tato bakterie fermentuje na kyselinu mléčnou jako hlavní produkt a kyselinu octovou a propionovou jako vedlejší produkty [37]. Tím se také liší od většiny ostatních druhů rodu *Selenomonas*, které zkvašují glukosu za vzniku pouze kyseliny propionové a octové [6].

### Megasphaera

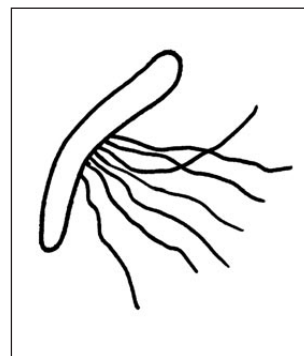
V rámci rodu *Megasphaera* je rozlišováno pět druhů: *M. cerevisiae*, *M. paucivorans*, *M. sueciensis*, *M. elsdonii* a *M. micronuciformis*. Druhy *M. cerevisiae*, *M. paucivorans*, *M. sueciensis* jsou nacházeny pouze v souvislosti se zkaženým pivem, v jednom případě byla tato bakterie izolována z pivovarských kvasnic [37]. Druhy *M. elsdonii* a *M. micronuciformis* jsou izolovány z prostředí mimo pivovarský provoz – *M. elsdonii* se vyskytuje v bacheru ovcí a dobytka a ve střevním traktu a stolici člověka, *M. micronuciformis* je izolována z klinického materiálu [3, 38].

Bakterie rodu *Megasphaera* jsou mesofilní, nesporulující, nepohyblivé, gramnegativní mírně oválné koky vyskytující se nejčastěji samostatně nebo po dvou, u pivovarských izolátů jen velmi výjimečně v krátkých řetězcích (obr. 6). Velikost buněk se pohybuje v rozmezí 1–1,6 µm [8, 12]. Katalasová reakce je u těchto bakterií negativní [3].

*Megasphaera* byla poprvé izolována ze zkaženého piva v 70. letech 20. století [22, 39]. Podobně jako v případě rodu *Pectinatus* stoupl v následujících letech počet případů kažení piva touto bakterií v souvislosti se zaváděním moderních plnicích technologií. Výskyt bakterií rodu *Megasphaera* byl zaznamenán ve zkažených pivech ve Finsku, Německu, Austrálii a USA [8, 40, 41, 42].

V současné době je podle odhadů *Megasphaera* původcem 3–7 % případů bakteriálního kažení lahvového, nejčastěji nepasterovaného piva. Náchylnější ke kažení jsou piva méně chmelená, nízkalkoholická a nealkoholická, a kromě zkaženého piva jsou tyto bakterie nacházeny v prostředí stáječích hal [1]. V literatuře se uvádí izolace *Megasphaera* ze vzduchu v okolí pivovaru [41].

Pro rod *Megasphaera* je typická velmi pomalá (až 6 týdnů) tvorba zákalu kontaminovaného piva [42]. Kontaminované pivo vykazuje



Obr. 4 / Fig. 4 Uspořádání bičíků *Selenomonas* – bičíky vychází z centrální části konkávní strany buňky / Flagellar organization in *Selenomonas* – flagella emerge from the central part of the concave side of the cell

originating from a bunch or a short line in the central part of the concave side of the cell [3, 12]. Fig. 4 shows a schematic representation of this arrangement of flagella. The cells occur singly, in pairs or in short chains (Fig. 5). The motion of *Selenomonas* can be described as tumbling [6, 36]. Basic characteristics of the *S. lactificifex* species are given in Table 1.

Although *Selenomonas lactificifex* is often presented as a beer-spoiling bacterium it has never been isolated directly from spoiled beer but only from contaminated yeast [1, 6, 29]. The bacterium ferments glucose to lactic acid as the main product and acetic and propionic acids as side products [37]. In this it differs from most other species of genus *Selenomonas*, which ferment glucose to propionic and acetic acids only [6].

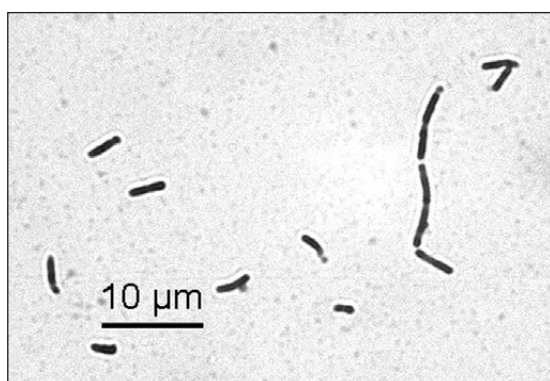
### Megasphaera

The genus *Megasphaera* comprises five species: *M. cerevisiae*, *M. paucivorans*, *M. sueciensis*, *M. elsdonii* a *M. micronuciformis*. The species *M. cerevisiae*, *M. paucivorans*, *M. sueciensis* are found only in association with spoiled beer in one case the bacteria were isolated from brewer's yeast [37]. Species *M. elsdonii* and *M. micronuciformis* have been isolated from environments outside brewery plants – *M. elsdonii* occurs in the rumen of sheep and cattle and in the intestinal tract and stools of humans, *M. micronuciformis* has been isolated from clinical material [3, 38].

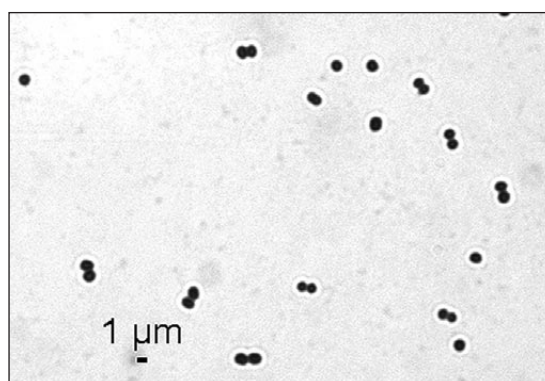
Bacteria of genus *Megasphaera* are mesophilic, nonsporulating, nonmotile, gram-negative slightly oval cocci occurring most frequently singly or in pairs, in brewery isolated also exceptionally in short chains (Fig. 6). Cell size is in the range of 1–1.6 µm [8, 12]. The catalase reaction of the bacteria is negative [3].

*Megasphaera* was first isolated from spoiled beer in the seventies of the last century [22, 39]. Like with the genus *Pectinatus* the number of cases of beer spoilage by this bacterium has then risen due to the introduction of modern bottling technologies. Occurrence of *Megasphaera* bacteria in spoiled beer has been noted in Finland, Germany, Australia and USA [8, 40, 41, 42].

Current estimates ascribe to *Megasphaera* some 3 to 7 % cases of bacterial spoilage of bottled, most often nonpasteurized beer. More spoilage-prone are low-hopped, low-alcohol and nonalcoholic beers. Apart from beer, the bacteria are found in various locations in



Obr. 5 / Fig. 5 *Selenomonas lactificifex* DSM 20757



Obr. 6 / Fig. 6 *Megasphaera cerevisiae* DSM 20461

silný zákal a zápach připomínající zkažená vejce [12, 25]. *Megasphaera* produkuje butyrát jako hlavní produkt, dále pak isobutyrrát, propionát, valerát, isovalerát, kaproát a sirovdik [12]. Druh *M. cerevisiae* produkuje navíc kyselinu octovou a *M. sueciensis* stopová množství acetoinu [8].

Údaje o citlivosti bakterií *Megasphaera* k alkoholu se v literárních zdrojích zcela neshodují – jako limitní jsou uváděny koncentrace 2,8 %, 3,8 % a 5,5 % (w/v) [12, 29, 35]. Optimální pH 6,3 s tolerančním rozmezím 4,0–7,5 [43]. Chelack a Ingledew [12] uvádí minimální pH 4,3.

## ZÁVĚR

V běžných podmínkách pivovarských provozů není možné zabránit vnikání a mnohdy i trvalé perzistenci piva škodících bakterií v surovinách a provozních zařízeních. Nejčastější kontaminací pivovarské výroby a hotového piva jsou bakterie mléčného kvašení (rody *Lactobacillus*, *Pediococcus*). Podílí se na přibližně 70 % všech případů bakteriálního kažení piva [5]. Jejich stanovení je v provozních laboratorích založeno na kultivačních metodách – membránové filtraci a přímé kultivaci na tužených půdách [35, 44]. Striktně anaerobní bakterie, obzvláště rody *Pectinatus* a *Megasphaera*, jsou méně častými původci kažení piva [5]. Jejich přítomnost v pivovaru není odhalena při běžné mikrobiologické kontrole – striktně anaerobní bakterie nelze detekovat pomocí membránové filtrace, nerostou na pevných půdách. Stanovení je také limitováno technikou odběru vzorku – při kontaktu těchto bakterií s kyslíkem dochází k jejich odumření a k získání falešně negativních výsledků [12, 45].

Výskyt striktně anaerobních bakterií a nárůst počtu případů kažení piva těmito mikroorganismy je v přímé souvislosti se současným vývojem plnicích technologií v pivovarství, jehož cílem je snížit obsah kyslíku v pivu na minimální hodnoty. Ke zvýšenému výskytu *Pectinatus* a *Megasphaera* v pivovarských provozech dále přispívá používání průtokové pasterace a studené sterilizace a stoupající produkce piv, která jsou více náchylná ke kažení (piva nepasterovaná, nealkoholická, nízkalkoholická a méně chmelená) [35, 43].

## Poděkování

Tato práce byla podpořena Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy ČR (Projekt MSM2B08022, Výzkumný záměr MSM6019369701).

Článek byl zpracován na základě přednášky na 34. Pivovarsko-sladařském semináři, 23.–24. 10. 2008, Plzeň  
Lektoroval Ing. Karel Sigler, DrSc., Mikrobiologický ústav AVČR  
Do redakce došlo 10. 11. 2008

## Literatura / References

1. Sakamoto, K., Konings, W. N.: Beer spoilage bacteria and hop resistance. *Int. J. Food Microbiol.* **89**, 2003, 105–124.
2. Juvonen, R., Koivula, T., Haikara, A.: Group-specific PCR-RFLP and real-time PCR methods for detection and tentative discrimination of strictly anaerobic beer-spoilage bacteria of the class *Clostridia*. *Int. J. Food Microbiol.* **128**, 2008, 162–169.
3. Sedláček, I.: Taxonomie prokaryot. 1. vydání, Masarykova univerzita, Brno, 2007.
4. Back, W.: Secondary contaminations in the filling area. *Brauwelt Int.* **4**, 1994, 326–334.
5. Dragone, G., Mussatto, S. I., Nogueira, A. D., de Almeida, e Silva J. B.: Review: Beer production: Spoilage microorganisms and detection methods. *Braz. J. Food Technol.* **10**, 2007, 240–251.
6. Schleifer, K. H., Leuteritz, M., Weiss, N., Ludwig, W., Kirchhof, G., Sedel-Rüfer, H.: Taxonomic study of anaerobic, gram-negative, rod-shaped bacteria from breweries: Emended description of *Pectinatus cerevisiophilus* and description of *Pectinatus frisingensis* sp. nov., *Selenomonas lacticifex* sp. nov., *Zymophilus rafinosivorans* gen. nov., sp. nov., and *Zymophilus paucivorans* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **40**, 1990, 19–27.
7. Gonzales, J. M., Jurado, V., Laiz, L., Zimmermann, J., Hermosin, B., Saiz-Jimenez, C.: *Pectinatus portalensis* nov.sp., a relatively fast-growing, coccoidal, novel *Pectinatus* species isolated from a wastewater treatment plant. *Antonie Leeuwen.* **86**, 2004, 241–248.
8. Juvonen, R., Suihko, M. L.: *Megasphaera paucivorans* sp. nov., *Megasphaera sueciensis* sp. nov. and *Pectinatus haikarae* sp.

bottling halls [1]. Literature sources report on isolation of *Megasphaera* from the air in the vicinity of a brewery [41].

A feature typical for *Megasphaera* is very slow (up to 6 weeks) formation of haze in contaminated beer [42]. Contaminated beer shows strong haze and smell resembling addled eggs [12, 25]. *Megasphaera* produces butyrate as the main product, and also isobutyrate, propionate, valerate, isovalerate, and caproate and hydrogen sulphide [12]. The species *M. cerevisiae* produces in addition acetate while *M. sueciensis* forms trace amounts of acetoin [8].

The literature data on the susceptibility of *Megasphaera* to alcohol vary, 2,8 %, 3,8 % and 5,5 % (w/v) being given as limit concentrations [12, 29, 35]. Optimum pH is 6.3, with a tolerance range of 4.0–7.5 [43]. Chelack and Ingledew [12] give pH 4.3 as the lower limit.

## CONCLUSION

Under conditions commonly encountered in brewery plants the transfer and sometimes permanent persistence of beer spoilage bacteria is practically impossible to prevent. The most frequent contaminants in breweries and in finished beer are lactic acid bacteria (genera *Lactobacillus*, *Pediococcus*), which are responsible for some 70 % of all cases of bacterial beer spoilage [5]. Their determination in brewery laboratories is based on cultivation methods- membrane filtration and direct cultivation on solid media [35, 44]. Strictly anaerobic bacteria, especially genera *Pectinatus* and *Megasphaera*, are less frequent beer contaminants [5]. Their presence in a brewery is not revealed by conventional microbiological checks since they cannot be detected by membrane filtration and do not grow on solid media. The detection is also limited by the sampling technique; on contact with oxygen these bacteria die and the detection procedure yields false-negative results [12, 45].

The occurrence of strictly anaerobic bacteria and increase in the number of cases of beer spoilage are in a direct association with the current development of bottling technologies in brewing industry, which aims at reducing oxygen content in beer to a minimum. Increased incidence of *Pectinatus* and *Megasphaera* in brewery plants is also assisted by the use of flow-through pasteurization and cold sterilization, and the ever increasing production of beers with propensity to spoilage (nonpasteurized, nonalcoholic, low-alcohol and low-hopped beers) [35, 43].

## Acknowledgement

This work was supported by the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech republic (Project MSM2B08022, Institutional Research Concept MSM6019369701).

- nov., isolated from brewery samples, and emended description of the genus *Pectinatus*. *Int. J. Syst. Evolution. Microbiol.* **56**, 2006, 695–702.
9. Lee, S. Y., Mabey, M. S., Jangaard, N. O., Horiuchi, E. K.: *Pectinatus*, a new genus of bacteria capable of growth in hopped beer. *J. Inst. Brew.* **86**, 1980, 28–30.
10. Haikara, A., Penttilä, L., Enari, T. M., Lounatmaa, K.: Microbiological, biochemical, and electron microscopic characterization of a *Pectinatus* strain. *Appl. Environ. Microbiol.* **41**, 1981b, 511–517.
11. Back, W.: Nachweis und Identifizierung gramnegativer bierschädlicher Bakterien. *Brauwissenschaft* **34**, 1981, 197–204.
12. Chelack, B. J., Ingledew, W. M.: Anaerobic gram-negative bacteria in brewing – A review. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **45**, 1987, 123–127.
13. Haikara, A., Enari, T.-M., Lounatmaa, K.: The genus *Pectinatus*, a new group of anaerobic beer spoilage bacteria. *Proc. EBC, Copenhagen*, 1981, 229–240.
14. Helander, I. M., Haikara, A., Sadovskaya, I., Vinogradov, E., Salikinoja-Salonen, M. S.: Lipopolysaccharides of anaerobic beer spoilage bacteria of the genus *Pectinatus* – lipopolysaccharides of a gram-positive genus. *FEMS Microbiol. Rev.* **28**, 2004, 543–552.
15. Chaban, B., Deneer, H., Dowgiert, T., Hymers, J., Ziola, B.: The flagellin gene and protein from the brewing spoilage bacteria *Pectinatus cerevisiophilus* and *Pectinatus frisingensis*. *Can. J. Microbiol.* **51**, 2005, 863–874.
16. Membré, J.-M., Tholozan, J.-L.: Modeling growth and off-flavours production of spoiled beer bacteria, *Pectinatus frisingensis*. *J. Appl. Bacteriol.* **77**, 1994, 456–460.



17. Haikara, A.: Immunological characterization of *Pectinatus cerevisiiphilus* strains. Appl. Environ. Microbiol. **46**, 1983, 1054–1058.
18. Back, W., Breu, S., Weigand, C.: Infektionsursachen im Jahre 1987. Brauwelt **138**, 1988, 1358–1362.
19. Watier, D., Leguerinel, I., Hornez, J. P., Chowdhury, I., Dubourguier, H. C.: Heat resistance of *Pectinatus* sp., a beer spoilage anaerobic bacterium. J. Appl. Bacteriol. **78**, 1995, 164–168.
20. Chihib, N.-E., Tholozan, J.-L.: Effect of rapid cooling and acidic pH on cellular homeostasis of *Pectinatus frisingensis*, a strictly anaerobic beer-spoilage bacterium. Int. J. Food Microbiol. **48**, 1999, 191–202.
21. Haikara, A.: Detection of *Pectinatus* contaminants in beer. J. Am. Soc. Brew. Chem. **43**, 1985, 43–46.
22. Back, W., Weiss, N., Seidel, H.: Isolierung und systematische Zuordnung bierschädlicher gramnegativer Bakterien. II.: Gramnegative anaerobe Stäbchen (Anhang: Aus Bier isolierte gramnegative fakultativ anaerobe Stäbchen). Brauwissenschaft **32**, 1979, 233–238.
23. Takahashi, N.: Presumed *Pectinatus* strain isolated from Japanese beer. Bull. Brew. Science **28**, 1983, 11–14.
24. Chowdhury, I., Watier, D., Hornez, J.-P.: Variability in survival of *Pectinatus cerevisiiphilus*, strictly anaerobic bacteria, under different oxygen conditions. Anaerobe **1**, 1995, 151–156.
25. Bendová, O., Kurzová, V.: Gramnegativní bakterie kontaminující pivo. Kvasny Prum. **27**, 1981, 268–271.
26. Watier, D., Leguerinel, I., Hornez, J. P., Dubourguier, H. C.: Influence of physicochemical parameters on growth kinetics of *Pectinatus cerevisiiphilus* and *Megasphaera cerevisiae*. Sci. Alim. **13**, 1993, 297–304.
27. Tholozan, J.-L., Grivet, J.-P., Vallet, C.: Metabolic pathway to propionate of *Pectinatus frisingensis*, a strictly anaerobic beer-spoilage bacterium. Arch. Microbiol. **162**, 1994, 401–408.
28. Tholozan, J.-L., Membré, J.-M., Grivet, J.P.: Physiology and development of *Pectinatus cerevisiiphilus* and *Pectinatus frisingensis*, two strict anaerobic beer spoilage bacteria. Int. J. Food Microbiol. **35**, 1997, 29–39.
29. Vaughan, A., O'Sullivan, T., van Sinderen, D.: Enhancing the microbiological stability of malt and beer – A review. J. Inst. Brew. **111**, 2005, 355–371.
30. Suiker, I., O'Sullivan, T., Vaughan, A.: Diversity analysis of beer spoiling gram-negative isolates using PCR fingerprinting and computer-assisted analysis. Proco. EBC, Venice, 2007, 1098–1105.
31. Seidel-Rüfer, H.: *Pectinatus* und andere morphologisch ähnliche gram-negative, anaerobe Stäbchen aus dem Brauereibereich. Mschr. Brauwissenschaft **43**, 1990, 101–105.
32. Henriksson, E., Haikara, A.: Airborne microorganisms in the brewery filling area and their effect on microbiological stability of beer. Mschr. Brauwissenschaft **44**, 1991, 4–8.
33. Hakalehto, E., Finne, J.: Identification by immunoblot analysis of major antigenic determinants of the anaerobic beer spoilage bacterium genus *Pectinatus*. FEMS Microbiol. Lett. **67**, 1990, 307–312.
34. Motoyama, Y., Ogata, T.: 16S-23S rDNA spacer of *Pectinatus*, *Selenomonas* and *Zymophilus* reveal new phylogenetic relationships between these genera. Int. J. Syst. Evolution. Microbiol. **50**, 2000, 883–886.
35. Jespersen, L., Jakobsen, M.: Specific spoilage organisms in breweries and laboratory media for their detection. Int. J. Food Microbiol. **33**, 1996, 139–155.
36. Kingsley, V. V., Hoeniger, J. F. M.: Growth, structure and classification of *Selenomonas*. Bacteriol. Rev. **37**, 1973, 479–521.
37. Haikara, A.: Invasion of anaerobic bacteria into pitching yeast. Proc. EBC, Zürich, 1989, 537–544.
38. Marchandin, H., E. Jumas-Bilak, B. Gay, C. Teyssier, H. Jean-Pierre, M. S. de Buochberg, C. Carriere, and J. P. Carlier.: 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**, 2003, 547–553.
39. Weiss, N., Seidel, H., Back, W.: Isolierung und systematische Zuordnung bierschädlicher gramnegativer Bakterien. I.: Gramnegative strikt anaerobe Kokken. Brauwissenschaft **32**, 1979, 189–194.
40. Ziola, B., Gee, L., Berg, N. N., Lee, S. Y.: Serogroups of the beer spoilage bacterium *Megasphaera cerevisiae* correlate with the molecular weight of the major EDTA-extractable surface protein. J. Microbiol. **46**, 2000, 95–100.
41. Suihko, M. L., Haikara, A.: Characterization of *Pectinatus* and *Megasphaera* strains by automated ribotyping. J. Inst. Brew. **107**, 2001, 175–184.
42. Haikara, A., Lounatmaa, K.: Characterization of *Megasphaera* sp., a new anaerobic beer spoilage coccus. Proc. EBC, Madrid, 1987, 473–480.
43. Watier, D., Chodhury, I., Leguerinel, I., Hornez, J. P.: Survival of *Megasphaera cerevisiae* heated in laboratory media, wort and beer. Food Microbiol. **13**, 1996, 205–212.
44. Šavel, J.: Mikrobiologická kontrola v pivovarech. 1. vydání, SNTL, Praha, 1980.
45. Haikara, A.: Detection of anaerobic, gram-negative bacteria in beer. Mschr. Brauwissenschaft **38**, 1985, 239–243.

# negele

- Teplotní senzory
- Manometry, Tlakové senzory
- Detekce hladiny, Limitní senzory
- Monitory průtoku, průtokoměry
- Vodivostní senzory



Hygienická provedení pro  
potravinařský průmysl

Výhradní zastoupení pro ČR a SR

## regom

instruments

Brabcova 2 / 1159, 147 00 PRAHA 4

☎ 241 402 206  
☎ 241 400 290

✉ regom@regom.cz  
🌐 www.regom.com