

# CHARAKTERIZACE BAKTERIÁLNÍ KONTAMINACE V PIVU METODOU PCR

## CHARACTERIZATION OF BACTERIAL CONTAMINATION IN BEER BY PCR METHOD

JAROSLAV VOHÁNKA<sup>1</sup>, PAVEL DOSTÁLEK<sup>1</sup>, JAROMÍR FIALA<sup>1</sup>, IDA HOLLEROVÁ<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, VŠCHT Praha, Technická 5, Praha 6

<sup>2</sup>Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, a.s., Lípová 15, Praha 2

**Klíčová slova:** pivo, kontaminace, *Lactobacillus*, PCR, DNA, analýza

**Keywords:** beer, contamination, *Lactobacillus*, PCR, DNA, analysis

### 1 ÚVOD

Bakteriální kontaminace piva, pokud nejsou striktně dodržována pravidla dokonalé sanitace, představuje i v dnešní době pro pivovarství vážné nebezpečí.

V hotovém pivu je nejčastější kontaminace bakteriemi mléčného kvašení. Protože tyto bakterie zahrnují mnoho druhů, je dosti často problém s jejich přesnou charakterizací. Na 31. Pivovarsko-sladařském semináři v Plzni bylo referováno [1] o nejčastěji se vyskytujících mléčných bakteriích v pivu. Námi zkoumané izoláty byly na základě biochemických charakteristik zařazeny jako *Lactobacillus plantarum*. Rod *Lactobacillus* je charakterizován jako G<sup>+</sup>, katalasa negativní nesporetvorné tyčinky. Dělí se na homofermentativní podrod *Lactobacillus* a heterofermentativní podrod *Saccharobacillus*. *Lactobacillus plantarum* patří do podrodu *Lactobacillus* a tvoří opticky inaktivní kyselinu mléčnou. Je velmi rozšířen v přírodě, účastní se mléčného kvašení rostlinného materiálu (zelí, okurky apod.) [2]. Některé potravinářské podniky, jako jsou mlékárny, využívají tuto bakterii jako kulturní mikroorganismus. Její přítomnost v pivu je ovšem kontaminací.

Abychom potvrdili, že se jedná skutečně o *Lactobacillus plantarum*, použili jsme přesnější a specifitější metodu charakterizace izolátů bakterií, které byly izolovány ve Výzkumném ústavu pivovarském a sladařském v Praze.

### 2 MATERIÁL A METODY

Pracovní postup se skládal z několika kroků. Nejprve byla izolována samotná gDNA z bakterií pomocí kitu a byla změněna absorbance pomocí spektrofotometru při vlnové délce  $\lambda = 260$  nm. Ze zjištěných hodnot byla vypočtena koncentrace vyizolované DNA. K určení druhu bakterie byl použit speciální kit BrewSave (TaKaRa). Pomocí tohoto kitu bylo možno amplifikovat část gDNA a podle velikosti amplifikované části určit druh.

#### 2.1 Použité půdy a způsoby kultivace bakterií rodu *Lactobacillus*

- Sterilní nízkotučné mléko pro uchování izolátů laktobacilů v zamraženém stavu při teplotě -20 °C,
- MRS agar (OXOID) s přidavkem akti-

dionu (0,025 g/l) a  $\beta$ -fenylethanolu (0,3%) k uchování G<sup>+</sup> a katalasu netvořících laktobacilů [3],

- MRS bujón (OXOID) k pomnožení izolátů laktobacilů,
- MRS agar (OXOID) k namnožení izolátů laktobacilů před izolací DNA.

Izoláty bakterií na MRS médiích je třeba od doby jejich získání do možnosti jejich identifikace velmi často přeočkovávat (1x za 14 dní). Kultivace probíhala postupně na všech použitých půdách v termostatu při teplotách 28–30 °C [4, 5].

#### 2.2 Použité chemikálie

##### 2.2.1 Souprava pro izolaci DNA (NucleoSpin Tissue kit)

Kit tvoří sada roztoků a elučních činidel (lyzační pufr T1, promývací pufr BW, promývací pufr B 5, eluční pufr BE), dále mikrozskumavky Eppendorf a kolony s filtrem. Jde o speciálně upravená skleněná vlákna, která tvoří filtr na dně malé zkumavky. Tato zkumavka je svou velikostí určena pro použití v 1,5 a 2,0 ml kyvetách. K aplikaci vzorku, promytí membrány a eluci nukleové kyseliny slouží odstředivá síla.

Metoda umožňuje rutinní izolaci a purifikaci nukleových kyselin. Získaný produkt vykazuje absorbanci při 260/280 nm > 1,8. Izolovaná DNA se může použít pro běžné molekulárně-biologické metody, např. PCR, transformace, stanovení se-

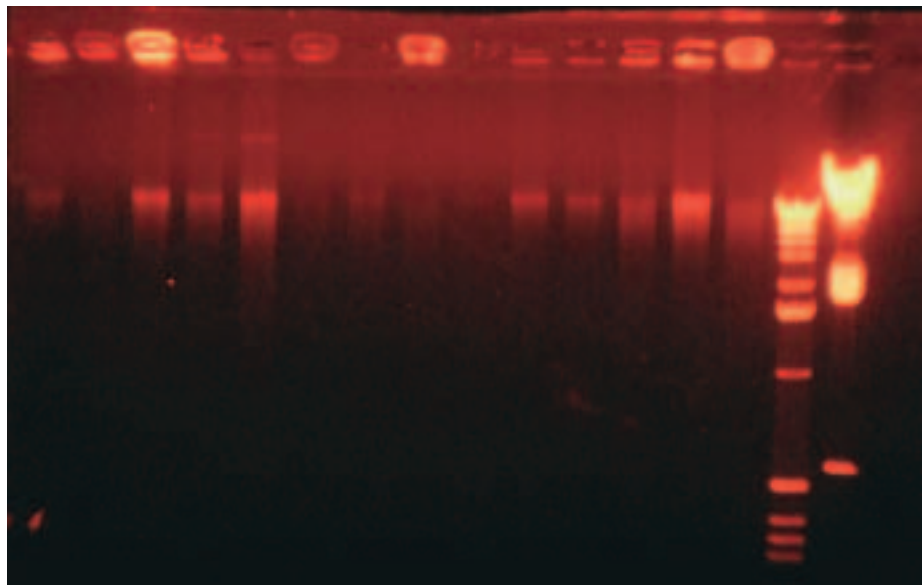
kvence a podobně. Kapacita membrány je limitována na cca 40 mg [6].

##### 2.2.2 Gelová elektroforéza

- Agaróza Serva pro DNA elektroforézu
- TBE pufr 10 x : Tris HCl  
Kyselina boritá  
EDTA
- Ethidium bromid (EtBr) o koncentraci 1  $\mu$ g/ml
- Srovnávací standard Lambda Hind III  
1 Kb DNA Ladder.

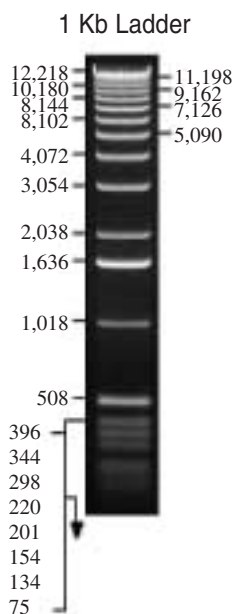
##### 2.2.3 BrewSave kit, určený pro amplifikaci DNA

BrewSave kit je navržený pro detekce G<sup>+</sup> bakterií v kvašených nápojích jako jsou saké nebo pivo, mimo jiné též pro *L. plantarum*. Tyto gram pozitivní bakterie z řady laktobacilů jsou tolerantní k alkoholu od 12 až do 16 %, kontaminují a kazí kvašené nápoje. Vyskytují se i ve zvětralém pivu. Kit je založen na metodě polymerázové řetězové reakce (PCR) a obsahuje specifické primery, Taq polymerasu, směs nukleotidů a PCR pufr. Primery (oligonukleotidy) dodané v tomto kitu jsou v zastoupení: jeden univerzální sensový a čtyři anti-sensové primery, které mohou generovat DNA fragmenty ze širokého spektra bakterií současně v jedné zkumavce. Z velikosti amplifikovaných fragmentů lze zjistit, o jaký druh rodu *Lactobacillus* se jedná. Velikosti fragmentů uvádí tab. 3.



Obr. 1 DNA vyizolovaná z bakterie *Lactobacillus*

1 KB ladder LambdaHind III



Obr. 2 1 Kb Ladder je vhodný pro odhad velikosti dvouřetězcové DNA s fragmenty od 75 párů bází do 12 000 párů bází. Ladder sestává z 12 fragmentů. Nejlepší detekce je dosažováno při použití 1% agarozového gelu s ethidium bromidem. Koncentrace použitého ladderu je 1 µg/µl v 10 µM Tris-HCl o pH 7,5.

## 2.3 Vlastní izolace DNA

- Odstředit 1 ml dobře narostlé kultury při 7500 min<sup>-1</sup>. Odstranit supernatant.
- Peletku resuspendovat v 170 µl pufru T1. Promíchat pomocí nasávání a vypouštění pipety (up and down).
- Přidat 25 µl proteinasy K a intenzivně protřepat na statické vibrační třepačce.
- Inkubovat při 56 °C po dobu minimálně 1–3 h nebo přes noc. Občas protřepat.
- Protřepat na statické vibrační třepačce. Přidat 200 µl pufru B3, intenzivně směst promíchat, inkubovat 10 min při 70 °C.
- Přidat 210 µl ethanolu a okamžitě protřepat na statické vibrační třepačce.
- Vložit NucleoSpin Tissue kolonu do sběrné 2 ml zkumavky. Vzorek odstředit 1 min při 10 000 min<sup>-1</sup>. Proteklý objem vylít a kolonu vložit do stejné sběrné zkumavky.
- Přidat 500 µl pufru BW a odstředit při 10 000 min<sup>-1</sup>. Proteklý objem odstranit.
- Přidat 600 µl pufru B5 a odstředit při 10 000 min<sup>-1</sup>. Proteklý objem odstranit.
- Naprázdno odstředit po dobu 3 minut. Tímto krokem se odstraní všechna rezidua ethanolu.
- Kolonu umístit do 1,5 ml mikrozukmavky Eppendorf, do kolony přidat 200 µl pufru BE předeřhátého na 70 °C, inkubovat 1 minutu při pokojové teplotě.
- Kolonu odstranit, zkumavku uzavřít a pečlivě popsat. Změřit koncentraci na spektrofotometru.

## 2.4 Měření koncentrace izolované DNA

Spektrofotometr Beckman DU–640, jednokyvetový, jednopaprskový spektrofotometr, využívající jak UV, tak VIS pa-

Tab. 1 Výsledky měření koncentrace izolované DNA pomocí spektrofotometru Beckman DU-600

Vzorek č.	Absorbance	Koncentrace ng/ml
1	0,3478	869,5
2	0,0825	206,25
6	0,1647	411,75
9	0,1027	256,75
10	0,0373	93,25
23	0,0882	220,5
25	0,5485	1371,25
30	0,1144	286
41	0,0755	188,75
46	0,0335	83,75
49	0,028	70
51	0,1198	299,5
63	0,0519	129,75
SK	0,0987	246,75

Tab. 2 Směs pro PCR

TakaRa Taq (5 jednotek/µl)	0,5 µl
10x PCR pufr	10 µl
dNTP směs (2,5 mM každé)	8 µl
Templát DNA	1 µg
Primer 1	0,2–1,0 µM
Primer 2	0,2–1,0 µM
voda	doplnit do 100 µl
celkem	100 µl

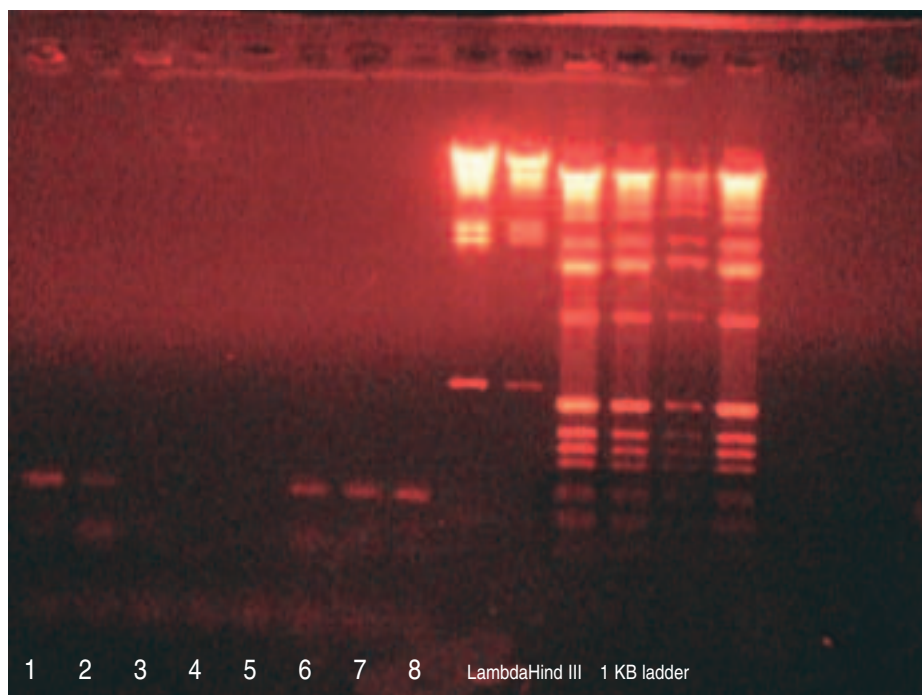
prsků, je speciálně upravený spektrofotometr pro měření absorbance DNA a RNA v minimálním objemovém množství. Jeho kyveta je vyrobena tak, že na určení absorbance postačí objem měřené kapaliny již 50 µl. Určení koncentrace je velmi důležité, protože z koncentrace určíme množství DNA, které bude dále používáno na PCR.

## 2.5 PCR – metoda polymerázové řetězové reakce

Principem PCR je mnohonásobné kopírování úseků DNA neboli amplifikace. Úsek genomové DNA, který chceme amplifikovat, je označen specifickými oligonukleotidy, tzv. primery. Jedná se většinou o oligomery s 16 až 30 jednotkami. Ty svým přesně daným pořadím nukleotidů dosedají na gDNA a od tohoto místa začíná amplifikace. Z hlediska postupu amplifikace jsou dva typy primerů – sensový, probíhající od 5' konce, a antisensový, který amplifikuje opačně, tj. 3' konce. V kitu, použitém k amplifikaci DNA z bakterie rodu *Lactobacillus*, jsou použity následující primery: sensový LAU 1 a čtyři antisensové LAC – 3R, LAF – 3R, LA1198, LAM – 3R. Vlastní amplifikace probíhá ve třech základních krocích v několika

cyklech, přičemž v každém cyklu se počet kopií zdvojnásobí. Jednotlivé kroky jsou:

- **Teplná denaturace** – slouží k rozvinutí dvoušroubovice DNA. Probíhá při teplotě 94 °C po dobu 30 sekund.
- **Připojení primerů (annealing)** – neboli navázání specifických primerů na odpovídající místo rozvinuté DNA, při-



Obr. 3 Gelová elektroforéza po PCR, jamky č. 1–8 + λHind III. + 1Kb Ladder

Tab. 3 Velikosti amplifikovaných fragmentů

	Reverzní primer	Velikost amplifikovaných fragmentů (párů bází – bp)
<i>Lactobacillus heterohiochii</i> S-14 <i>Lactobacillus heterohiochii</i> S-20	LAM – 3R	200
<i>Lactobacillus heterohiochii</i> H-1 <i>Lactobacillus heterohiochii</i> S-24	LA 1198	167
<i>Lactobacillus heterohiochii</i> S-34	LAM – 3R	20
<i>Lactobacillus heterohiochii</i> H-42	LA 1198	167
<i>Lactobacillus japonicum</i> H-7 <i>Lactobacillus plantarum</i>	LAF – 3R	163
<i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>rhannosus</i> <i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>casei</i>	LAC – 3R	175
<i>Lactobacillus</i> sp. <i>Lactobacillus brevis</i>	LAC – 3R	175
<i>Lactobacillus heterohiochii</i> S-14 <i>Lactobacillus heterohiochii</i> H-1A <i>Lactobacillus heterohiochii</i> S-37B <i>Lactobacillus heterohiochii</i> S-9A	LA 1198	170
<i>Lactobacillus heterohiochii</i> S-24 <i>Lactobacillus heterohiochii</i> S-42	LAM – 3R	200
S-7A H-34B	LAF – 3R	175
H-7 A-1	LAC – 3R 180	

Tab. 4 Číslo vzorků

jamka č.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
vzorek č.	1	2	6	9	10	23	25	30	41	46	49	51	63	SK	negat. kontr.	poz. kontr.

čemž je dodržena zásada o párování bází. Trvá 1 min při 55 °C.

- **Syntetická fáze (extenze)** – za přítomnosti DNA–polymerasy se kopíruje úsek vymezený navázanými primery. Extenze je prováděna při 72 °C po dobu 1 minuty [7, 8].

Tento cyklus je opakován a počet cyklů určuje výslednou koncentraci amplifikovaného úseku DNA. V běžné praxi se používá okolo 35 cyklů.

Po skončení cyklů se většinou provedou ještě další dva kroky: annealing po dobu 5 minut, který umožní dokončit syntézu všech vláken DNA, a posledním krokem bývá chlazení na 4 °C.

## 2.6 Gelová elektroforéza

Velikost a kvalita amplifikované DNA se hodnotí pomocí agarózy elektroforézy. Elektroforéza se využívá pro rychlost a rozlišovací schopnost. Zjišťuje se čistota preparátu, popřípadě množství a velikost DNA. Separace probíhá na základě elektrického náboje a také na základě molární hmotnosti udávané v bp („base pairs“). Jako detekční barvivo se nejčastěji používá ethidium bromid, který je detekován pomocí UV prosvícení. Lze ovšem použít i další barviva, jako jsou bromfenolová modř, akridinová oranž, xylen cyanol nebo bromkresolová zeleň [8, 9].

## 3 VÝSLEDKY A DISKUSE

### 3.1 Měření koncentrace

Po vyzolování DNA následovalo mě-

ření koncentrace všech čtrnácti vzorků. Jak vyplývá z tab. 1, rozsah koncentrací je v rozmezí od 70 do 1370 ng/μl. Rozdílná koncentrace může být způsobena tím, že *Lactobacillus* je gram pozitivní bakterie a má velice odolnou buněčnou stěnu. Pro příští izolaci by bylo vhodné přidat ve druhém kroku izolace k lyzačnímu pufru T1 další přísadek enzymu lysozymu nebo jiného podobného enzymu. Tím by mělo dojít k úplnému porušení buněčné stěny a zpřístupnění vnitřku buňky.

Z fotografie výsledku gelové elektroforézy na obr. 1 je patrné, že izolace DNA proběhla úspěšně a v každém vzorku je genomová DNA.

### 3.2 Zpracování výsledků polymerázové řetězové reakce

Po úspěšném vyzolování DNA byl použit BrewSave Kit pro amplifikaci úseku DNA, podle jehož velikosti by se měl určit přesný druh rodu *Lactobacillus*. V katalogu TaKaRa kitů lze zjistit množství látek přidávaných do reakce. Postup je zřejmý z tab. 2.

PCR cyklus byl nastaven tak, aby vykonával následující operace:

- Denaturace 94 °C po dobu 30 sekund
- Annealing 55 °C po dobu 1 minuty
- Extenze 72 °C
- 35 cyklů
- 5 minut 72 °C a poté ochlazení na 4 °C.

#### 3.2.1 BrewSave Kit

Na agarózy gelu je vidět amplifikovaná DNA (obr. 3 a 4) u vzorků 1, 2, 23, 25, 30, 41 o velikosti mezi 160 a 220

bp. Z tab. 3 lze určit, o jaký druh se pravděpodobně jedná. Podle velikosti by odpovídala nejlépe *Lactobacillus heterohiochii*, ale vzhledem k podobné velikosti PCR produktů je velmi těžké rozhodnout, o jaký druh rodu *Lactobacillus* by se jednalo. U zbývajících vzorků, tj. 6, 9, 10, 46, 49, 51, 63, SK, byla zřejmě nízká koncentrace templátu DNA, a tudíž DNA nebyla amplifikována.

Jako srovnávací standard byl použit 1 Kb DNA Ladder, u kterého velikosti jednotlivých fragmentů vystihuje obr. 2. Jamka č. 15 je negativní kontrola, do které nebyla dána žádná DNA jako templát. Jamka č. 16 je pozitivní kontrola, do které byly dány 2 μl DNA templátu z BrewSave kitu. Jak je patrné z gelu, i této kontrolní DNA bylo přidáno jako templát málo.

Tab. 4 ukazuje pořadí jednotlivých vzorků.

## 4 ZÁVĚR

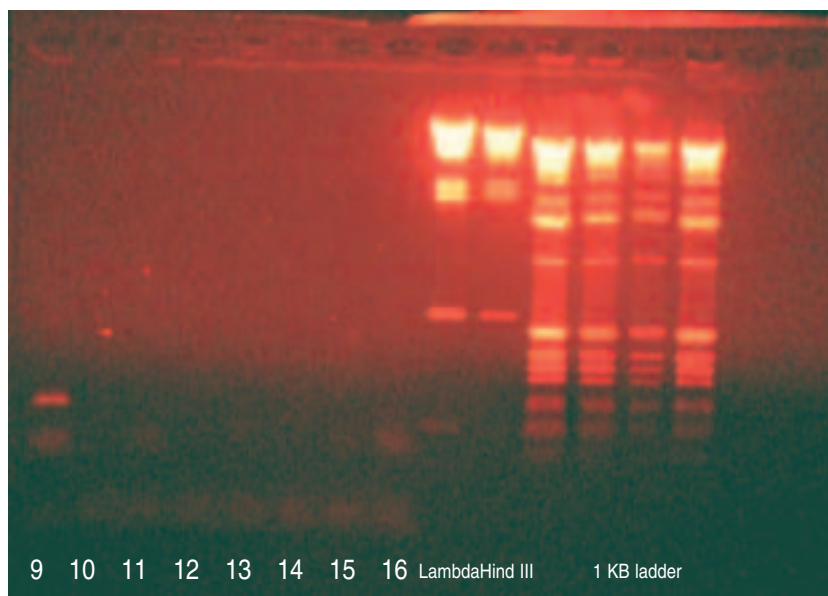
Cílem práce bylo provést izolaci a amplifikaci DNA ze 14 druhů rodu *Lactobacillus*. Pomocí kitu Nucleospin Tissue byla provedena izolace. Bylo získáno 14 vyzolovaných vzorků DNA. Tato DNA byla amplifikována pomocí BrewSave kitu. Počet se získat 6 PCR produktů DNA o velikosti amplifikovaných úseků 160 až 220 bp. Na základě těchto parametrů nebylo možné jednoznačně rozhodnout, o jaký přesný druh rodu *Lactobacillus* se jedná. Jestliže pro práci byl použit druh identifikovaný na základě biochemických testů pomocí API 50 CHL jako *Lactobacillus plantarum*, výsledky této metody tomu neodporují. Tento výsledek není ovšem zcela překvapivý, protože BrewSave kit je stavěn spíše na detekci celé této skupiny, nikoliv pro její druhové rozlišení.

**Děkujeme MUDr. Martě Kostroučkové, CSc. (Ústav dědičných metabolických poruch, 1. LF, UK Praha, Ke Karlovu 2, Praha 2) za odbornou pomoc a poskytnutí laboratorní techniky.**

## Literatura

- [1] Hollerová, I., Yansanjav, A., Němec, M.: Identifikace G<sup>+</sup> bakteriální kontaminace v pivovarovství. 31. Pivovarsko-sladařský seminář, 25.–26.9.2002.
- [2] Hampl, B.: Mikrobiologie, část 1., SNTL Praha 1964, s. 47.
- [3] EBC Analytica Microbiologica II, EBC Microbiology Group, 1992.
- [4] Hollerová, I., Poborská, P., Čabrádková, V., Říhová P.: Zjišťování škodlivosti vybraných druhů mikroorganismů pro hotové pivo. VÚPS Praha, 2002, s. 2.
- [5] Hollerová, I., Kohoutová, P., Čabrádková V.: Rychlá identifikace, průkaz a stanovení kontaminujících mikroorganismů. VÚPS Praha, 1998, s. 3.
- [6] Anonym: Guide – NucleoSpin Tissue kit, GenXpress Service & Vertrieb GmbH, 2002.





Obr. 4 Gelová elektroforéza po PCR, jamky č. 9.-16. +  $\lambda$ Hind III + 1Kb Ladder

- [7] Hollerová, I., Kubizniaková, P., Čabrádková V.: Zjišťování škodlivosti vybraných druhů mikroorganismů pro hotové pivo. VÚPS Praha, 2001, s. 6.  
[8] Manabu, S. et al.: A New and Rapid Method for Determination of Beer-Spoilage Ability of *Lactobacilli*. J. Am. Soc. Brew. Chem. **55**, 1997, s. 137.  
[9] Bauer-Hoffmann, R. et al.: Nucleic Acid Isolation and Purification, Boehringer Mannheim GmbH. Biochemica, 1998.

Lektoroval doc. Ing. Jan Šavel, CSc.  
Do redakce došlo 21. 3. 2003

**Vohánka, J. – Dostálek, P. – Fiala, J. – Hollerová, I.: Charakterizace bakteriální kontaminace v pivu metodou PCR.** Kvasny Prum. **49**, 2003, č. 11–12, s. 340–343.

Metoda PCR byla testována pro stanovení nejčastější bakteriální kontaminace v pivovarství – bakterií mléčného kvašení. Již dříve byla použita řada biochemických metod k charakterizaci izolátů bakterií rodu *Lactobacillus*. V této práci byla provedena izolace a amplifikace DNA ze 14 kmenů tohoto rodu. Pomocí metody PCR byly všechny izoláty potvrzeny jako příslušníci rodu *Lactobacillus*. Jednotlivé izoláty ale nebylo možno rozlišit druhově.

**Vohánka, J. – Dostálek, P. – Fiala, J. – Hollerová, I.: Characterization of Bacterial Contamination in Beer by PCR Method.** Kvasny Prum. **49**, 2003, No. 11–12, p. 340–343.

PCR method for detection of the most frequent bacterial contamination in brewing industry – lactic acid bacteria was tested. Many different biochemical methods have been used for characterization of bacterial isolates genus *Lactobacillus*. Genomic DNA from 14 different strains of this genus was isolated and characteristic part of DNA was amplified. All isolates were confirmed as *Lactobacillus* genus members by PCR methods. Isolates were not possible distinguish to the separate species.

**Vohánka, J. - Dostálek, P. - Fiala, J. - Hollerová, I.: Methode PCR zur Charakterisierung einer bakteriellen Kontamination des Bieres.** Kvasny Prum. **49**, 2003, Nr. 11–12, S. 340–343.

In der Brauindustrie stellen Milchbakterien die allerhäufigste mikrobiologische Kontamination dar. Schon früher zur Charakterisierung der Isolate von Bakterien der Gattung *Lactobacillus* wurden mehrere biochemischen Methoden angewandt. In diesem Artikel wird eine Isolation und Amplifikation der DNA von 14 Stämmen dieser Gattung beschrieben. Durch Methode PCR wurden alle gewonnene Isolate als Angehörige der Gattung *Lactobacillus*. Es wurde jedoch nicht möglich, die einzelne Isolate nach der Art weiter zu sortieren.

**Воганка, Й. – Досталек, П. – Фиала, Й. – Голлерова, И: Определение характеристики бактериального загрязнения пива методом PCR.** Kvasny Prum. **49**, 2003, No. 11–12, стр. 340–343.

Был выполнен тест метода PCR, как он подходит для определения молочных бактерий – самого частого бактериального загрязнения в пивоварении. Уже раньше был использован целый ряд биохимических методов для проведения характеристики изолятов бактерий расы *Lactobacillus*. В настоящей работе были выполнены изолирование и амплификация DNA из 14 видов настоящего рода. При помощи метода PCR были все изоляты подтверждены как принадлежащие к расе *Lactobacillus*. Однако отдельные изоляты нельзя было различить по их видам.

## Vzorkovací ventily



**keofitt**  
VACUUM HEADERS IN SERVIC SAMPLING



Příjemné a poklidné prožití  
vánočních svátků.

Hodně zdraví, štěstí,  
pohody a úspěchu v novém  
roce 2004

přeje

**Váš spolehlivý partner**



**REGOM  
INSTRUMENTS s.r.o.**

Brabcova 2 / 1159  
147 00 PRAHA 4

☎ 241 402 206, 241 433 151, 241 433 152  
☎ 241 400 290, 241 433 153  
✉ regom@regom.cz  
🌐 www.regom.cz