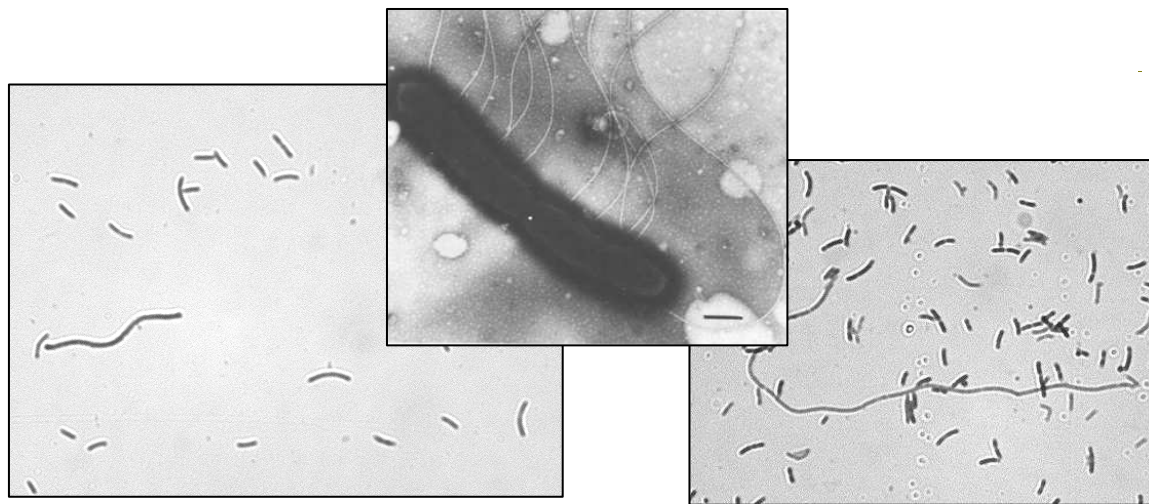


Identifikace bakterií rodu *Pectinatus* ve vzorku kontaminovaného piva

Dagmar Matoulková, Mikrobiologie VÚPS
23. pivovarsko-sladařské dny, České Budějovice,
14.-16.10.2009

Obsah prezentace

- 1) Rod *Pectinatus*
- 2) Schopnost bakterií *Pectinatus* kazit pivo
- 3) Identifikace *Pectinatus* ve vzorku zkaženého piva
- 4) Závěr

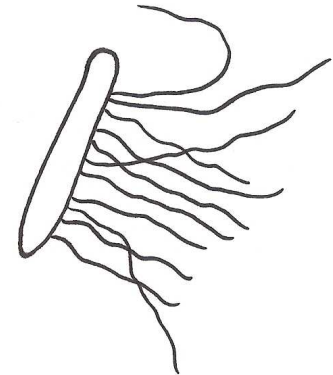


Identifikace bakterií *Pectinatus* ve vzorku kontaminovaného piva



Rod *Pectinatus* (1/3)

- tyčky, dlouhé 2 – 32 μm , mohou být i delší
- mladé buňky jsou krátké, mírně zakřivené
- starší buňky mají hadovitý tvar
- aktivní pohyb, u starších buněk tzv. hadovitý pohyb
- hřebínkovité uspořádání bičíků (nelze sledovat v běžném světelném mikroskopu)
- striktní anaerob – nelze izolovat kolonie na pevných půdách v běžných laboratorních podmínkách, ani v anaerostatu
- vyžaduje prostředí bez kyslíku a s nízkým redox-potenciálem



Rod *Pectinatus* (2/3)

- *P. cerevisiiphilus*
- *P. frisingensis*
- ~~● *P. portalensis*~~
- *P. haikarae*

Pectinatus portalensis, 2004

- chybná identifikace prokázána v roce 2008
- izolát z odpadu při výrobě vína, jednalo se ve skutečnosti o *Enterococcus faecalis*

- izolován pouze v souvislosti s pivovarským provozem/pivem
- jednotlivé druhy se liší schopností fermentovat různé zdroje uhlíku, tolerancí k alkoholu a růstem v různém rozmezí pH
- častěji je nalézán *P. frisingensis*

Identifikace bakterií *Pectinatus* ve vzorku kontaminovaného piva



Rod *Pectinatus* (3/3)

- první případy kažení piva způsobeného touto bakterií byly zaznamenány na konci 60. let 20. století (snižování obsahu kyslíku v pivu)
- sekundární kontaminace – tzn. *Pectinatus* kontaminuje pivo až při jeho plnění do lahví a plechovek
- přirozené prostředí bakterií *Pectinatus* je neznámé
- nalézán téměř výhradně v prostředí stáčecích linek
- způsob perzistence a šíření v prostředí dosud nebyl objasněn
- možný způsob kontaminace provozu – špinavé lahve (usazenina/biofilm) – myčka – kanál - plnič

Identifikace bakterií *Pectinatus* ve vzorku kontaminovaného piva



Schopnost bakterií *Pectinatus* kazit pivo (1/2)

- podle údajů z literatury způsobuje *Pectinatus* kažení nealkoholických a nízkoalkoholických piv – masivní zakalení a intenzivní zápach připomínající zkažené vejce (produkce H_2S a dalších sirných látek)
- dle výsledků získaných na VÚPS *Pectinatus* kazí i pivo s obsahem alkoholu nad 4 obj.%
- *Pectinatus* patří mezi bakterie, které kazí pivo obligátně, tj. kazí ho vždycky
- riziko kažení piva má stoupající trend (20-30% současný odhad)
 - modernizace plnicích technologií X obsah kyslíku

Identifikace bakterií *Pectinatus* ve vzorku kontaminovaného piva



Schopnost bakterií *Pectinatus* kazit pivo (2/2)

- kažení piva za 24 hod/několik týdnů v závislosti na velikosti inokula, teplotě skladování piva a složení piva
- *Pectinatus* je schopen kazit i piva s nízkým zbytkovým extraktem
- obsah hořkých chmelových látek nemá vliv na schopnost těchto bakterií kazit pivo (testovací koncentrace tetrahydroizo- α -kyselin 10 - 50mg/l)

Identifikace bakterií *Pectinatus* ve vzorku kontaminovaného piva



Identifikace *Pectinatus* ve vzorku zkaženého piva (1/5)

- stanovení pomocí konvenčních mikrobiologických metod není možné – citlivost k vzdušnému kyslíku
- bakterie *Pectinatus* nepřežijí membránovou filtraci, roztěr ani přeliv v běžných laboratorních podmínkách
- kultivace na ztužené půdě je možná pouze za přísných anaerobních podmínek (anaerobní box s regulovanou atmosférou N_2/H_2)
- existují tři základní přístupy při identifikaci *Pectinatus* ve vzorku zkaženého piva



Identifikace *Pectinatus* ve vzorku zkaženého piva (2/5)

I. Metodiky EBC (2005):

A. Striktně anaerobní membránová filtrace a anaerobní kultivace na předredukovaném ztuženém médiu (MRS, NBB, Raka-Ray, UBA atd.)

- mikroskopie, katalázový test, gramovo barvení

Výhody: spolehlivé stanovení

Nevýhody: investice, provozní náklady (plyny)

B. Použití selektivní obohacující půdy SMMP

- přidavek analyzovaného piva do SMMP půdy, kultivace 14 dní, sledování zabarvení půdy, mikroskopie

Nevýhody: SMMP není komerčně dostupná, doba stanovení



Identifikace *Pectinatus* ve vzorku zkaženého piva (3/5)

II. Kultivační metoda založená na mikroskopii

- zaočkování do vhodné tekuté/polotekuté půdy s nízkým redox-potenciálem

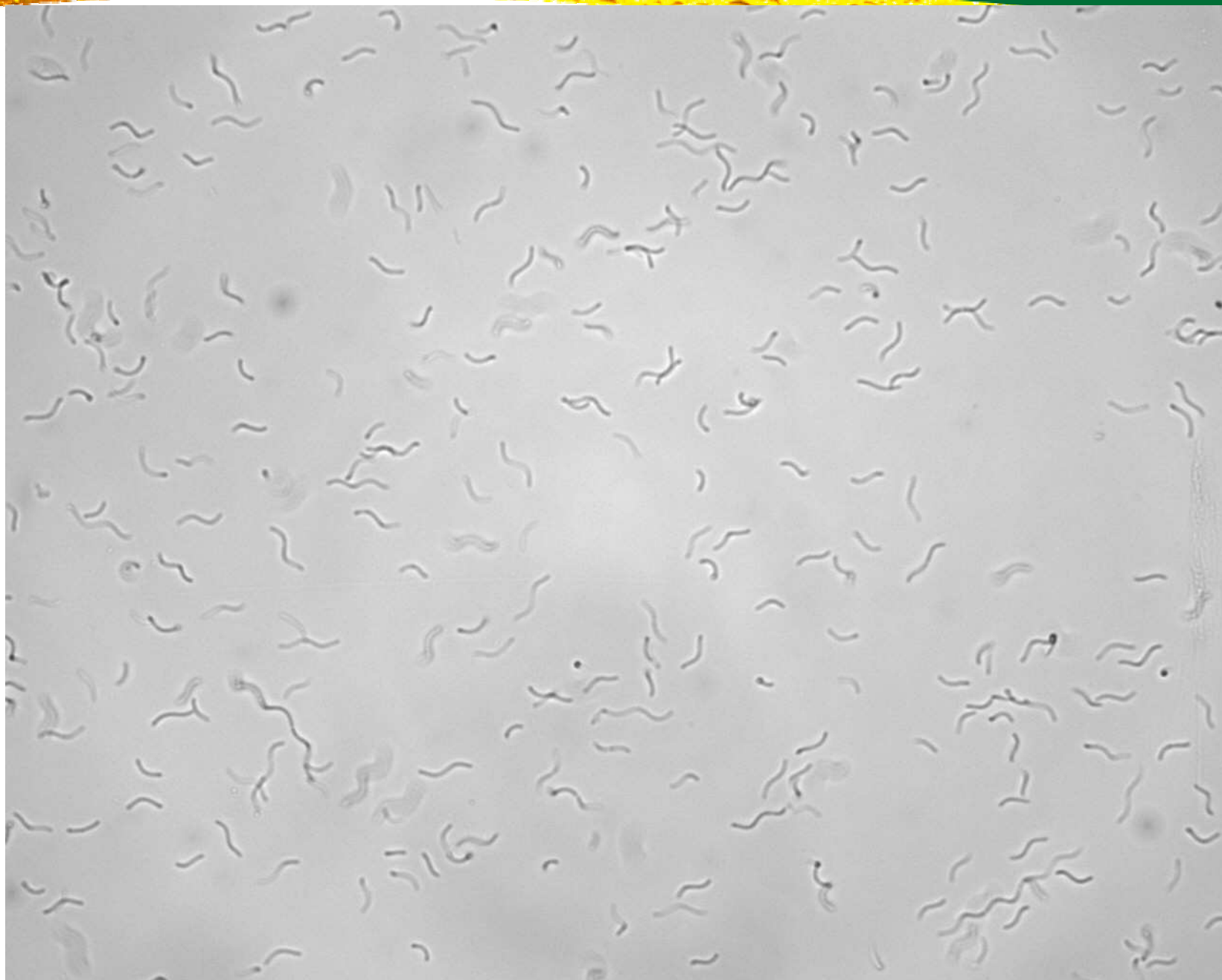
(např. MRS, UBA atd., popř. půdy pro kultivaci klinických anaerobů)

- mikroskopie, Gramovo barvení
- identifikace založená na morfologii buněk
 - typický hadovitý pohyb

Výhody: jednoduché, základní vybavení a chemikálie

Nevýhody: doprovodná kontaminace může komplikovat, popř. znemožnit stanovení

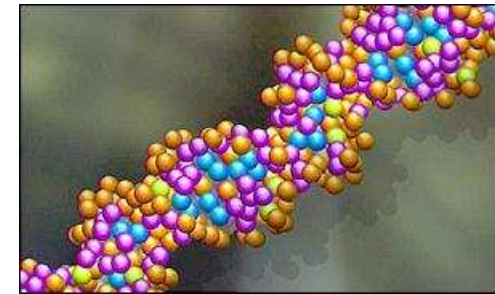




Identifikace *Pectinatus* ve vzorku zkaženého piva (4/5)

III. Identifikace pomocí PCR

- neexistuje definovaná metodika, vyšší vstupní a provozní náklady, interpretace může být obtížná
- spolehlivá metoda
- falešně pozitivní výsledky – detekce DNA, nikoli živého organismu



Výhody: spolehlivost stanovení

Nevýhody: nereálné v podmínkách běžné provozní laboratoře
(investice, provozní náklady, obtížná interpretace výsledků)



Identifikace *Pectinatus* ve vzorku zkaženého piva (5/5)

Kombinace kultivační metody a PCR-konfirmace

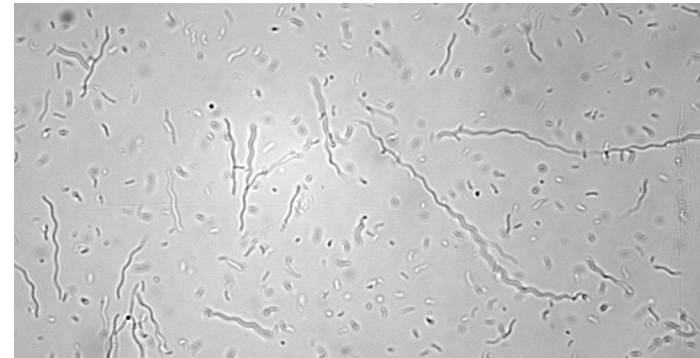
- při nalezení dlouhé hadovité buňky ve vzorku piva není možnost záměny s jiným bakteriálním rodem
- provedení rodově-specifické PCR pro potvrzení správné identifikace

Doplňkové testy

- stanovení profilu produkováných organických kyselin plynovou chromatografií

Výhody: poměrně spolehlivá metoda

Nevýhody: investice, „zbytečné“ pro rutinní stanovení



Identifikace bakterií *Pectinatus* ve vzorku kontaminovaného piva



Závěr

VÚPS řeší výzkumný projekt „Zlepšení systému mikrobiologické kontroly pivovarského provozu se zaměřením na snížení rizika kontaminace nealkoholických, nízkoalkoholických a nepasterovaných piv striktně anaerobními bakteriemi rodu *Pectinatus*“ financovaný Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy (2008-2011, MSM2B08022).

Identifikace bakterií *Pectinatus* ve vzorku kontaminovaného piva



Děkuji za pozornost

**Zpracováno za podpory Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy
(Projekt MSM2B08022)**

Identifikace bakterií *Pectinatus* ve vzorku kontaminovaného piva

