

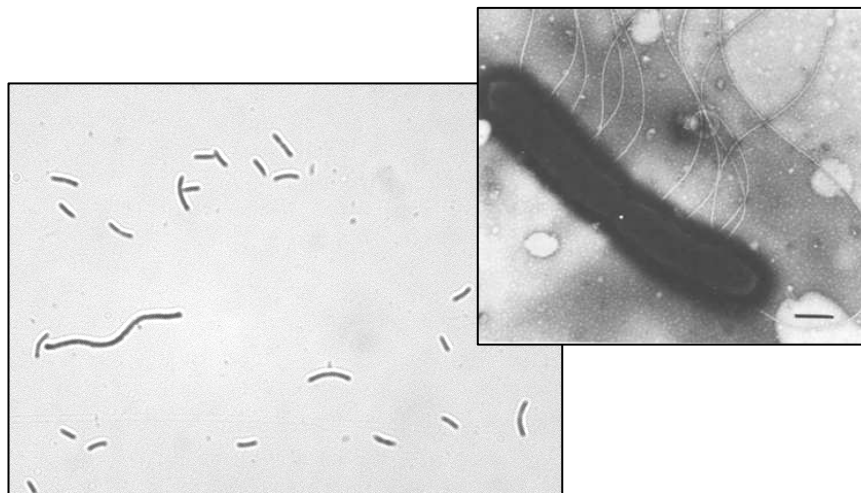
Detekce bakterií rodu *Pectinatus* v pivovarském provozu

**Dagmar Matoulková, Karel Kosař
Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, a.s.**

**25. kongres ČSSM
Stará Lesná, Vysoké Tatry, 15.-18.9.2010**

Obsah prezentace

- 1) Kontaminace piva striktně anaerobními bakteriemi
- 2) Rod *Pectinatus*
- 3) Identifikace *Pectinatus*
- 4) Monitoring českých pivovarů – projekt VÚPS
- 5) Závěr



Detekce bakterií rodu *Pectinatus* v pivovarském provozu



Kontaminace piva striktně anaerobními bakteriemi

Hlavní faktory ovlivňující mikrobiologickou stabilitu piva:

- koncentrace rozpuštěného kyslíku
- obsah alkoholu
- hořké chmelové látky
- nízký obsah živin
- nízké pH



Současný trend v plnicích technologiích – snížení obsahu rozpuštěného kyslíku v pivu na minimum

→ **médium pro anaerobní bakterie**

Detekce bakterií rodu *Pectinatus* v pivovarském provozu



Kontaminace piva striktně anaerobními bakteriemi

Striktně anaerobní bakterie přizpůsobené prostředí pivovarů:

- rody *Pectinatus*, *Megasphaera*, *Selenomonas*, *Zymophilus* z čeledi *Acidaminococcaceae* (Firmicutes, třída Clostridia)
- bakterie *Pectinatus* a *Megasphaera* kazí pivo obligátně
- *Zymophilus* a *Selenomonas* jsou sporadicky izolovány ze zkaženého piva a z pivovarských kvasnic
- mezofilní, nesporulující, gramnegativní nebo gramvariabilní se striktně fermentativním metabolismem

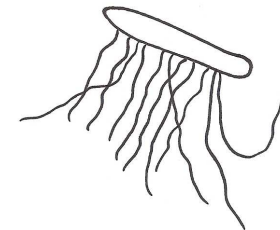
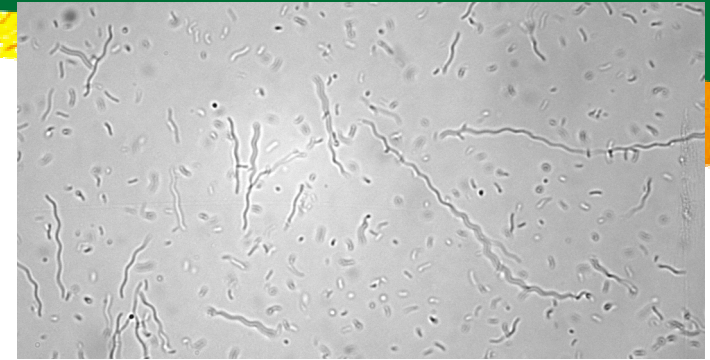
***Pectinatus* byl izolován vždy v souvislosti s pivovarským provozem a pivem. Jiné přirozené prostředí není známo.**

Detekce bakterií rodu *Pectinatus* v pivovarském provozu



Rod *Pectinatus*

- tyčky, dlouhé 2 – 32 μm , mohou být i delší
- mladé buňky jsou krátké, mírně zakřivené, starší mají **hadovitý tvar**
- aktivní pohyb, u starších buněk **tzv. hadovitý pohyb**
- hřebínkovité uspořádání bičíků
- striktně anaerobní – nelze je pěstovat na pevných půdách v běžných laboratorních podmínkách, ani v anaerostatu
- vyžaduje prostředí bez kyslíku a s nízkým redox-potenciálem
- využívá široké spektrum zdrojů uhlíku a energie
- **izolován vždy pouze v souvislosti s pivem a pivovarským provozem**



Rod *Pectinatus*

Přechodová forma mezi grampozitivními a gramnegativními bakteriemi:

- vnější membrána typická pro G-
- silná peptidoglykanová vrstva, invaginace a mesozomy v membráně

Druhy *P. cerevisiiphilus*, *P. frisingensis*, *P. haikarae* se liší schopností fermentovat různé zdroje uhlíku, tolerancí k alkoholu a růstem v různém rozmezí pH

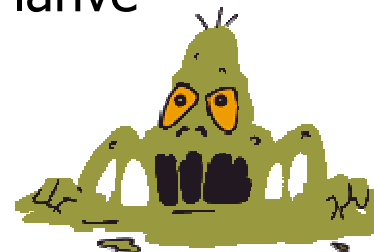
- tolerují pH 3,0 - 8,0, alkohol až 4,5 % (w/v)
- častěji je izolován druh *P. frisingensis*

Detekce bakterií rodu *Pectinatus* v pivovarském provozu



Rod *Pectinatus*

- první případy kažení piva způsobeného touto bakterií byly zaznamenány na konci 60. let 20. století
- **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



Detekce bakterií rodu *Pectinatus* v pivovarském provozu





Rod *Pectinatus*

- *Pectinatus* způsobuje masivní zakalení piva a intenzivní zápach připomínající zkažené vejce (produkce H_2S a dalších sirných látek)
- kazí pivo obligátně, tj. kazí ho vždycky (narozdíl od mléčných bakterií)
- **riziko kažení piva má stoupající trend** (20-30% současný odhad)
 - modernizace plnicích technologií X obsah kyslíku
- kažení piva za 24 hod/několik týdnů v závislosti na velikosti inokula, teplotě skladování piva a složení piva
- kazí pivo i s velmi nízkým obsahem extraktu
- obsah hořkých chmelových látek nemá vliv na schopnost těchto bakterií kazit pivo



Identifikace *Pectinatus*



- 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)
- nález v zakaleném pivu – mikroskopie
- **doporučované půdy (SMMP, NBB) – kultivace 7 dní a déle, problematická identifikace, není typický tvar a pohyb**
- stanovení z piva neřeší problém kontaminace provozu

Detekce bakterií rodu *Pectinatus* v pivovarském provozu



Identifikace *Pectinatus* – projekt VÚPS

Vývoj půdy pro detekci a identifikaci bakterií *Pectinatus* ze vzorků zkaženého piva a z pivovarského provozu. Testování širokého spektra tekutých a polotekutých půd v laboratorních podmínkách i v terénu, optimalizace techniky odběru vzorků z provozu.

MRS-bujón s obsahem látek snižujících redoxpotenciál, s malým množstvím agaru a selektivní složkou na bázi hořkých chmelových látek **umožňuje detekci bakterií *Pectinatus* za 18 – 48 hodin od odběru vzorku.**

- identifikace *Pectinatus* pomocí mikroskopie – **tyčky s typickým hadovitým tvarem a pohybem**

Složení média bude předmětem patentové ochrany.

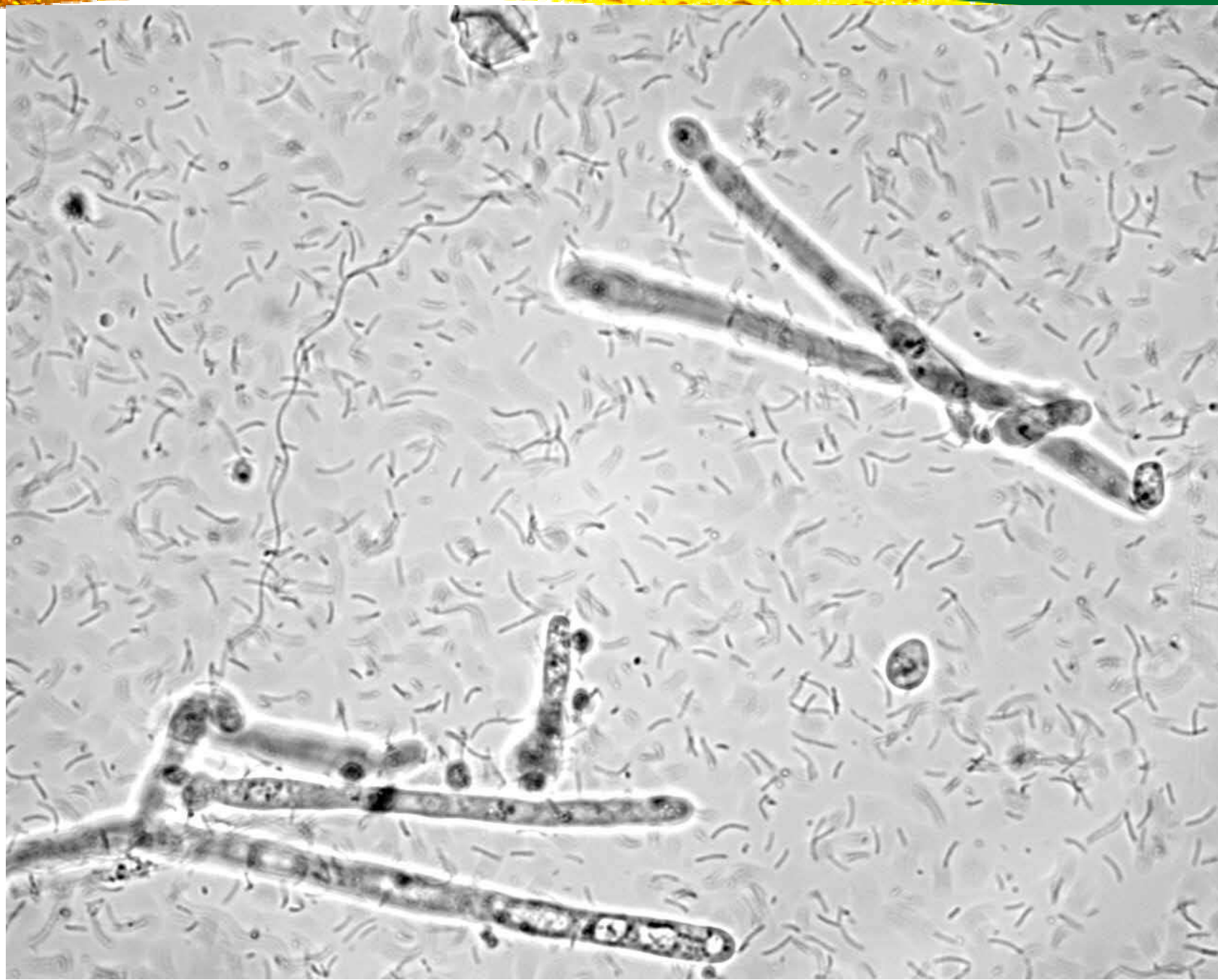
Detekce bakterií rodu *Pectinatus* v pivovarském provozu





Detekce bakterii rodu *Pectinatus* v pivovarském provozu





Monitoring českých pivovarů – projekt VÚPS

Odběry vzorků z plnicích zařízení a okolí (dopravníkové pásy, pracovní plochy, podlaha) v několika českých pivovarech.

Cíle monitoringu:

- 1) zjištění přítomnosti *Pectinatus* v daném provozu
- 2) stanovení rizikových míst
- 3) identifikace druhu, izolace *Pectinatus*
- 4) optimalizace složení půdy a techniky odběru vzorku

***Pectinatus* izolován nejčastěji z pracovní plochy plniče, z korunkovačky, z pásu na vstupu a výstupu z plniče.**

Identifikovány druhy *P. frisingensis* a *P. cerevisiiphilus* (druhově specifickou PCR).

Detekce bakterií rodu *Pectinatus* v pivovarském provozu



Závěr

Další cíle projektu:

- urychlit detekci bakterií *Pectinatus*
- provést kontrolu v dalších pivovarských provozech
- navrhnout opatření snižující rizika kontaminace piva bakteriemi rodu *Pectinatus*
- **zjistit zdroj a způsob šíření bakterií *Pectinatus***
- **objasnit způsob perzistence *Pectinatus* v prostředí pivovaru**



Děkuji za pozornost



Výzkum financován **Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy ČR.**

Projekt: „Zlepšení systému mikrobiologické kontroly pivovarského provozu se zaměřením na snížení rizika kontaminace nealkoholických, nízkoalkoholických a nepasterovaných piv striktně anaerobními bakteriemi rodu *Pectinatus*" (2008-2011, **MSM2B08022**).

Detekce bakterií rodu *Pectinatus* v pivovarském provozu

