

MONITORING G⁺ BAKTERIÁLNÍ KONTAMINACE V ČESKÝCH PIVOVARĚCH

MONITORING GRAMPOSITIVE BACTERIAL CONTAMINATION IN CZECH BREWERIES

IDA HOLLEROVÁ, PETRA KUBIZNIAKOVÁ, Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, a.s., Pivovarský ústav Praha, Lípová 15, 120 44/The Research Institute of Brewing and Malting, Plc., Praha, Lípová 15, 120 44

Klíčová slova: bakterie, kontaminace, pivo

Keywords: micro-organisms, contamination, beer

1 ÚVOD

Kontaminující mikroorganismy jsou velkým nebezpečím pro všechny potravinářské podniky, pivovarství nevyjímaje. Nelze přehlédnout, že i mikroorganismy považované za kulturní pro jednu potravinářskou komoditu se mohou stát v jiném potravinářském odvětví biologickou pohromou. Kupříkladu výskyt bakterií mléčného kvašení, které jsou kulturní mikroflórou v mlékárenském průmyslu, je v ostatních potravinářských komoditách přinejmenším nežádoucí. Jejich přítomnost v pivovarském provozu může způsobit nepříjemné senzorycké změny piva a při jejich masivním výskytu hrozí i nebezpečí úplného znehodnocení hotového výrobku.

Pivovarství má oproti ostatním potravinářským komoditám jednu obrovskou výhodu. Vzhledem k nízkému pH a obsahu živin v hotovém výrobku a naopak k vysokému obsahu ethanolu, stupni nasycení CO₂ a přítomnosti hořkých chmelových látek, je velice špatným živným médiem (substrátem) pro mnoho skupin mikroorganismů [1, 2]. Patogenní mikroorganismy, jako salmonely a listerie, nejsou schopny se v pivu pomnožovat ani v něm přežít.

Tyto výhody ovšem neplatí pro celý výrobní proces. Například při pomalém zchlazování mladiny, která je ideálním substrátem pro rozvoj mikroflóry, může dojít k tak rychlému rozvoji některých skupin mikroorganismů, že dokud jejich růst nepotlačí bouřlivý nárůst kulturních kvasinek při hlavním kvašení, mohou již způsobit nevratné senzorycké změny [3, 4].

Také v hotovém pivu se mohou vyskytnout mikroorganismy, které i za zmíněných nepříznivých podmínek jsou schopny v pivu přežít a růst. Jsou to především některé druhy striktních a fakultativních anaerobů – divoké kvasinky, či G⁺ a kataláza⁻ bakterie mléčného kvašení [1, 2]. Tyto mikroorganismy sice nejsou nebezpečné po stránce zdravotní závadnosti potravin, ale pro kontrolu jakosti jsou zlým snem [5]. Z hlediska kontroly kvality pivovarských provozů je v pivu za filtrem i kulturní pivovarská kvasinka považována za kontaminující mikroorganismus. Téměř všechny kvasinky při svém výskytu v pivu mohou do 7 dnů vytvořit masivní sediment, bakterie mléčného kvašení neméně masivní zákal do 1 měsíce. Při tendenci k prodlužování doby trvanlivosti může tedy jejich případný výskyt ve finálním výrobku způsobit velmi významné škody. Proto kontrole sanitací a biologické čistoty výrobních zařízení je samozřejmě v každém potravinářském podniku věnována velká pozornost.

Výsledky analytických rozborů pro kontrolu produktů a meziproduktů výroby při současném stavu vybavení provozních laboratoří je možno obdržet většinou nejpozději do 1 hodiny od odběru vzorku. Tento časový limit ovšem v případě biologické kontroly neplatí. Pro stanovení přítomnosti kvasinek ve vzorku klasickými plotnovými metodami, umožňujícími odečet vyrostlých kolonií, je zapotřebí až 48 hod. V případě G⁺ bakterií mléčného kvašení, nejvíce ohrožujících kvalitu hotového piva, je časová prodleva ještě dramatictější, od odběru vzorku k odečtení počtu kolonií je zapotřebí 5–7 dnů, podle druhu mikroorganismu [6]. Provozní mikrobiologové se proto neustále snaží získat nějakou rychlejší metodu biologické kontroly.

V literatuře je popsáno značné množství tzv. rychlých metod stanovení a identifikace mikroorganismů [1, 7, 8, 9], ne všechny jsou však vhodné pro podmínky provozních laboratoří. K následnému ověření některých z těchto metod byl nej-

1 INTRODUCTION

Contaminating micro-organisms constitute a significant risk to all types of food producers including the brewing industry. It is a known fact that even micro-organisms considered cultural for one food commodity can become a biological disaster in another food branch. For instance, lactic acid bacteria that form a cultural microflora in the dairy industry would be highly undesirable in other food lines. In the brewing industry, these bacteria may cause unpleasant sensory changes in beer and their massive occurrence may cause a complete destruction of the finished product.

When compared with other food industries, the brewing industry has a considerable advantage. Its final product is a very bad substrate for many micro-organism groups due to its low pH and content of nutritive substances and, in addition, due to the high ethanol content, degree of CO₂ saturation and the presence of hop bitter substances [1, 2]. Pathogenic micro-organisms, such as salmonelas and listeria, do not reproduce or survive in beer.

These advantages do not apply to the whole brewing process. Thus during the slow cooling of hopped wort, which is an ideal substrate for microflora development, some groups of micro-organisms may proliferate so quickly that they may cause irreversible sensory changes before their growth is checked by the fast growth of cultural yeast during the primary fermentation [3, 4].

Finished beer may also contain some micro-organisms able to survive and reproduce even under unfavourable conditions. These are mostly certain species of strict and facultative anaerobes – wild yeast or G⁺ and catalase⁻ lactic acid bacteria [1, 2]. These micro-organisms, though not representing any health risk, are a nightmare to the quality control [5]. For the quality control in a brewery plant, even cultural brewery yeast is considered a contaminating micro-organism if found in beer after the filter.

Nearly every yeast species present in finished beer may create a massive sediment within 7 days, lactic acid bacteria can do so within 1 month. Due to the current trend to extending the shelf-life, possible occurrence of yeast in the finished product may cause considerable spoilage. Every food company therefore pays a close attention to the control by means of sanitary precautions and biological purity of the production equipment.

The present state of plant laboratory equipment makes it possible to obtain the results of chemical analyses for the product and semiproduct control within one hour after sampling. This time limit, of course, is not valid for biological control. To assay a sample for the presence of yeast by using the classical plate methods and counting the resulting colonies takes up to 48 hours. For G⁺ lactic acid bacteria, which represent the greatest hazard for the quality of the finished beer, the delay from sampling to counting the colonies is even longer (5 to 7 days) depending on the microbial species [6]. That is why plant microbiologists keep searching for faster methods of biological control.

The literature describes a considerable number of so-called rapid methods for the assay and identification of micro-organisms [1, 7, 8, 9], but not all of these are suitable for plant laboratory conditions. To verify some of those methods, we

prve prováděn průzkum výskytu kontaminujících mikroorganismů, především G^+ bakterií, v českých pivovarských provozech, jejich izolace, identifikace a uchování celé jejich kolekce.

2 MATERIÁL A METODY

2.1 Půdy

Sterilní nízkotučné mléko pro uchovávání izolátů laktobacilů a pediokoků v zamraženém stavu [10].

MRS agar (OXOID) s přísadkou aktidionu (0,025 g/l) a β -phenylethanolu (0,3%) k izolaci a uchovávání G^+ a kataláza⁻ laktobacilů a pediokoků [6]

MRS bujón (OXOID) k pomnožení izolátů laktobacilů a pediokoků

MRS agar (OXOID) k namnožení izolátů laktobacilů a pediokoků před vlastní identifikací

2.2 Materiály

McFarlandova zákalová stupnice k přibližnému stanovení koncentrace bakterií před vlastní identifikací [11]

API CHL souprava pro identifikaci bakterií mléčného kvašení fy BioMérieux

180 ml lahvičky s patentním uzávěrem (výrobce Barby + Kuhner, Untersiemau, BRD)

membránové filtry Millipore, velikost pórů 0,45 μ m.

2.3 Postup práce

K získání izolátů kontaminantů byla odebírána mladá piva před sudováním, v případě provozů s klasickým kvašením na spilce, jinak piva před filtrací, po filtraci, před pasterací a hotová piva.

Jednotlivé mikroorganismy byly izolovány pomocí zakoncentrování vzorku membránovou filtrací a následnou kultivací na pevných selektivních půdách při teplotách 28–30 °C, z nichž byly jednotlivé kolonie, narostlé z jediné buňky, dále izolovány čárkovaním. Tento postup byl několikrát opakován a získané izoláty pak byly pro identifikaci uchovávány v příslušných médiích. Vyizolované mikroorganismy byly pěstovány na běžně používaných selektivních půdách. Bakterie mléčného kvašení uchovávány na půdě MRS při teplotách +4 až +6 °C byly přeočkovávány jednou za 14 dní, v případě jejich uložení ve sterilním nízkotučném mléce při teplotě –20 °C jednou za 6 měsíců.

Identifikace bakterií mléčného kvašení byla prováděna pomocí souprav API 50 CHL pro identifikaci laktobacilů a pediokoků, umožňující na základě biochemických testů na 49 karbohydrátových médiích umístěných v plastových mikrozkušnicích identifikaci 52 kmenů mléčných bakterií. Před vlastní identifikací byly namnoženy na potřebný počet jedinců. Současně se zaočkováváním identifikačních souprav byla vždy provedena inokulace 10% piva, odebraného sterilně za průtokovým pasterem v pivovaru, jednotlivými určovanými izoláty za účelem zjištění jejich schopnosti kazit pasterované pivo. Lahvičky byly naplněny pasterovaným pivem až po okraj pro zajištění naprosté nepřítomnosti kyslíku.

Izoláty mléčných bakterií byly namnoženy na příslušných pevných půdách zaočkováním roztěrem. Po 72 až 120 hodinách kultivace byly buňky očkovací kličkou resuspendovány v malém objemu sterilního fyziologického roztoku. Za současného počítání kapek byla z této suspenze připravena řidší, tak aby odpovídala zákalem standardu č. 2 McFarlandovy zákalové stupnice [11]. Poté bylo do vlastního inokulačního média, obsahujícího barevný indikátor, přidáno dvojnásobné množství kapek z původní husté suspenze a dokonale promícháno, přičemž bylo nutno dbát na zabránění vzniku bublin. Tímto inokulačním médiem byly potom mikropipetou plněny jednotlivé mikrozkušnice soupravy API 50 CHL. Po inokulaci mikrozkušnic byly jamky nad nimi zakápnuty sterilním parafinovým olejem pro zajištění anaerobního prostředí a po zakrytí celé soupravy víčkem kultivovány v termostatu při 30 °C.

Z připravených mikrobiálních suspenzí byly současně na-

investigated the occurrence of contaminating microorganisms, primarily G^+ bacteria, in Czech breweries. The contaminants were then isolated, identified and stored to form a collection.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 Media

Sterile low-fat milk for conservation of frozen isolates of lactobacilli and pediococci [10].

MRS agar (OXOID) with addition of actidione (0,025 g/l) and β -phenylethanol (0,3 %) for isolation and conservation of G^+ and catalase⁻ of lactobacilli and pediococci [6]

MRS broth (OXOID) for propagation of isolates of lactobacilli and pediococci

MRS agar (OXOID) for propagation of isolates of lactobacilli and pediococci prior to identification

2.2 Materials

McFarland turbidity scale for approximative assay of bacterial concentration prior to identification [11]

API CHL sets for identification of lactic acid bacteria, produced by BioMérieux

180 ml vials with safety closures produced by Barby + Kuhner, Untersiemau, BRD

Millipore membrane filters, pore size 0,45 μ m.

2.3 Operation Procedure

To acquire the contaminant isolates, samples were taken of young beers before racking or from the fermenting cellar in plants with classical fermentation, then beers before filtration, after filtration, before pasteurisation, and of finished beers.

The individual micro-organisms were isolated by sample concentration using membrane filtration and subsequent cultivation on solid selective media at 28–30 °C. Individual resulting colonies grown from a single cell were isolated by streaking. This procedure was repeated several times and the acquired isolates were then conserved for identification in the respective media. The isolated micro-organisms were cultivated on usual selective broths. The lactic acid bacteria, preserved on the MRS broth at +4 to +6 °C, were subcultured once in 14 days, those placed in sterile low-fat milk at of –20 °C once in 6 months.

Lactic acid bacteria were identified using the API 50 CHL kits for identification of lactobacilli and pediococci. Based on biochemical tests on 49 carbohydrate media located in plastic microtubes, the procedure permitted the identification of 52 strains of lactic acid bacteria. Prior to the identification, these bacteria were reproduced to obtain the necessary count of cells. Simultaneously with the seeding of the identification kits, 10 % beer from after the brewery flow pasteuriser was also inoculated (sampled) in a sterile way. This was done to assess the ability of individual isolates to spoil pasteurised beer. The vials were filled with pasteurised beer up to the rim in order to completely exclude oxygen.

Lactic acid bacteria isolates were propagated on the respective solid broths inoculated by smearing. After 72–120 hours of cultivation, the cells were resuspended by means of an inoculating loop into a small volume of sterile physiological saline. With simultaneous counting of drops, the suspension was diluted so that its turbidity corresponded to the No. 2 standard of the McFarland scale. A double number of drops from the original thick saline was then added into the inoculating medium containing a colour indicator, and thoroughly mixed. Bubble formation was prevented. Individual API 50 CHL microtubes were then filled with this inoculating medium by micropipettes. After the inoculation, sterile paraffin oil was dropped into the wells over the tubes in order to secure anaerobic conditions and the whole set was covered by a lid and cultivated in a thermostat at 30 °C.

The resulting microbial suspensions were further diluted to

ředěny ještě řidší suspenze, odpovídající zákalu McFarland č.1, tj. 300×10^6 bakterií/ml a 1 kapkou této suspenze byly zaočkovány lahvičky s patentním uzávěrem, kvůli anaerobnímu prostředí až po okraj naplněné 10% světlým pivem, odebraným v pivovaru za průtokovým pasterem. Toto množství buněk odpovídalo velikosti inokula přibližně $5,5 \times 10^4$ bakterií/ml. Lahvičky se zaočkováním pivem byly deponovány v temnu při pokojové teplotě po dobu tří měsíců a dvakrát týdně kontrolovány. Většina z izolátů, které pivo kazily, v něm způsobila masivní zákal nejpozději do 3 týdnů, pouze výjimečně k zákalu došlo později. Byly zvoleny mezní doby 3 a 8 týdnů deponace, po této době již k dalším poškozením piv nedocházelo.

3 VÝSLEDKY A DISKUSE

Vzorky pro průzkum byly odebírány v různých stadiích výroby, počínaje mladým pivem a konče hotovými nepasterovanými pivy. Vzorky byly odebrány v 16 českých pivovarech s výstavem nejméně 10 000 hl ročně. Ve vzorcích ze dvou pivovarů se nepodařilo izolovat dokonce ani jeden kontaminující mikroorganismus. Je nutné konstatovat, že po biologické stránce byla i převážná většina ostatních pivovarů velice dobře ošetřena a za 4 roky prováděného průzkumu bylo získáno z těchto pivovarů pouze 25 izolátů kvasinkových kontaminantů a 63 izolátů G^+ bakterií. Striktně anaerobní *Megasphaera* ani *Pectinatus* [12] nebyly nalezeny vůbec. Izolované mikroorganismy byly identifikovány a nadále jsou uchovávány pro následný výzkum.

Výsledky identifikací izolátů mléčných bakterií jsou zobrazeny v tab. 1. Kolekce izolátů kontaminantů z pivo-

correspond to McFarland No. 1 turbidity, i.e. 300×10^6 bacteria/ml. One drop of this suspension was used to inoculate a vial with a safety closure (filled to the rim to ensure anaerobic conditions) with 10 % pale beer collected in the brewery after the flow pasteuriser. This quantity of cells corresponded to an inoculum of approx. $5,5 \times 10^4$ bacteria/ml. The vials with inoculated beer were kept in the dark at room temperature and controlled twice a week over three months. The majority of beer-spoilage isolates caused massive turbidity in beer within 3 weeks at the latest at later dates, the turbidity was observed only exceptionally. The time limits for deposition were 3 and 8 weeks since no further spoilage was observed at longer time intervals.

3 RESULTS AND DISCUSSION

The samples were collected in different production stages beginning with young beers and ending with finished unpasteurised beers. The samples were collected in 16 Czech breweries, each of them with an annual shipped beer volume of at least 10 000 hl. Samples from two breweries did not contain any contaminating micro-organisms. From the biological point of view, also the vast majority of other breweries treated the product very well, only 25 isolates of yeast contaminants and 63 isolates of G^+ bacteria being intercepted during the 4-year period. No strictly anaerobic *Megasphaera* or *Pectinatus* (12) were found. The isolated micro-organisms were identified and conserved for future research.

The results of identification of lactic acid bacteria isolates are shown in Table 1. The collection of contaminant isolates from brewing plants is being

Tab.1/Table 1 Identifikace izolátů bakterií mléčného kvašení (z českých pivovarů)
Identification of Isolates of Lactic Acid Bacteria found in Czech Breweries

Č. izolátu/ Number of isolate	Identifikace izolátu Identification of isolates	Mikroskopický vzhled Image under microscoped	Pivo škodící Beer spoilage		Pivovar Brewery
			3 týdny/in 3 weeks	do 8 týdnů/in 8 weeks	
1	<i>L. plantarum</i>	mr – lr, ch	–	–	N
2	<i>L. plantarum</i>	mr, ch	–	+	N
3	<i>L. para. paracasei</i>	mr, ch	–	+	N
4	<i>L. brevis</i>	lr – vlr	–	–	N
5	<i>L. collinoides</i>	mr – lr, ch	+	+	N
6	<i>L. plantarum</i>	mr – lr, ch	+	+	N
7	<i>L. buchneri</i>	sr – mr	–	–	N
8	<i>L. buchneri</i>	sr – mr	+	+	N
9	<i>L. plantarum</i>	sr – lr	+	+	N
10	<i>L. plantarum</i>	mr	–	–	N
11	<i>L. brevis</i>	lr	–	–	N
12	<i>L. brevis</i>	lr	–	–	N
13	<i>L. brevis</i>	mr	–	–	N
14	<i>L. brevis</i>	mr	–	–	N
15	<i>L. brevis</i>	mr – lr	–	–	N
16	<i>L. fructivorans</i>	lr, in pairs	–	–	N
17	<i>L. collinoides</i>	lr	–	–	N
18	<i>L. brevis</i>	lr	+	+	D
19	<i>L. brevis</i>	lr, ch	+	+	D
20	<i>L. buchneri</i>	sr, in pairs	–	–	D
21	<i>L. buchneri</i>	sr – mr, in pairs	–	–	I
22	<i>L. brevis</i>	lr	+	+	I
23	<i>L. plantarum</i>	mr – lr	–	+	I
24	<i>L. buchneri</i>	mr	–	+	I
25	<i>L. plantarum</i>	sr – mr	–	+	K
26	<i>L. collinoides</i>	lr	–	–	G
27	<i>L. collinoides</i>	vlr	+	+	G
28	<i>L. brevis</i>	vlr	–	–	G
29	<i>L. brevis</i>	vlr	+	+	G
30	<i>L. plantarum</i>	vlr	–	–	G
31	<i>L. brevis</i>	vlr	+	+	G
32	<i>L. brevis</i>	vlr	–	–	G
33	<i>L. brevis</i>	vlr	–	–	G
34	<i>L. collinoides</i>	lr	+	+	N
35	<i>L. collinoides</i>	lr	–	–	N
36	<i>L. collinoides</i>	mr – lr	+	+	N
37	<i>L. brevis</i>	lr	+	+	N
38	<i>Leuc. mesenteroides</i>	lr	–	–	N
39	<i>L. brevis</i>	vlr	+	+	N
40	<i>L. brevis</i>	vlr	–	–	N
41	<i>L. plantarum</i>	vlr	–	–	N
42	<i>L. brevis</i>	mr – lr	+	+	N
43	<i>L. para. paracasei</i>	mr – lr	–	–	H
44	<i>Ped. damnosus</i>	cocci, tetrads	+	+	H
45	<i>L. para. paracasei</i>	mr, ch	–	–	H
46	<i>L. plantarum</i>	mr – lr	–	–	E
47	<i>L. brevis</i>	sr – mr, in pairs	–	–	E
48	<i>L. para. paracasei</i>	mr	–	–	E
49	<i>L. plantarum</i>	mr	–	–	E
50	<i>L. brevis</i>	vlr	–	–	F
51	<i>L. plantarum</i>	mr	–	+	B
52	<i>L. brevis</i>	lr	+	+	C
53	<i>Ped. sp.</i>	cocci, tetrads	–	–	J
54	<i>Ped. sp.</i>	cocci, tetrads	–	–	J
55	<i>L. brevis</i>	vlr	+	+	M
56	<i>L. brevis</i>	vlr	+	+	L
57	<i>Ped. sp.</i>	cocci, tetrads	+	+	L
58	<i>Ped. sp.</i>	cocci, tetrads	–	–	L
59	<i>Ped. sp.</i>	cocci, tetrads	–	–	L
60	<i>Ped. sp.</i>	cocci, tetrads	–	–	L
61	<i>L. brevis</i>	mr	–	–	L
62	<i>L. brevis</i>	sr, ch	–	–	A
63	<i>L. plantarum</i>	mr	+	+	A
CS	<i>L. plantarum</i>	mr	–	–	collection

CS kontrolní kmen sbírky bakterií mléčného kvašení „Laktoflora“, Praha/
control strain from dairy culture collection „Laktoflora“, Prague
sr krátké tyčinky/short rods < 2 nm
mr střední tyčinky/middle rods 2–4 nm
lr dlouhé tyčinky/long rods 4–6 nm
vlr velmi dlouhé tyčinky/very long rods > 6 nm
ch řetízující bakterie/chain – forming rods
in pairs párující bakterie/rods in pairs

varských provozů je neustále uchovávána a opakovaně je prováděno ověření jejich schopnosti růst a množit se v pasteurizovaném pivu. Především za výzkumným účelem jsou průběžně izolovány a identifikovány kmeny další. Ze získaných bakteriálních kontaminantů jsou zastoupeny rody *Lactobacillus* a *Pediococcus*, pouze jeden nalezený izolát byl rodu *Leuconostoc*. Z nich se nejčastěji vyskytly *L. brevis* (25x), *L. plantarum* (14x), *L. collinoides* (7x), *L. buchneri* (5x) a *L. para.paracasei* (4x). Pouze jedenkrát byly určeny také *L. fructivorans*, *P. damnosus* a *Leuc. mesen. mesenteroides*. 6x byl identifikován *Pediococcus* sp. bez bližšího určení druhu. Ačkoliv námi získaný počet bakteriálních izolátů nebyl příliš vysoký, přesto nejčastější výskyt *L. brevis* a *L. plantarum* v hotových pivech z různých provozů odpovídá údajům z literatury [13, 14].

Při sledování schopnosti izolátů bakterií mléčného kvašení kazit pivo se touto vlastností vyznačovaly 11x *L. brevis*, 7x *L. plantarum*, 2x *L. collinoides* a 1x *L. buchneri*, *L. para. paracasei* a *P. damnosus*. Ze 6 izolátů určených jako *Pediococcus* sp. kazil opětovně pivo jenom jeden kmen. Porovnání četnosti izolátů pivu škodících či nikoli je znázorněn v tab. 2 a na obr. 1. Rozdílná afinita jednotlivých izolovaných variet vůči pivu jako substrátu se jeví jako velmi perspektivní pro další výzkum.

4 ZÁVĚR

Čtyřletý průzkum výskytu kontaminace v českých pivovarech prokázal velmi dobrou úroveň sanitace těchto provozů. Pro získání uváděného počtu izolátů G⁺ bakterií mléčného kvašení byly odebrány v provozech stovky odběrů, valná většina z nich bez nárůstu kolonií na specifické půdě.

Některé z určených izolátů bakterií mléčného kvašení vykazovaly při identifikaci drobné odchylky od typických biochemických reakcí pro daný kmen. Ty sice nepřekážely přesnému zařazení mikroorganismu, ale ukázaly na velmi pravděpodobné vytvoření nových variet vlivem dlouhodobého přežívání v pro ně atypických vnějších podmínkách. Této skutečnosti odpovídá také jejich rozdílná schopnost využívat pivo jako jediný substrát k dalšímu růstu a pomnožování.

Na výsledky popsaného monitoringu navazuje další výzkum, který by umožnil rychlé rozlišení mikroorganismů a jejich schopnosti přežít a množit se za tak nepříznivých podmínek, jaké poskytuje pivo jako živné médium.

continuously preserved and the ability of contaminants to grow and reproduce in pasteurised beer is repeatedly verified. Further strains are steadily isolated and identified for research purposes. Bacterial contaminants included the genera *Lactobacillus* and *Pediococcus*, with a single isolate of the *Leuconostoc* genus. The most frequent species were *L. brevis* (25x), *L. plantarum* (14x), *L. collinoides* (7x), *L. buchneri* (5x) and *L. para.paracasei* (4x), *L. fructivorans*, *P. damnosus* and *Leuc. mesen. mesenteroides* (1x). *Pediococcus* ssp. was identified 6 times, without further specification of species. Although the number of bacterial isolates was not very high, the most frequent occurrence of *L. brevis* and *L. plantarum* in finished beers from different breweries corresponds to the published data [13, 14].

The beer-spoilage ability of the lactic acid bacteria isolates was found 11 times with *L. brevis*, 7 times *L. plantarum*, twice with *L. collinoides* and once with *L. buchneri*, *L. para.paracasei* and *P. damnosus*. From the six isolates identified as *Pediococcus* ssp. only one strain repeatedly spoiled beer. The frequency comparison of beer-spoilage bacteria and non-beer-spoilage bacteria is shown in Table 2 and Fig. 1. The different affinity of individual isolated varieties to beer as a substrate seems to be very promising for future research.

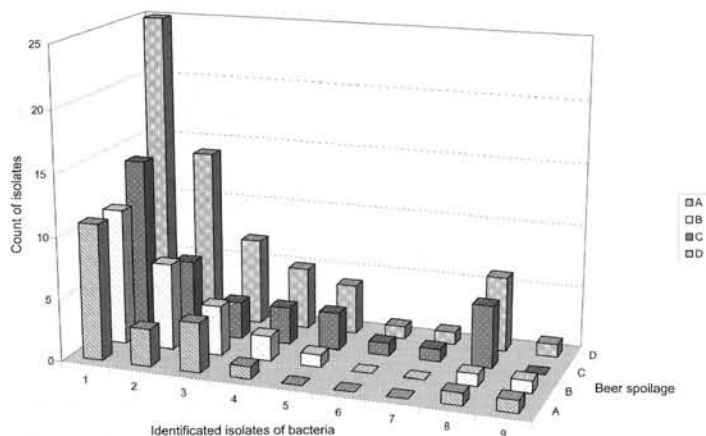
4 CONCLUSION

Our 4-year study of occurrence of contamination in Czech breweries documented a very good level of sanitation in these plants. Hundreds of samples were taken in the plants in order to acquire a sufficient number of isolates of G⁺ lactic acid bacteria. Most of the samples failed to show any growth of colonies on specific media.

During the identification, some of the lactic acid bacteria isolates to be determined exhibited minute deviations from biochemical reactions typical for the given strain. These deviations did not preclude an exact classification of the micro-organism but pointed to the very probable formation of new varieties resulting from the long-term survival under atypical external conditions. This corresponded also with the ability of the bacteria to utilise beer as the sole substrate for growth and reproduction.

The results of this monitoring study form a basis for further research, which could permit a fast differentiation between different microorganisms and facile determination of their ability to survive and reproduce under the unfavourable conditions they encounter in beer as a nutrient medium.

Obr. 1/ Fig. 1 Porovnání četnosti izolátů bakterií mléčného kvašení/
The frequency comparison of the lactic bacteria isolates



- A izoláty bakterií mléčného kvašení kazící pivo do 3 týdnů
Isolates of bacteria spoiled beer in 3 weeks
B izoláty bakterií mléčného kvašení kazící pivo do 8 týdnů
Isolates of bacteria spoiled beer in 8 weeks
C izoláty neškodící pivu
Non-beer spoilage isolates
D celkový počet izolátů
Total count of isolates

Tab. 2/ Table 2 Porovnání četnosti izolátů bakterií mléčného kvašení/
The frequency comparison of the lactic bacteria isolates

		A	B	C	D
1	<i>L. brevis</i>	11	11	14	25
2	<i>L. plantarum</i>	3	7	6	14
3	<i>L. collinoides</i>	4	4	3	7
4	<i>L. buchneri</i>	1	2	3	5
5	<i>L. para. paracasei</i>	0	1	3	4
6	<i>L. fructivorans</i>	0	0	1	1
7	<i>Leuc. mesenteroides</i>	0	0	1	1
8	<i>Pediococcus</i> sp.	1	1	5	6
9	<i>Ped. damnosus</i>	1	1	0	1

Literatura/References

- [1] Simpson, W.J.: *Brew. Guardian* **6**, 1991, s. 30–34.
- [2] Dowhanick, T.M.: *Cerevisia Biotechnol.* **20**, 1995, s. 40–50.
- [3] Šilhánková, L.: *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnologii*, Victoria Publishing, Praha, 1995.
- [4] Adams, M.R., Moss, M.O.: *Food Microbiology*. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1995.
- [5] Sondag, R.: *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **50**, 1992, s. 153–157.
- [6] EBC Analytica Microbiologica II, EBC Microbiology Group, 1992.

- [7] Taguchi, H.: Proceedings of the 25th Congress of the European Brewing Convention, Brussels, 1995, s. 621–628.
[8] Vogeser, G.: Proc. Eur. Brew. Conv., 25th Congress, Brussels, 1995, s. 629–636.
[9] Davies, A.M.: Proc. Eur. Brew. Conv., 25th Congress, Brussels, 1995, s. 637–643.
[10] Pokorná, L.: personal information.
[11] Balows, A., Hausler, W.J., Herrmann, K.L., Isenberg, H.G., Shadomy, H.J.: Manual of Clinical Microbiology, Fifth Edition. American Society for Microbiology – Washington, 1991.
[12] Lee, S.Y.: J. Am. Soc. Brew. Chem. 52, 1994, s. 115–116.
[13] Basante, E.P.R., Quintana, F.B.: Cerveza Malta 33, 1996, s. 21–23.
[14] Sami, M. et al.: J. Am. Soc. Brew. Chem. 55, 1997 s. 137–140.

*Originally published in J. Inst. Brew 107, 2001 (6),
p. 355–358.*

Translated and reprinted with permission of publisher

Hollerová, I. – Kubizniaková, P.: Monitoring G⁺ bakteriální kontaminace v českých pivovarech. Kvasný Prum. 48, 2002, č. 11–12, s. 309–313.

Ve vybraných českých pivovarech byl prováděn průzkum průběhu kontroly kvality. Veškeré zjištěné grampozitivní bakterie byly izolovány a identifikovány za použití biochemických setů API 50 CHL, používaného obvykle jako srovnávací metody při určování kmenů bakterií mléčného kvašení. Pasterované pivo bylo zaočkováno všemi nalezenými bakteriemi bez přístupu kyslíku. Po dobu tří měsíců byla sledována tvorba zákalu. Z výsledků vyplývá, že i když jsou izoláty identifikovány jako identické, může mít každé pivo různý průběh.

Hollerová, I. – Kubizniaková, P.: Monitoring Grampositive Bacterial Contamination in Czech Breweries. Kvasný Prum. 48, 2002, No. 11–12, p. 309–313.

Quality control procedures were monitored in a number of Czech breweries. All Gram positive bacterial contaminants found in the beer were collected and isolated. The genera of G⁺ bacteria obtained from the breweries were isolated and identified by means of the biochemical sets API 50 CHL. This method is generally used as a comparative method for identification of Lactic Acid Bacteria strains. Pasteurised beer was inoculated with all identified bacteria in the absence of oxygen. Haze formation was checked over three months. The results show that different beer spoilage was observed on inoculating beer with isolates identified as identical.

Hollerová, I. – Kubizniaková, P.: Monitoring der G⁺-bakterieller Kontamination in tschechischen Brauereien. Kvasný Prum., 48, 2002 Nr. 11–12, S. 309–313.

In ausgewählten tschechischen Brauereien wurde das Monitoring des Verlaufs der Qualitätskontrolle durchgeführt. Die gesamte ermittelte grampositive Bakterien wurden isoliert und identifiziert, und zwar bei Applikation des biochemischen Sets API 50 CHL, das gewöhnlich als Vergleichsmethode bei der Bestimmung der Bakterienstämme der Milchsäuregärung benutzt wird. Das pasteurisierte Bier wurde mit allen gefundenen Bakterien unter Sauerstoffabschluss beimpft. In der Dauer von drei Monaten wurde die Trübungsbildung verfolgt. Aus den Ergebnissen ist ersichtlich, dass auch wenn die Isolate als identisch identifiziert werden, kann das Verderben des Bieres einen unterschiedlichen Verlauf aufweisen.

Голлерова, И. – Кубизнякова, П.: Мониторинг G⁺ бактериального заражения на чешских пивзаводах. Kvasný Prum. 48, 2002, No. 11–12, стр. 309–313.

На избранных чешских пивзаводах был проведен мониторинг прохождения контроля качества. Все определенные грампозитивные бактерии были изолированы и проведена их идентификация посредством биохимического набора API 50 CHL, обыкновенно применяемого в качестве сравнительного метода для определения штаммов бактерий молочнокислого брожения. Пастеризованное пиво было заражено всеми найденными бактериями без доступа кислорода. В течение трех месяцев было исследовано образование муты. Из результатов вытекает, что даже при изолятах, идентифицированных как идентичные, может иметь порча пива разное прохождение.

Upozorňujeme čtenáře, že celé články z letošního ročníku časopisu Journal of The Institute of Brewing jsou do konce letošního roku bezplatně k dispozici na URL:

<http://www.igb.org.uk/igbsite/home/index.asp>

Abstrakta článků časopisu MBAA Technical Quarterly lze najít na URL: <http://www.mbaa.com> Abstrakta článků časopisu Journal of American Society of Brewing Chemistry jsou na URL: <http://www.asbcnet.org>

DOSYCOVÁNÍ A BLENDING (HGB)



HAFFMANS CARBO-BLEND

- Přesný
- Flexibilní
- Spolehlivý
- Plně automatický
- Kapacity 10 – 2 300 hl/h
- Nízké nároky na údržbu
- Hygienický design
- Lokální servis



REGOM INSTRUMENTS s.r.o.

Tel.: 241 402 206

Fax: 241 400 290

www.regom.cz regom@regom.cz