

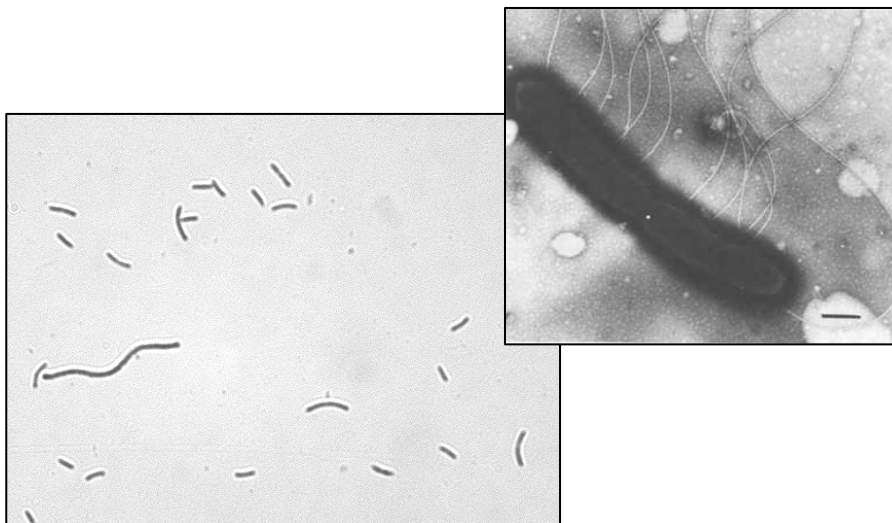
Modifikovaný MRS-bujón – nové médium pro rychlou a jednoduchou detekci bakterií *Pectinatus* v pivovarském provozu

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

**35. Pivovarsko-sladařský seminář
Plzeň, 3.- 4.11.2010**

Obsah prezentace

- 1) Kontaminace piva striktně anaerobními bakteriemi
- 2) Rod *Pectinatus*
- 3) Rizika spojená s přítomností *Pectinatus* v pivovaru
- 4) Projekt VÚPS „*Pectinatus*“ - monitoring českých pivovarů
- 5) Závěr



1. Kontaminace piva striktně anaerobními bakteriemi

Hlavní faktory ovlivňující mikrobiologickou stabilitu piva:

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



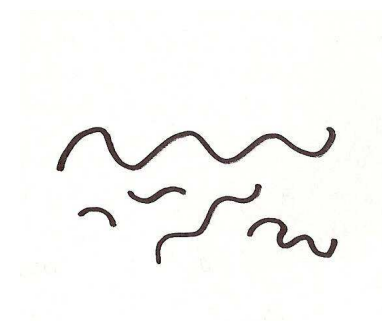
Současný trend v plnicích technologiích – snížení obsahu rozpuštěného kyslíku v pivu na minimum

→ **médium pro anaerobní bakterie**



2. Rod *Pectinatus*

- starší buňky mají **hadovitý tvar** a vykazují **tzv. hadovitý pohyb**
- striktně anaerobní – nelze je pěstovat na pevných půdách v běžných laboratorních podmínkách, ani v anaerostatu
- **izolován vždy v souvislosti s pivovarským provozem a pivem.**
Jiné prostředí výskytu není známo.
- první případy kažení piva způsobeného touto bakterií byly zaznamenány na konci 60. let 20. století
- dosud známy tři druhy: ***P. cerevisiiphilus***,
P. frisingensis, ***P. haikarae***



2. Rod *Pectinatus*

- **sekundární kontaminace** – tzn. *Pectinatus* kontaminuje pivo až při jeho plnění do lahví a plechovek
- nalézán téměř výhradně v prostředí stáčecích linek
- způsob perzistence a šíření v pivovaru a v prostředí mimo pivovarský provoz dosud nebyl objasněn
- ***Pectinatus* způsobuje masivní zakalení piva a intenzivní zápach připomínající zkažené vejce (produkce kyseliny propionové, H₂S a dalších sirných látek)**
- kazí pivo i s velmi nízkým obsahem extraktu
- toleruje pH 3,0 - 8,0, alkohol až 4,5 % (w/v)



3. Rizika spojená s přítomností *Pectinatus* v pivovaru

- náhlý projev kontaminace piva
- k zachytu bakterií nedochází při laboratorní kontrole, ale až při reklamaci zakaleného piva
- trvalá perzistence bakterií v pivovaru
- zákal / změněná chuť piva (patogenita *Pectinatus* není známa)
- riziko exploze lahví s nahromaděnými plyny



4. Projekt VÚPS „*Pectinatus*“

Výzkumný projekt řešený za finanční spoluúčasti několika českých pivovarů.

Cíle projektu:

1. Metoda (metody) identifikace bakterií *Pectinatus*
2. Vývoj půdy pro kultivaci *Pectinatus*
3. Monitoring pivovarů – izolace nových kmenů
4. Stanovení míst výskytu (perzistence) *Pectinatus* v pivovarském provozu



4. Projekt VÚPS „Pectinatus“

Vývoj půdy pro detekci a identifikaci *Pectinatus* ze vzorků zkaženého piva a z pivovarského provozu, testování půdy v laboratorních podmínkách i v terénu, optimalizace techniky odběru vzorků.

- 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 /reklamace – mikroskopie

Doporučované půdy (SMMP, NBB) – kultivace 7 dní a déle, problematická identifikace, není typický tvar a pohyb



4. Projekt VÚPS „Pectinatus“

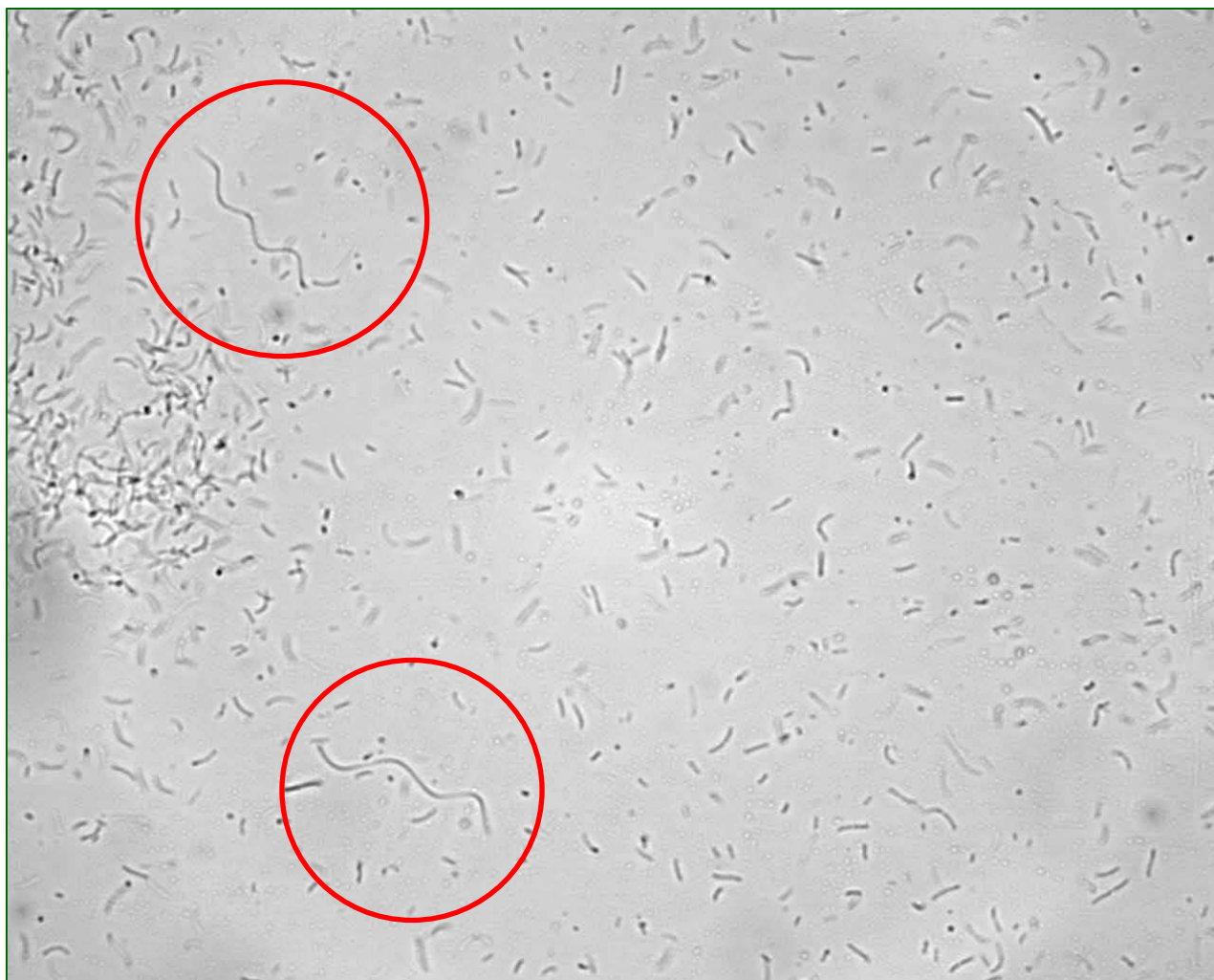
MRS-bujón s obsahem látek snižujících redoxpotenciál, s malým množstvím agaru a selektivní složkou **umožňuje detekci bakterií *Pectinatus* za 24–48 hodin.**

Jednoduchá identifikace *Pectinatus* pomocí mikroskopie – **tyčky s typickým hadovitým tvarem a pohybem.** Ověřeno opakovaně na sbírkových kmenech a provozních testech.

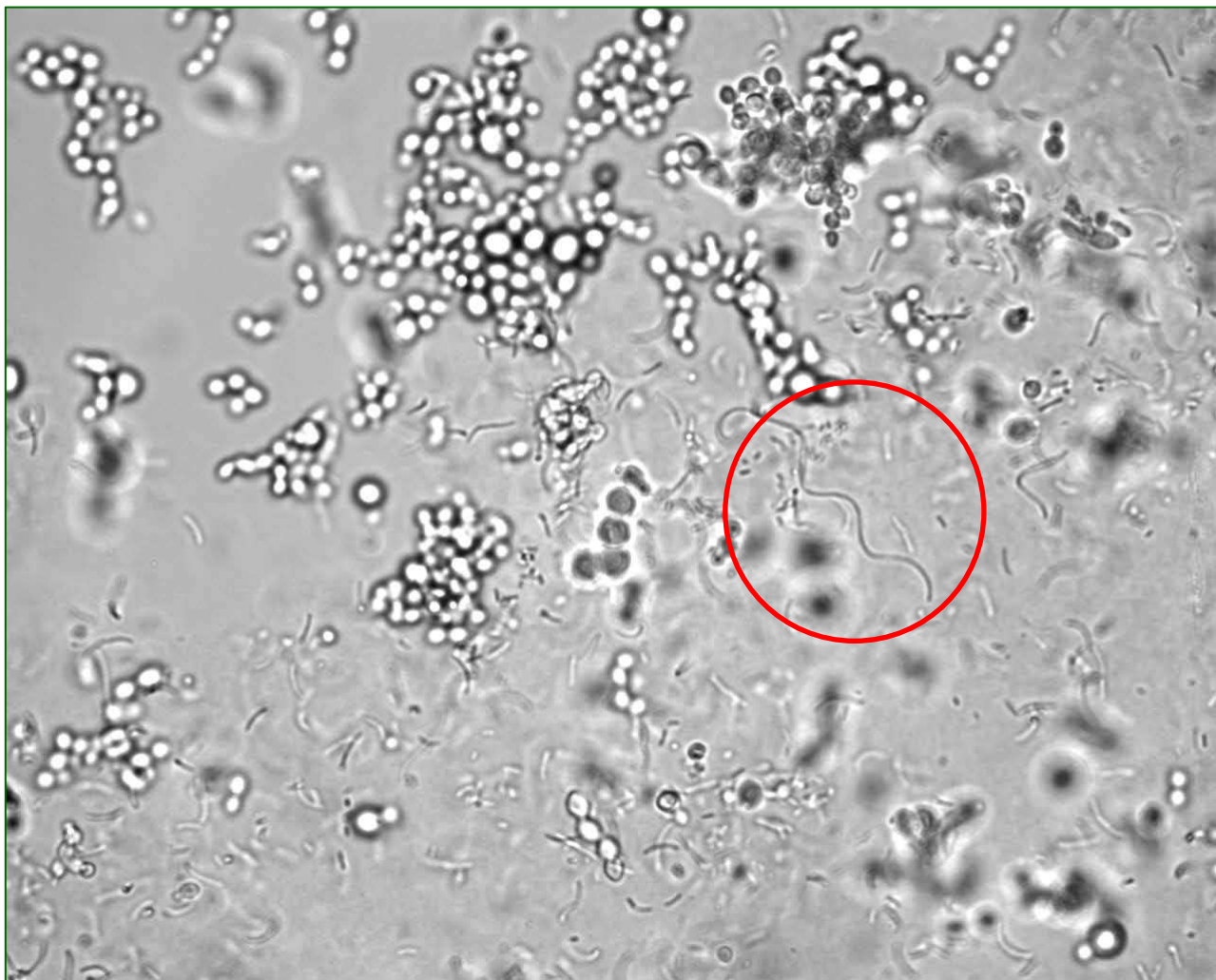
Doba inkubace závislá na kmeni a jeho fyziologickém stavu (pozn. biofilm)

Složení média bude předmětem patentové ochrany (PV 2010-297).

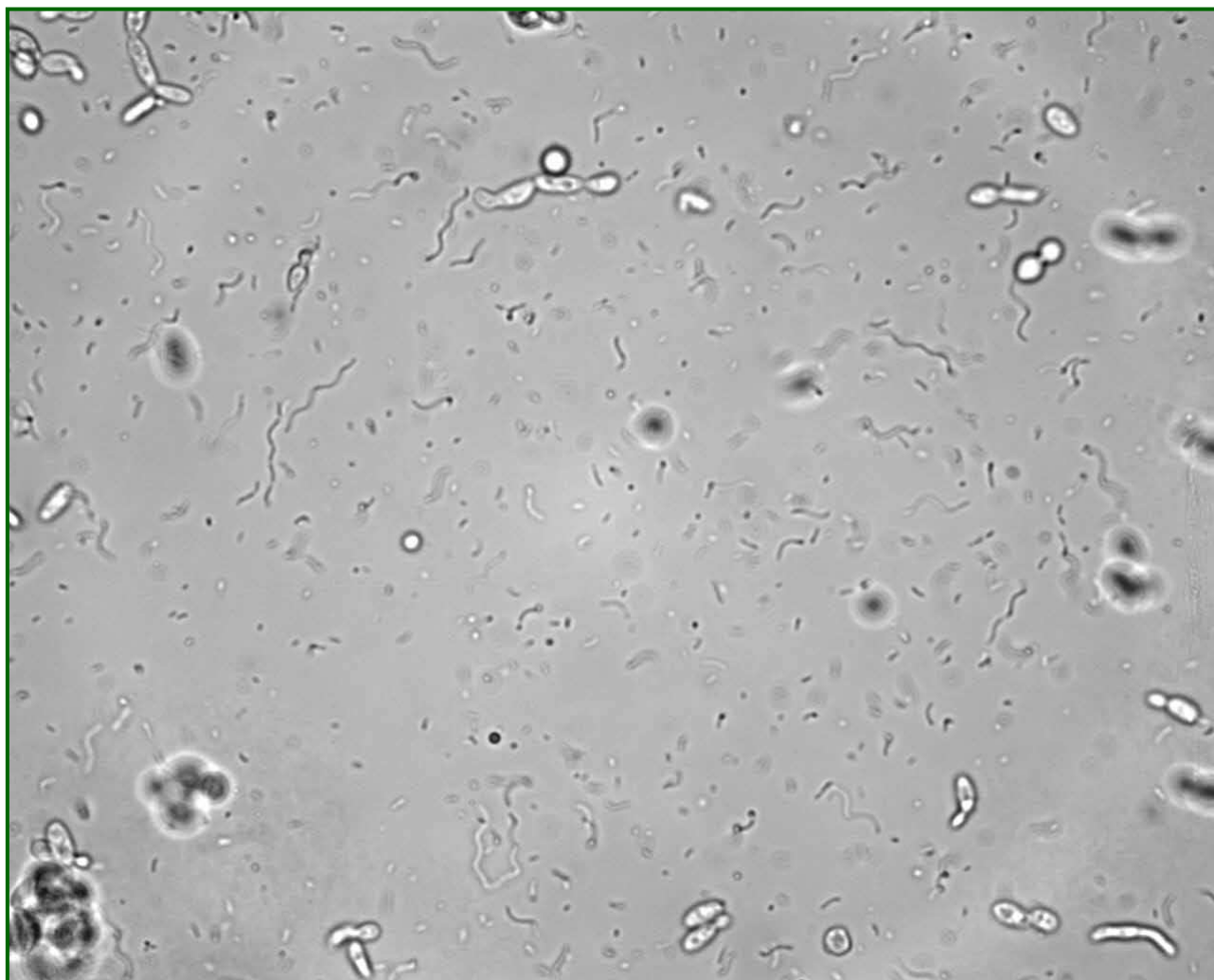




Obr. 1. Typický hadovitý tvar buněk *Pectinatus*



Obr. 2. *P. cerevisiophilus* - vzorek z dopravníkového pásu za plničem, hodnocení za 24 hodin od odběru vzorku



Obr. 3. *Pectinatus* spp. - vzorek z kloboučku plniče,
hodnocení za 48 hodin od odběru vzorku

4. Projekt VÚPS „Pectinatus“

„Terénní fáze“ projektu

Odběry vzorků v pivovarech, které se podílí na financování projektu „Pectinatus“

Cíle monitoringu:

- 1) zjištění přítomnosti *Pectinatus* v daném provozu
- 2) stanovení rizikových míst
- 3) identifikace druhu, izolace *Pectinatus*
- 4) využití kmenů pro další fáze projektu

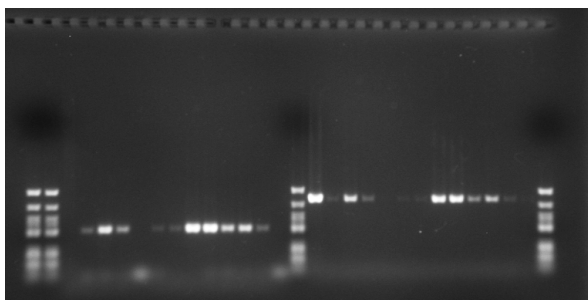


Odběrová místa: plnicí zařízení a bezprostřední okolí (dopravníkové pásy, pracovní plochy, podlaha)

4. Projekt VÚPS „Pectinatus“

Výsledky monitoringů:

- *Pectinatus* izolován nejčastěji z pracovní plochy plniče, z korunkovačky, z dopravníkového pásu na vstupu a výstupu z plniče, z podlahy pod plničem a v jeho okolí
- identifikovány druhy *P. frisingensis* a *P. cerevisiiphilus* (druhově specifickou PCR)
- dosud získáno 6 kmenů bakterií rodu *Pectinatus*
- kmeny využívány pro další fáze projektu, testování půd atd.

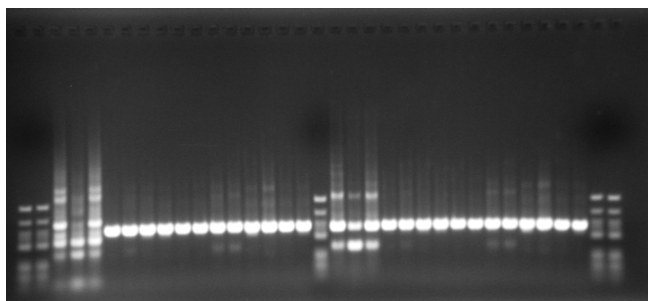


4. Projekt VÚPS „Pectinatus“

Výsledky monitoringů:

- nebyl zjištěn výskyt *Pectinatus* v prostoru keg-linek
- pivovar by mohl být přirozeným prostředím pro bakterie *Pectinatus*
- rozšíření v pivovarských provozech plošné? – doposud získány dva druhy rodu *Pectinatus*

→ **identifikace do úrovně kmene v další fázi projektu**



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 realizován za podpory **MŠMT ČR.**
(MSM2B08022)

35. Pivovarsko-sladařský seminář Plzeň

