

DOI: 10.18832/kp2016033

Mikrobiologie pivovarské výroby – Bakterie mléčného kvašení a kultivační metody jejich detekce – II. část

Brewing microbiology – Lactic acid bacteria and cultivation methods of detection – part II

Petra KUBIZNIAKOVÁ, Dagmar MATOULKOVÁ

Oddělení mikrobiologie, Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, a.s. / Department of Microbiology, Research Institute of Brewing and Malting, PLC, Lípová 15, 120 44 Prague

e-mail: kubizniakova@beerresearch.cz, matoulkova@beerresearch.cz

Recenzovaný článek / Reviewed Paper

Kubizniaková, P., Matoulková, D., 2016: Mikrobiologie pivovarské výroby – Bakterie mléčného kvašení a kultivační metody jejich detekce – II. část. Kvasny Prum. 62, č. 11–12, s. 335–345

Publikace navazuje na rešeršní článek Mikrobiologie pivovarské výroby – Bakterie mléčného kvašení a kultivační metody pro jejich detekci (Matoulková a Kubizniaková, 2015: Kvasny Prum., 61(3): 76–88). Byl sledován růst souboru 53 kmenů bakterií rodu *Lactobacillus* a *Pediococcus* na ztužených kultivačních půdách, např. MRS agaru a jeho různých modifikacích, na půdě Raka-Ray, NBB, UBA atd. Do studie byly zahrnuty i některé tekuté půdy. Publikace obsahuje fotodokumentaci kolonií vybraných kmenů kultivovaných na různých ztužených půdách. Vyhodnocena byla reálná využitelnost půd v provozní pivovarské laboratoři.

Kubizniaková, P., Matoulková, D., 2016: Brewing microbiology – Lactic acid bacteria and cultivation methods of detection – part II. Kvasny Prum. 62, No. 11–12, pp.335–345

This publication is a sequel to the study Microbiology of brewing – Lactic acid bacteria and cultivation methods for their detection (Matoulková and Kubizniaková, 2015: Kvasny Prum. 61(3): 76–88). Growth was monitored in a set of 53 strains of *Lactobacillus* and *Pediococcus* on solidified culture media, e.g. MRS agar and its various modifications, the media Raka-Ray, NBB, UBA, etc. The study also included some liquid media. Photographic documentation is supplied of colonies of selected strains grown on different solid media. The real usefulness of the media in brewery plant laboratory was evaluated.

Kubizniaková, P., Matoulková, D., 2016: Mikrobiologie der Brauerherstellung – Milchsäurebakterien und Kultivationsmethoden zur ihren Detektion – II. Teil. Kvasny Prum. 62, Nr. 11–12, S. 335–345

Der Artikel ist eine Fortsetzung des Reschersche Artikels „Mikrobiologie der Brauerherstellung – Milchsäurebakterien und Kultivationsmethoden zur ihren Detektion“ (Matoulková a Kubizniaková, 2015: Kvasny Prum., 61(3): 76–88). Es wurde verfolgt das Wachstum der Datei von 53 Stämmen von Bakterien des Geschlechts rodu *Lactobacillus* und *Pediococcus* auf den verfestigten Kultivationsböden z. B. MRS Agar und seinen verschiedenen Modifikation, auf den Böden Raka-Ray, NBB, UBA usw. In der Experimentalarbeit wurden auch einige flüssige Böden angewandt. Der Artikel enthält eine Fotodokumentation der Kolonie von an den verschiedenen verfestigten Kultivationsböden kultivierten ausgesuchtesten Böden. Weiterhin wurde die reale Ausnutzung von diesen Böden im Betriebslab der Brauerei.

Klíčová slova: bakterie mléčného kvašení, kontaminace piva, kultivační metody, *Lactobacillus*, *Pediococcus*

Keywords: lactic acid bacteria, contamination of beer, cultivation methods, *Lactobacillus*, *Pediococcus*

☒ 1 ÚVOD

Studie navazuje na úvodní článek týkající se problematiky kultivačních metod detekce bakterií mléčného kvašení, který je literární rešerší zahrnující jednak základní charakteristiku této skupiny bakterií z hlediska rizika pro výrobu piva a jednak stručný přehled vývoje kultivačních médií. Z úvodního článku vyplynulo, že nejčastěji používanými půdami pro detekci bakterií mléčného kvašení jsou půdy MRS a NBB, a to jak ve svém původně navrhovaném základním složení, tak i různě modifikované. Z různých studií dále vyplývá, že žádné z kultivačních médií neumožňuje záchyt všech mléčných bakterií, které se mohou vyskytnout jako kontaminace piva (Matoulková a Kubizniaková, 2015).

Testovali jsme 13 různých agarových a 7 tekutých médií pro detekci bakterií mléčného kvašení. Soubor 53 kmenů bakterií mléčného kvašení byl zvolen na základě četnosti jejich výskytu a izolace z piva nebo z pivovarského provozu a samozřejmě i dostupností ve sbírkách mikroorganismů.

Cílem naší práce bylo posouzení rychlosti nárůstu mléčných bakterií na/v různých kultivačních médiích a fotodokumentace vzhledu kolonií vybraných kmenů na různých ztužených půdách. Pro tyto účely jsme vybrali kultivační půdy, které jsou snadno dostupné pro běžnou pivovarskou mikrobiologickou laboratoř, a to jak půdy dodávané komerčně (např. MRS, Raka-Ray), tak půdy, které lze snadno připravit (PDM, ABD, B-MRS). Některé půdy doporučené staršími studiemi nebyly do této práce zahrnuty, např. z důvodu složité přípravy půdy či nestandardnosti vstupních surovin (Original Nakagawa médium), popřípadě jejich složení obsahovalo nebezpečnou látku

☒ 1 INTRODUCTION

This study is a sequel of a preceding article on the issue of cultivation methods for detection of lactic acid bacteria, which was a literature review covering both the basic characteristics of this group of bacteria in terms of their risk for beer production and also a brief overview of the development of culture media. The article pointed out that the media most often used for detection of lactic acid bacteria are MRS and NBB media, both in their originally proposed basic composition and variously modified. Various studies also show that none of the culture media ensures the capture of all the lactic acid bacteria which may occur as contamination of beer (Matoulková and Kubizniaková, 2015).

We tested 13 different agar and 7 liquid media for detecting lactic acid bacteria. A set of 53 strains of lactic acid bacteria was chosen based on the frequency of their occurrence and isolation from beer or brewery operation and of course also availability in the collections of microorganisms.

The aim of our study was to assess the rate of increase of lactic acid bacteria on/in different culture media and provide photographic documentation of the appearance of colonies of selected strains on various solid media. For these purposes, we chose culture media which are readily available for routine brewery microbiological laboratory, both commercially supplied ones (e.g. MRS, Raka-Ray) and media that can be easily prepared (PDM, ABD, B-MRS). Some media recommended by earlier studies were not included in this study, e.g. because of a complex medium preparation or non-standard input raw materials (Original Nakagawa medium) or because their

(např. azid sodný v půdě KL-2B). Podobně nebyly do studie zahrnuty půdy, jejichž použití je v literatuře diskutováno jako nespolehlivé (sacharosový agar).

☒ 2 MATERIÁL A METODY

2.1 Složení a příprava kultivačních médií

Základním médiem pro kultivaci mléčných bakterií před vyočkováním na testované půdy byl de Mann Rogosa Sharp (MRS) agar, který byl připraven z dehydratované půdy dodávané komerčně (Merck).

Ztužená média

- a) **WLD** (Wallerstein Laboratories Differential) **agar (WLD)**: byl připraven z komerčně dostupné dehydratované půdy WLN dle návodu výrobce (Oxoid): rozpuštěním 75 g dehydratované půdy v 1000 ml destilované vody a sterilizací 15 minut při 121 °C. Před nalitím půdy na misky se asepticky přidá 25 mg aktidionu (Sigma) na 1000 ml půdy. Hotová půda má modrozelené zbarvení.
- b) **Deanovo médium** (Dean's medium) **agar (DM)**: byl připraven rozpuštěním a smícháním 5 g kvasničného extraktu (Merck) a 15 g bakteriologického agaru (Oxoid) v 1000 ml světlého výčepního piva. Půda se sterilizuje 20 minut při 121 °C a hotová má žlutohnědou barvu.
- c) **Williamsonovo médium L** (Williamson's medium L) **agar (WM)**: 1000 ml prokvašené sladiny bylo přefiltrováno a byl z ní odvařen alkohol (objem byl zredukován přibližně na polovinu). Po ochlazení bylo k médiu přidáno a rozpuštěno 10 g kvasničného extraktu (Merck), 10 g maltosy (Merck), 10 g kaseinu (Difco), 2 g jaterního extraktu (HiMEDIA), 20 g bakteriologického agaru (Oxoid). Takto získaný roztok byl doplněn destilovanou vodou na výsledný objem 1000 ml. Půda se sterilizuje 20 minut při 121 °C a hotová má světle žlutou barvu.
- d) **MRS agar (MRSa)**: byl připraven z dehydratované půdy dle návodu výrobce (Merck): rozpuštěním 68,2 g dehydratované půdy v 1000 ml destilované vody a sterilizací 20 minut při 121 °C. Hotová půda má žlutohnědou barvu.
- e) **VLB-S7 agar (VLB)**: byl připraven rozehrátím komerčně dodané agarové půdy (VLB Berlin, Döehler) ve vodní lázni. Půda má tmavě zelené zbarvení.
- f) **UBA** (Universální pивní agar; Universal Beer Agar) **agar (UBA)**: byl připraven z dehydratované půdy dle návodu výrobce (Oxoid): rozpuštěním 62 g dehydratované půdy v 750 ml destilované vody a přidáním 250 ml světlého výčepního piva. Půda se sterilizuje 10 minut při 121 °C a hotová má žlutohnědou barvu.
- g) **Raka-Ray agar (RR)**, byl připraven z komerčně dostupné dehydratované půdy dle návodu výrobce (Oxoid): rozpuštěním 77,1 g dehydratované půdy v 1000 ml destilované vody a sterilizací 15 minut při 121 °C. Hotová půda má hnědé zbarvení.
- h) **NBB** (Nachweismedium für Bierschädliche Bakterien) **agar (NBB-A)**: byl připraven z komerčně dodávané dehydratované půdy (NBB-P) dle návodu výrobce (Döhler): rozpuštěním 120 g dehydratované půdy a 15 g bakteriologického agaru (Oxoid) v 1000 ml destilované vody a sterilizací 10 minut při 115 °C. Hotová půda má červené zbarvení.
- i) **B-MRS agar (B-MRSa)**: byl připraven rozpuštěním a smícháním 55 g MRS broth (Merck), 15 g bakteriologického agaru (Oxoid), 250 ml světlého výčepního piva a 750 ml destilované vody. Půda se sterilizuje 20 minut při 121 °C a hotová má žlutohnědou barvu.
- j) **PDM** (*Pediococcus damnosus* medium) **agar (PDMa)**: půda byla připravena rozpuštěním a smícháním 40 g MRS broth (Merck), 0,3 g L-cystein-hydrochloridu (Sigma), 250 ml světlého výčepního piva, 15 g bakteriologického agaru (Oxoid) a 750 ml destilované vody. Půda se sterilizuje 20 minut při 121 °C a hotová má světle žlutou barvu.
- k) **BMB** (Barney-Miller Brewery) **agar (BMB)**: byl připraven rozpuštěním a smícháním 15 g tomatového bujónu (Fluka), 15 g maltosy (Merck), 10 g glukosy (Merck), 5 g polypeptonu (Oxoid), 2 g masového výtažku (Bio-Rad), 0,2 g L-cystein-hydrochloridu (Sigma), 3 g octanu draselného (Penta), 0,5 g kyseliny jablečné (Fluka), 0,5 g Tween 80 (Sigma), 15 g bakteriologického agaru (Oxoid), 250 ml piva a 750 ml destilované vody. Půda se sterilizuje 15 minut při 121 °C a hotová má žlutou barvu.
- l) **ABD** (Advanced Beer-spoiler Detection) **agar (ABDa)**: byl připraven rozpuštěním a smícháním 2,6 g MRS broth (Merck), 15 g bakteriologického agaru (Oxoid), 0,5 g octanu sodného (Sigma), 1000 ml světlého výčepního piva. Půda se sterilizuje 20 minut při 121 °C a hotová má žlutohnědou barvu.

composition contained hazardous substances (e.g. sodium azide in the KL-2B medium). Other media not included in the study were those whose use is discussed in the literature as unreliable (sucrose agar).

☒ 2 MATERIALS AND METHODS:

2.1 Composition and preparation of culture media

The basic medium for the cultivation of lactic bacteria prior to inoculation of the test medium was de Mann Rogosa Sharp (MRS) agar, which was prepared from commercially supplied dehydrated medium (Merck).

Solid media:

- a) **WLD** (Wallerstein Laboratories Differential) **agar (WLD)** was prepared from commercially available dehydrated WLN medium according to manufacturer's instructions (Oxoid) by dissolving 75 g of dehydrated medium in 1000 ml of distilled water and sterilizing it for 15 minutes at 121 °C. Before pouring the medium on the dish 25 mg actidione was aseptically added (Sigma) per 1000 ml of medium. Finished medium has a blue-green color.
- b) **Dean's agar medium (DM)** was prepared by dissolving and mixing 5 g of yeast extract (Merck) and 15 g bacteriological agar (Oxoid) in 1000 ml of light draft beer. The medium was sterilized for 20 minutes at 121 °C; finished medium has a tan color.
- c) **Williamson's L agar medium (WM)**: 1000 ml fermented wort was filtrated, and alcohol was boiled off (the volume was reduced to approximately half). After cooling, the medium was supplied with 10 g of yeast extract (Merck), 10 g maltose (Merck), 10 g of casein (Difco), 2 g of liver extract (HiMEDIA) and 20 g bacteriological agar (Oxoid). The resulting solution was made up with distilled water to a final volume of 1000 ml. The medium was sterilized for 20 minutes at 121 °C; finished medium has a pale yellow color.
- d) **MRS agar (MRSa)** was prepared from dehydrated medium according to manufacturer's (Merck) instructions by dissolving 68.2 g of dehydrated medium in 1000 ml of distilled water and sterilizing it for 20 minutes at 121 °C. Ready medium has a tan color.
- e) **VLB-S7 agar (VLB)** was prepared by warming up commercially supplied agar (VLB Berlin, Döehler) in a water bath. The medium has a dark green color.
- f) **UBA** (Universal Beer Agar) was prepared from dehydrated medium according to the manufacturer's instructions (Oxoid) by dissolving 62 g of dehydrated medium in 750 ml of distilled water and 250 ml of draft beer. The medium was sterilized for 10 minutes at 121 °C and finished medium has a tan color.
- g) **Raka-Ray agar (RR)** was prepared from commercially available dehydrated medium according to the manufacturer's instructions (Oxoid) by dissolving 77.1 g of dehydrated medium in 1000 ml of distilled water and sterilizing it for 15 minutes at 121 °C. Ready medium is brown.
- h) **NBB** (Nachweismedium für Bierschädliche Bakterien) **agar (NBB-A)** was prepared from commercially available dehydrated medium (NBB-P) according to the manufacturer's instructions (Döhler) by dissolving 120 g of dehydrated medium and 15 g bacteriological agar (Oxoid) in 1000 ml distilled water and sterilizing it for 10 minutes at 115 °C. Ready medium is red in color.
- i) **B-MRS agar (B-MRSa)** was prepared by dissolving and mixing 55 g MRS broth (Merck), 15 g bacteriological agar (Oxoid), 250 ml of draft beer and 750 ml of distilled water. The medium was sterilized for 20 minutes at 121 °C and finished medium has a tan color.
- j) **PDM** (*Pediococcus damnosus* medium) **agar (PDMa)** medium was prepared by dissolving and mixing 40 g MRS broth (Merck), 0.3 g L-cysteine hydrochloride (Sigma), 250 ml of draft beer, 15 g bacteriological agar (Oxoid) and 750 ml of distilled water. The medium was sterilized for 20 minutes at 121 °C and finished medium has a pale yellow color.
- k) **BMB** (Barney Miller Brewery) **agar (BMB)** was prepared by dissolving and mixing 15 g tomato broth (Fluka), 15 g maltose (Merck), 10 g glucose (Merck), 5 g polypeptone (Oxoid), 2 g meat extract (Bio-Rad), 0.2 g L-cysteine hydrochloride (Sigma), 3 g potassium acetate (Penta), 0.5 g malic acid (Fluka), 0.5 g Tween 80 (Sigma), 15 g bacteriological agar (Oxoid), 250 ml of beer and 750 ml of distilled water. The medium was sterilized for 15 minutes at 121 °C and finished medium has a yellow color.

m) **MRS agar s katalasou (K-MRS)**: byl připraven MRS agar standardním způsobem (od. d)). Před vlastním naočkováním kultur/vzorku bylo na povrch půdy v Petriho miskách asepticky aplikováno 0,1 ml sterilního roztoku katalasy (Sigma) v destilované vodě tak, aby koncentrace enzymu byla 800 U/misku.

Tekuté půdy

- a) **MRS bujón (MRS)**: byl připraven z dehydratované půdy dle návodu výrobce (Merck): rozpuštěním 52,2g dehydratovaného MRS bujónu v 1000ml destilované vody a sterilizací 20 minut při 121 °C. Hotová půda má žlutohnědou barvu.
- b) **HLP médium (Hsu's *Lactobacillus* / *Pediococcus* médium) (HLP)**: byl připraven z dehydratované půdy HLP dle návodu výrobce (Merck) rozpuštěním 70g dehydratované půdy v 1000ml destilované vody a sterilizací 2,5 minuty při 100 °C. Hotová půda má světle žluté zbarvení a po vychladnutí je lehce ztužená.
- c) **NBB (Nachweismedium für Bierschädliche Bakterien) bujón (NBB-B)**: byl připraven z komerčně dodávané dehydratované půdy (NBB-P) dle návodu výrobce (Döhler): rozpuštěním 120g dehydratované půdy v 1000ml destilované vody a sterilizací 10 minut při 115 °C. Hotová půda má červené zbarvení.
- d) **B-MRS bujón (B-MRS)**: byl připraven rozpuštěním a smícháním 55g dehydratovaného MRS bujónu (Merck), 250 ml světlého výčepního piva a 750ml destilované vody. Půda se sterilizuje 20 minut při 121 °C a hotová má žlutohnědé zbarvení.
- e) **S-MRS**: byl připraven rozpuštěním a smícháním 55g dehydratovaného MRS bujónu (Merck), 4g Na₂CO₃ (Lachema), 0,25g L-cystein hydrochloridu (Sigma), 250ml světlého výčepního piva a 750ml destilované vody. Půda se sterilizuje 20 minut při 121 °C a hotová má hnědou barvu.
- f) **PDM bujón (*Pediococcus damnosus* médium) (PDMb)**: půda byla připravena rozpuštěním a smícháním 40g dehydratovaného MRS bujónu (Merck), 0,3g L-cystein-hydrochloridu (Sigma), 250ml světlého výčepního piva a 750ml destilované vody. Půda se sterilizuje 20 minut při 121 °C a hotová má světle žlutou barvu.
- g) **ABD bujón (ABDb)**: byl připraven rozpuštěním a smícháním 2,6g dehydratovaného MRS bujónu (Merck), 0,5g octanu sodného (Sigma), 1000ml světlého výčepního piva. Půda se sterilizuje 20 minut při 121 °C a hotová má žlutohnědou barvu.

Na některých půdách (MRS agar, Raka-Ray, atd.) mohou růst i kvasinky, plísně a některé gramnegativní bakterie. Pro jejich inhibici se běžně využívá antibiotikum aktidion (Šavel, 1980). V naší studii jsme pracovali s čistými kulturami bakterií a média proto inhibitory neobsahovala. Při přípravě půd pro detekci mléčných bakterií v reálných vzorcích je přidavek inhibitorů nutný, v závislosti na složení konkrétní půdy.

2.2 Mikroorganismy a kultivační podmínky

Kmeny bakterií, které byly použity v této práci, pocházejí ze Sbírký pivovarských mikroorganismů VÚPS (RIBM), Německé sbírky mikroorganismů a buněčných kultur (DSMZ) v Braunschweigu (Německo) a České sbírky mikroorganismů (CCM) v Brně. Seznam kmenů, jejich označení a původ jsou uvedeny v tab. 1. Před vyočkováním na testované půdy byly kmeny inkubovány na MRS agaru při teplotě 28 °C po dobu 72 hodin.

Příprava bakteriální suspense

Suspense bakterií byly připraveny rozmícháním 1 kolonie ve sterilním fyziologickém roztoku, s výslednou koncentrací buněk přibližně 3x10⁸/ml. Suspense byly naředěny tak, aby na Petriho miskách narostlo počítatelné množství kolonií (tj. 10-50). Tekuté půdy byly zaočkovány naředěnou suspensí tak, aby výsledná koncentrace buněk byla 10–50 na 1 ml média. Inkubace probíhala při teplotě 28 °C po dobu 7 dní a každý den byl vyhodnocován a dokumentován nárust kultur. U kultur na ztužených půdách byla posuzována rychlost tvorby viditelných kolonií (tj. velikost kolonií cca 0,1 mm); po 5 dnech kultivace byly kolonie změřeny posuvným měřítkem. U tekutých médií byla vyhodnocována tvorba zákalu/sedimentu v čase.

☒ 3 VÝSLEDKY A DISKUZE

Na souboru 53 kmenů mléčných bakterií bylo porovnáváno 13 různých živných médií, z toho u 6 půd (MRS, NBB, BMRS, PDM, BMB, ABD) byla testována jejich pevná i tekutá verze, u 7 (WLD, DM, WM, VLB, UBA, R-R, K-MRS) pouze pevná varianta a 2 půdy

l) **ABD (Advanced Detection of Beer-spoiler) agar (ABDa)** was prepared by dissolving and mixing 2.6g MRS broth (Merck), 15g bacteriological agar (Oxoid), 0.5g sodium acetate (Sigma) and 1000ml draft beer. The medium was sterilized for 20 minutes at 121 °C and finished medium has a tan color.

m) **MRS agar with catalase (K-MRS)** was prepared in a standard manner (see point d)). Prior to inoculation the cultures/sample the surface medium in a Petri dish was aseptically supplied with 0.1 ml sterile solution of catalase (Sigma) in distilled water so that the concentration of the enzyme was 800 U/dish.

Liquid Media:

- a) **MRS broth (MRS)** was prepared from dehydrated medium as prescribed by the manufacturer (Merck) by dissolving 52.2g of dehydrated MRS broth in 1000ml of distilled water and sterilizing it for 20 minutes at 121 °C. Ready medium has a tan color.
- b) **HLP medium (Hsu's *Lactobacillus*/*Pediococcus* medium) (HLP)** was prepared from dehydrated HLP medium according to manufacturer's instructions (Merck) by dissolving 70g of dehydrated medium in 1000ml of distilled water and sterilizing it for 2.5 minutes at 100 °C. Ready medium has a pale yellow color and after cooling is slightly thickened.
- c) **NBB (Nachweismedium für Bierschädliche Bakterien) broth (NBB-B)** was prepared from commercially available dehydrated medium (NBB-P) according to the manufacturer's instructions (Döhler) by dissolving 120g of dehydrated medium in 1000ml of distilled water and sterilizing it for 10 minutes at 115 °C. Ready medium is red in color.
- d) **B-MRS broth (MRS-B)** was prepared by dissolving and mixing 55g of dehydrated MRS broth (Merck), 250ml of draft beer and 750ml of distilled water. The medium was sterilized for 20 minutes at 121 °C and finished medium has a tan color.
- e) **S-MRS** was prepared by dissolving and mixing 55g of dehydrated MRS broth (Merck), 4g Na₂CO₃ (Lachema), 0.25g L-cysteine hydrochloride (Sigma), 250ml of draft beer and 750ml of distilled water. The medium was sterilized for 20 minutes at 121 °C and finished medium has a brown color.
- f) **PDM broth (*Pediococcus damnosus* medium) (PDMb)** medium was prepared by dissolving and mixing 40g of dehydrated MRS broth (Merck), 0.3g L-cysteinehydrochloride (Sigma), 250ml of draft beer and 750ml of distilled water. The medium was sterilized for 20 minutes at 121 °C and, when finished, it has a pale yellow color.
- g) **ABD broth (ABDb)** was prepared by dissolving and mixing 2.6g dehydrated MRS broth (Merck), 0.5g sodium acetate (Sigma) and 1000ml of draft beer. The medium was sterilized for 20 minutes at 121 °C and finished medium has a tan color.

Some media (MRS agar, Raka-Ray, etc.) can support the growth of yeasts, molds and certain Gram-negative bacteria. The antibiotic actidione is commonly used for their inhibition (Šavel, 1980). Here we worked with pure cultures of bacteria and the media therefore did not contain inhibitors. The addition of inhibitors is required when preparing media for detecting lactic bacteria in real samples, depending on the specific composition of the medium.

2.2 Microorganisms and culture conditions

Strains of bacteria that were used in this study originate from the Collection of Brewing Microorganisms of the RIBM, the German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (DSMZ) in Braunschweig (Germany) and the Czech Collection of Microorganisms (CCM) in Brno. The list of the strains, their designations and origin are listed in Table 1. Prior to inoculation in the test medium the strains were incubated on MRS agar at 28 °C for 72 hours.

2.3 Preparation of bacterial suspensions

Suspensions of bacteria were prepared by stirring one colony in sterile saline, with a final concentration of approximately 3x10⁸ cells/ml. The suspension was diluted so as to give a countable number (i.e. 10–50) of grown colonies on Petri dishes. Liquid media were inoculated with diluted suspensions so that the final cell concentration was from 10 to 50 per 1 ml of medium. Incubation was conducted for 7 days at 28 °C and the growth of the cultures was evaluated and documented each day. The rate of appearance of visible colonies (i.e. colony size of about 0.1 mm); was assessed in cultures on solid media; after 5 days of culture, the colonies were measured with a caliper. Haze formation/sediment appearance over time was evaluated in cultures in liquid media.

Tab. 1 Seznam kmenů mléčných bakterií / Table 1 List of lactic strains

Druh / Species	Kmen * / Strain *	Původ / Origin
<i>L. amylolyticus</i>	DSM 11664 ^T	Okyselená sladina / acidified beer wort
<i>L. backii</i>	DSM 18080 ^T	Zkažené pivo / spoiled beer
<i>L. brevis</i>	RIBM 2-4	Pivovarský provoz / brewery plant
	RIBM 2-16	Zkažené pivo / spoiled beer
	RIBM 2-20	Zkažené pivo / spoiled beer
	RIBM 2-27	Zkažené pivo / spoiled beer
	RIBM 2-32	Zkažené pivo / spoiled beer
	RIBM 2-40	Zkažené pivo / spoiled beer
	RIBM 2-42	Pivo / beer
	RIBM 2-56	Pivo / beer
	RIBM 2-68	Zkažené pivo / spoiled beer
	RIBM 2-69	Zkažené pivo / spoiled beer
	RIBM 2-70	Zkažené pivo / spoiled beer
	RIBM 2-72	Pivo / beer
	RIBM 2-78	Zkažené pivo / spoiled beer
	RIBM 2-85	Zkažené pivo / spoiled beer
RIBM 2-111	Pivovarský provoz / brewery plant	
<i>L. buchneri</i>	RIBM 2-9	Pivovarský provoz / brewery plant
	CCM 1819 ^T	Rajčatová dužina / tomato pulp
<i>L. casei/paracasei</i>	RIBM 2-26	Zkažené pivo / spoiled beer
	RIBM 2-30	Zkažené pivo / spoiled beer
	RIBM 2-41	Pivovarský provoz / brewery plant
	RIBM 2-46	Pivovarský provoz / brewery plant
	RIBM 2-51	Pivo / beer
	RIBM 2-59	Pivo / beer
	RIBM 2-71	Pivo / beer
	RIBM 2-77	Pivovarský provoz / brewery plant
	RIBM 2-79	Pivovarský provoz / brewery plant
	RIBM 2-95	Pivovarský provoz / brewery plant
RIBM 2-113	Zkažené pivo / spoiled beer	
<i>L. coryniformis</i> subsp. <i>coryniformis</i>	CCM 4618 ^T	Siláž / silage
<i>L. curvatus</i>	CCM 7558 ^T	Mléko / milk
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i>	CCM 7191 ^T	Kyselý rmut / sour mash
<i>L. fermentum</i>	CCM 7192 ^T	Fermentovaná řepa / fermented beet
<i>L. fructivorans</i>	CCM 7700	Není známo / not known
<i>L. hilgardii</i>	CCM 7701	Není známo / not known
<i>L. lindneri</i>	DSM 20690 ^T	Zkažené pivo / spoiled beer
<i>L. malefermentans</i>	DSM 5705 ^T	Pivo / beer
<i>L. paracollinoides</i>	DSM 15502 ^T	Pivovarské prostředí / brewery environment
<i>L. plantarum</i>	RIBM 2-29	Zkažené pivo / spoiled beer
	RIBM 2-89	Pivovarský provoz / brewery plant
	RIBM 2-90	Pivovarský provoz / brewery plant
	RIBM 2-91	Pivovarský provoz / brewery plant
<i>P. acidilactici</i>	CCM 3449	Není známo / not known
<i>P. claussenii</i>	DSM 14800 ^T	Zkažené pivo / spoiled beer
<i>P. damnosus</i>	CCM 3453 ^T	Pivovarské kvasnice / brewing yeast
	CCM 3454	Pivo / beer
<i>P. dextrinicus</i>	CCM 3457 ^T	Siláž / silage
<i>P. inopinatus</i>	CCM 3451 ^T	Pivovarské kvasnice / brewing yeast
	CCM 3452	Pivo / beer
<i>P. parvulus</i>	CCM 3450 ^T	Siláž / silage
<i>P. pentosaceus</i>	CCM 7796 ^T	Sušené pivovarské kvasnice / dried brewing yeast
	CCM 3447	Pivovarské kvasnice / brewing yeast

* CCM – Česká sbírka mikroorganismů, Brno, Česká republika / Czech Collection of Microorganisms, Brno, Czech Republic; DSM – Německá sbírka mikroorganismů a buněčných kultur, Braunschweig, Německo / German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Braunschweig, Germany; RIBM – Sběrka pivovarských mikroorganismů, VÚPS, a.s., Praha / Collection of The Research Institute of Brewing and Malting, Prague, Czech Republic

Tab. 2 Souhrnné výsledky růstu bakterií na pevných půdách / Table 2 Summary results on growth rate of bacteria on solid media

Rod / Genus	Kultivační médium / Culture media												
	WLD	DM	WM	MRS	VLB	UBA	R-R	NBB	B-MRS	PDM	BMB	ABD	K-MRS
Počet kmenů (%) / Number of strains (%)													
<i>Lactobacillus</i>	95.3	0	72.1	100	95.3	90.7	95.3	95.3	97.7	95.3	97.7	0	100
<i>Pediococcus</i>	70	0	70	100	100	80	90	90	100	100	100	0	100
Doba inkubace (hodina) / Incubation time (hours)*													
<i>Lactobacillus</i>	67	-	90	58	71	73	74	57	62	61	65	-	43
<i>Pediococcus</i>	113	-	89	86	98	120	120	93	91	91	98	-	58
Velikost kolonií po 5 dnech kultivace (mm) / Colony size after 5 days of cultivation (mm)													
<i>Lactobacillus</i>	1.44	-	1.92	2.68	1.8	1.43	1.53	2.18	2.18	1.8	1.68	-	2.2
<i>Pediococcus</i>	1.08	-	1.28	1.65	1.52	0.91	0.96	1.46	1.28	1.33	1.18	-	1.3

* doba, po které mohou být viditelné kolonie vyhodnoceny / Time after which the number of visible colonies can be evaluated

(HLP, SMRS) se používají pouze tekuté. Výsledky jsou uvedené v tab. 2 a 3.

3.1 Rychlost nárůstu mléčných bakterií na ztužených půdách

Souhrnné výsledky schopnosti a rychlosti růstu laktobacilů a pediokoků a průměrné hodnoty velikosti kolonií po 5 dnech inkubace na jednotlivých půdách jsou uvedeny v tab. 2.

Z 13 pevných živných médií rostly všechny kmeny mléčných bakterií pouze na dvou půdách – na základní variantě půdy MRS a na její modifikaci K-MRS. MRS je komplexní médium obsahující glukosu jako zdroj uhlíku, vyvinuté pro izolaci, kultivaci a uchování širokého spektra mléčných bakterií (de Man et al., 1960; Casey a Ingledew, 1981). MRS agar je doporučován třemi hlavními pivovarskými asociacemi – European Brewery Convention (2011), American Society of Brewing Chemists (Crumplen et al., 1991) a Brewery Convention of Japan (1999).

Modifikace základní MRS půdy urychlují nebo zvyhodňují růst pivoškodících mléčných bakterií. Půda K-MRS obsahuje enzym katalasu, jejíž funkcí je ochrana organismů před oxidativním stresem – její přítomnost v růstovém médiu tak zabraňuje inhibici růstu anaerobních/fakultativně anaerobních bakterií vlivem fotooxidace složek půdy (Hoffman et al., 1983). Na ostatních pevných půdách narostlo 90,7 až 97,7% laktobacilů, na Williamsonově médiu L (WM) rostlo pouze 72,1% kmenů. Rychlost růstu laktobacilů na jednotlivých půdách byla vyrovnaná, průměrná doba detekce byla 65 h, kolonie byly dobře viditelné na všech půdách průměrně do 3 dnů, pouze u WM byla průměrná doba detekce delší než 89 hodin. Nejrychlejší růst vykazovaly laktobacily na MRS půdě s enzymem katalasa (K-MRS), a to 43 hodin.

Všechny kmeny rodu *Pediococcus* rostly na půdách MRS, VLB, B-MRS, PDM, BMB a K-MRS, nejméně (70%) jich vyrostlo na půdách WLD a WM. Průměrná doba růstu pediokoků byla 96 hodin, nejrychleji rostly na půdě K-MRS (58 hodin) a nejpomalejší růst byl pozorován na půdách UBA a R-R, kde byly první kolonie detekovány průměrně po 5 dnech kultivace.

Na Deanově médiu (DM) a půdě ABD, jejichž základem je minimálně obohacené pivo, nenarostl žádný kmen mléčných bakterií.

3.2 Velikost kolonií

Po 5 dnech kultivace byla proměřena velikost kolonií, oba rody mléčných bakterií tvořily největší kolonie na základní půdě MRS, na které byla průměrná velikost kolonií laktobacilů 2,7 mm a pediokoků 1,6 mm. Průměrná velikost kolonií kmene *L. brevis* RIBM 2-20 se pohybovala v intervalu od 2,2 mm na WLD půdě až po 5,1 mm na MRS agaru, u kmene *L. brevis* RIBM 2-56 od <1 mm na půdách WM a UBA až 4,0 mm na NBB. V rozmezí od <1 mm na půdách WLD a R-R do 4,1 mm na půdě MRS rostl *L. curvatus* (CCM 7558) nebo od 1,4 mm na WLD a VLB do 4,5 mm na MRS *L. plantarum* (RIBM 2-89). Vyrovnanou velikost kolonií na jednotlivých půdách měly například některé kmeny *L. casei/paracasei*, v rozmezí od <1 mm na WLD, VLB, UBA a R-R do 1,8 mm na MRS rostl kmen RIBM 2-71 nebo od <1 mm na UBA a R-R do 1,9 mm na MRS kmen RIBM 2-51. Menší rozdíly ve velikosti kolonií vykazovaly pediokoky.

3.3 Vyhodnocení nárůstu mléčných bakterií na jednotlivých půdách

WLD agar je jednou z nejstarších půd využívaných pro průkaz mléčných bakterií ve vzorku piva. Je to komplexní růstové médium

3 RESULTS AND DISCUSSION

In a set of 53 strains of lactic acid bacteria, we compared 13 different nutrient media, of which six media (MRS, NBB, BMRS, PDM, BMB, ABD) were tested in their solid and liquid version, 7 (WLD, DM, WM, VLB, UBA, RR, K-MRS), only in the solid version and 2 media (HLP, SMRS) were used only in the liquid version. The results are listed in Tables 2 and 3.

3.1 The growth rate of lactic acid bacteria on solid media

Summary results on the ability and growth rate of lactobacilli and pediococci and the average value of the size of colonies after 5 days of incubation at various media are shown in Table 2.

Of the 13 solid nutrient media, all strains of lactic acid bacteria grew only on two media – the basic variant of MRS medium and its modification K-MRS. MRS is a complex medium containing glucose as a carbon source, developed for the isolation, cultivation and maintenance of a broad spectrum of lactic acid bacteria (de Man et al., 1960; Casey and Ingledew, 1981). MRS agar is recommended by three main brewer associations – European Brewery Convention (2011), American Society of Brewing Chemists (Crumplen et al., 1991) and Brewery Convention of Japan (1999).

Modifications of basic MRS medium accelerate or favor the growth of beer-spoiling lactic acid bacteria. Medium K-MRS contains the enzyme catalase, whose function is to protect the organisms against oxidative stress – its presence in the growth medium prevents inhibition of the growth of anaerobic/facultative anaerobic bacteria due to photo-oxidation of medium components (Hoffman et al., 1983). The other solid media supported the growth of 90.7 to 97.7% lactobacilli, on Williamson L medium (WM) grew only 72.1% of strains. The rate of growth of lactobacilli on various media was similar, the average detection time being 65 hours. On average, colonies were clearly visible on all media within 3 days; the average detection time was longer than 89 hours only on WM medium. The fastest growth (43 hours) was recorded with lactobacilli on MRS medium with catalase (K-MRS).

All strains of the genus *Pediococcus* grew on MRS, VLB, B-MRS, PDM, BMB and K-MRS media, the least (70%) had grown on media WLD and WM. Average growth time of pediococci was 96 hours, the fastest growth (58 hours) was recorded on K-MRS medium and the slowest growth was observed on media UBA and R-R, the first colonies being detected on average after 5 days of culture.

No strains of lactic acid bacteria grew on Dean's medium (DM) and ABD medium whose base is minimally enriched beer.

3.2 Colony size

Colony size was measured after 5 days of culture. Two genera of lactic bacteria formed colonies on the most basic MRS medium, the average size of the colonies of lactobacilli being 2.7 mm and 1.6 mm with pediococci. The average size of the colonies of *L. brevis* strain RIBM 2-20 ranged from 2.2 mm on WLD medium to 5.1 mm on MRS agar, in the *L. brevis* strain RIBM 2-56 it was from <1 mm on WM and UBA media to 4.0 mm in NBB. The size of *L. curvatus* (CCM 7558) colonies ranged from <1 mm on WLD and YY media to 4.1 mm on the MRS medium, that of *L. plantarum* (RIBM 2-89) ranged from 1.4 mm on WLD and VLB to 4.5 mm on MRS. About equal colony size on various media was exhibited by some strains of *L. casei paracasei*.

s glukosou jako zdrojem uhlíku a bromkresolovou zelení jako indikátorem změny pH. WLD lze připravit z komerčně dodávané dehydratované půdy WLN s přísadkou aktidionu pro inhibici růstu kvasinek. Za anaerobních růstových podmínek umožňuje detekci bakterií mléčného kvašení (Green a Grey, 1950). Ze souboru 43 kmenů rodu *Lactobacillus* jich na WLD půdě narostlo 95,3%, pouze *L. paracollinoides* a *L. malefermentans* na tomto médiu nerostly. Z 10 bakterií rodu *Pediococcus* nerostly na WLD 3 kmeny (*P. damnosus* CCM 3453 a CCM 3454, *P. inopinatus* CCM 3452). Rozdíl v rychlosti růstu laktobacilů a pediokoků byl na WLD agaru poměrně významný – průměrná doba první detekce laktobacilů byla 67 hodin, což je rychlost srovnatelná s růstem na ostatních půdách, u pediokoků 113 hodin, což je třetí nejpomalejší růst, po UBA a R-R (viz dále). Velikost narostlých kolonií patřila k nejmenším (obr. 1) v porovnání s koloniemi na ostatních půdách, u laktobacilů byla průměrná velikost kolonie 1,4 mm u pediokoků 1,1 mm.

Deanovo médium (DM) a Williamsonovo médium L (WM) jsou starší kultivační půdy pro detekci mléčných bakterií, které v dnešních provozních pivovarských laboratořích nejsou používány. Podle autorů (Dean, 1957; Williamson, 1959) a starších srovnávacích studií (Ault a Woodward, 1965; Casey a Ingledew, 1981) vykazovaly velmi dobré výsledky, proto jsme je zařadili do naší studie. WM agar byl vyhodnocen jako srovnatelný s půdou WLD a umožňoval vyšší záchyt laktobacilů z piva než Deanovo médium (Ault a Woodward, 1965; Casey a Ingledew, 1981). V naší studii na DM agaru, jehož základem je pivo, nevyrostl žádný kmen mléčných bakterií. Na WM agaru narostlo pouze 72,1% laktobacilů a 70% pediokoků. Rychlost růstu byla u obou rodů také podobná, průměrná doba detekce prvních kolonií byla za 90 hodin, tato rychlost růstu je pro laktobacily nejpomalejší a pro pediokoky naopak jedna z nejvyšších.

MRS agar umožnil růst všem kmenům mléčných bakterií včetně poměrně problematického druhu *L. paracollinoides*. Tato bakterie



Obr. 1 Kolonie *Lactobacillus brevis* RIBM 2-111 na půdě MRS (vlevo) a WLD po 5 dnech inkubace / Fig. 1. Colonies of *Lactobacillus brevis* RIBM 2-111 after 5 days of incubation on MRS (left) and WLD agar

se špatně pomnožovala na tuhých půdách (rostla pouze na MRS a K-MRS), v tekutých médiích je její schopnost růstu srovnatelná s ostatními kmeny rodu *Lactobacillus*. Průměrná detekce prvních kolonií laktobacilů byla 58 hodin a u rodu *Pediococcus* 86 hodin. Z laktobacilů nejpomaleji na půdě MRS rostly kmeny *L. backii* a *L. paracollinoides* (5 dní), z pediokoků *P. damnosus* (CCM 3453^T) – 6 dní. Kolonie *P. dextrinicus* a *P. pentosaceus* (CCM 7796) byly detekovány již po dvou dnech inkubace. Průměrná velikost kolonií laktobacilů na MRS agaru byla 2,7 mm a pediokoků 1,7 mm – největší kolonie ze všech testovaných ztužených půd. Rozmezí velikostí kolonií se pohybovala v rozmezí od 1,4 mm u *L. casei/paracasei* (RIBM 2-59) či *L. delbrueckii* až po 5,1 mm u *L. brevis* (RIBM 2-20). Velikost kolonií pediokoků se pohybovala v rozmezí od 1 mm (*P. claussenii*) do 2,6 mm (*P. pentosaceus* CCM 7796^T).

Půda **VLB-S7** byla původně navržena pro izolaci a identifikaci pediokoků (Emeis, 1969), ale rostou na ní i laktobacily (Casey a Ingledew, 1981). Půda se používá zejména v Německu, je komerčně dostupná a dodávána je pouze hotová ve ztužené podobě, připra-

Colony size of strain RIBM 2-71 ranged from <1mm on WLD, VLB, UBA and RR to 1.8mm on MRS, that of strain RIBM 2-51 from <1mm on UBA and RR to 1.9mm on MRS. *Pediococci* showed minor differences in the size of the colonies.

3.3 Evaluation of the growth of lactic acid bacteria on various media

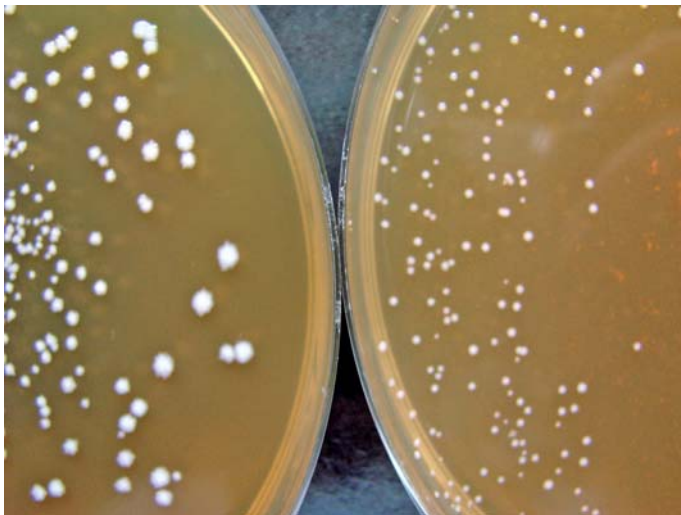
WLD agar is one of the oldest media used for the detection of lactic bacteria in beer samples. It is a complex growth medium with glucose as carbon source and bromocresol green as an indicator of pH change. WLD can be prepared from commercially available dehydrated medium WLN by addition of actidione that inhibits the growth of yeast. Under anaerobic growth conditions it allows the detection of lactic acid bacteria (Green and Grey, 1950). From a group of 43 *Lactobacillus* strains, 95.3% grew on WLD medium while *L. paracollinoides* and *L. malefermentans* did not grow on this medium. Of the 10 bacteria of genus *Pediococcus* 3 strains did not grow on WLD (*P. damnosus* CCM 3453 and CCM 3454, *P. inopinatus* CCM 3452). The difference in the rate of growth of lactobacilli and pediococci on WLD agar was quite significant – the average time of the first detection of lactobacilli was 67 hours, which is comparable to the growth in other media, with pediococci it was 113 hours, which is the third slowest growth after that on UBA and RR (see further). The size of the grown colonies was among the smallest (Fig. 1) compared with the colonies on other media. The average colony size of lactobacilli was 1.4 mm, that of pediococci 1.1 mm.

Dean's medium (DM) and Williamson L medium (WM) are older culture media for detecting lactic acid bacteria, which are no longer used in today's operating brewery laboratories. According to the authors (Dean, 1957; Williamson, 1959) and earlier comparative studies (Ault and Woodward, 1965; Casey and Ingledew, 1981) they showed very good results and we therefore included them in our study. WM agar was evaluated as comparable with WLD medium and permitted a higher capture of beer lactobacilli than Dean medium (Ault and Woodward, 1965; Casey and Ingledew, 1981). In our study no strains of lactic acid bacteria grew on DM agar which is beer-based. WM agar allowed the growth of a mere 72.1% lactobacilli and 70% pediococci. The growth rate for both genera was also similar, the average detection time of the first colony being under 90 hours. This rate of growth is the slowest for lactobacilli but one of the highest for pediococci.

MRS agar allowed the growth of all the strains of lactic acid bacteria, including the quite problematic species *L. paracollinoides*. This bacterium is poorly reproducible on solid medium, growing only on MRS and MRS-K, while in liquid media its ability to grow is comparable with other *Lactobacillus* strains. The average detection time of first lactobacilli colonies was 58 hours, and 86 hours for the genus *Pediococcus*. The slowest growth on MRS medium among lactobacilli was recorded for strains of *L. backii* and *L. paracollinoides* (5 days), among pediococci for *P. damnosus* CCM 3453^T (6 days). Colonies of *P. dextrinicus* and *P. pentosaceus* (CCM 7796) were detected already after two days of incubation. The average colony size of lactobacilli on MRS agar was 2.7 mm and that of pediococci 1.7 mm – the largest colonies on all tested solid media. The size of the colonies ranged from 1.4 mm in *L. casei/paracasei* (RIBM 2-59) or *L. delbrueckii* to 5.1 mm in *L. brevis* (RIBM 2-20). The colony size of pediococci ranged from 1 mm (*P. claussenii*) to 2.6 mm (*P. pentosaceus* CCM 7796^T).

VLB-S7 medium was originally designed for the isolation and identification of pediococci (Emeis, 1969), but lactobacilli also grow on it (Casey and Ingledew, 1981). The medium is mainly used in Germany; it is commercially available and is supplied only in the finished solidified form, ready to warm-up and pour into the dish. In our study it allowed the growth of 95.3% strains of lactobacilli and all the strains of pediococci. The growth rate of *Lactobacillus* bacteria was rather slow, colonies were detected after approximately 71 hours and the growth rate of pediococci on this medium was average (98 hours). The size of the colonies of lactobacilli reached average values of 1.8 mm, with pediococci it was the second largest – 1.5 mm.

Universal Beer Agar (UBA) allows the detection of beer-spoiling lactic and acetic acid bacteria and yeast (Kozulis and Page, 1968). Addition of actidione can eliminate the growth of yeast and anaerobic culture conditions suppress the growth of acetic bacteria; the medium will then allow the determination of lactic acid bacteria adapted to growth in beer. The ability of lactic acid bacteria to grow on universal beer agar UBA was one of the lowest, 90.7% lactobacilli and 80% pediococci grew on the medium. The growth rate and colony size was also one of the smallest (Fig. 2). The average time of first



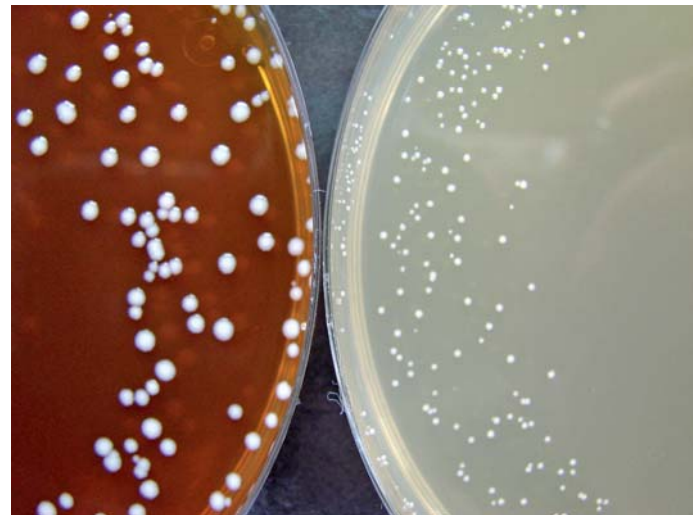
Obr. 2 Kolonie *Lactobacillus brevis* RIBM 2-111 na půdě MRS (vlevo) a UBA po 5 dnech inkubace / Fig. 2 Colonies of *Lactobacillus brevis* RIBM 2-111 after 5 days of incubation on MRS (left) and UBA agar

vená k rozehrání a nalití na misky. V naší studii umožňovala růst 95,3% kmenům laktobacilů a všem kmenům pediokoků. Rychlost růstu bakterií rodu *Lactobacillus* patřila k pomalejším, kolonie byly detekovány přibližně po 71 hodin, rychlost růstu bakterií *Pediococcus* byla na této půdě průměrná (98 hodin). Velikost kolonií laktobacilů dosahovala průměrných hodnot 1,8 mm, u pediokoků byla druhá největší – 1,5 mm.

Universální pивní agar (UBA) umožňuje detekci pивu škodících mikroorganismů – mléčných a octových bakterií a kvasinek (Kozulis a Page, 1968). Přídavkem aktidionu lze eliminovat růst kvasinek a anaerobní podmínky kultivace potlačí růst octových bakterií – půda pak umožní stanovení mléčných bakterií adaptovaných na růst v pивu. Schopnost růstu mléčných bakterií na universálním pивním agaru UBA byla jedna z nejnižších, na médiu rostlo 90,7% laktobacilů a 80% pediokoků. Také rychlost růstu a velikost kolonií byly jedny z nejmenších (obr. 2). Průměrná doba první detekce kolonií u laktobacilů byla 73 hodin a pediokoků 120 hodin. Průměrné velikosti kolonií 1,4 mm u laktobacilů a 0,9 mm pro pediokoky jsou nejmenší pro oba rody na všech kultivačních půdách.

Raka-Ray (R-R) je komplexní médium obsahující maltosu a fruktosu, bez obsahu pивa, navržené pro detekci mléčných bakterií (Saha et al., 1974). Výsledky kultivací na půdě byly velmi podobné s výsledky kultivací na UBA – rychlost nárůstu viditelných 74 hodin u laktobacilů a 120 hodin u pediokoků. Velikosti kolonií byly také jedny z nejmenších – 1,5 mm pro laktobacily a pod 1 mm pro pediokoky. Záchyt mléčných bakterií byl o něco vyšší než na půdě UBA – 95,3% laktobacilů a 90% kmenů pediokoků. Ve srovnávací studii Caseye a Ingledewa (1981) na R-R mléčné bakterie rostly rychleji a tvořily větší kolonie nežli na půdách UBA a WLD. V naší studii nerostly bakterie na půdě R-R výrazně rychleji než na UBA a WLB, kolonie laktobacilů byly větší, u pediokoků srovnatelné s UBA a WLD. Podle Jespersena a Jakobsena (1996) není R-R dostatečně selektivní vůči bakteriím, které nekazí pivo, současně má menší záchyt pивu škodících mléčných bakterií, a proto má spíše informativní význam. Půda je i přesto doporučována Evropskou pivovarskou konvencí (European Brewery Convention; EBC) k rutinním kontrolám pивa a pivovarského provozu.

Půda **NBB** byla původně vyvinuta Backem (1980) jako základní nespecifické médium. Její složení bylo později různě modifikováno tak, aby poskytla rychlejší výsledky a umožnila větší záchyt pивu škodících mikroorganismů (Back et al., 1984; Nishikawa a Kohgo, 1985). Půda NBB je dodávána v různých variantách – hotová, připravená k rozlití na Petriho misky (NBB-agar) nebo do vyšetřovaných lahví na stanovení mléčných bakterií v pивu (NBB-C, koncentrát), dehydratovaná (NBB-P), a pro účely inkubace vzorků odebraných stěrem (NBB-B-AM). Kindraka (1987) uvádí, že modifikované NBB médium je více specifické a má větší záchyt pивu škodících mikroorganismů než UBA. Crumplen et al. (1988) naopak vyhodnotili původní i modifikované NBB médium jako méně účinné než UBA. V naší studii **NBB** půda poskytovala velmi dobré výsledky. Z laktobacilů na NBB sice nerostly *L. paracollinoides* a *L. backii*, z pediokoků *P. damnosus* (CCM 3454), ale průměrná rychlost růstu pro oba rody byla vysoká a také velikost kolonií patřila k největším (obr. 3). Průměrná doba



Obr. 3 Kolonie *Lactobacillus brevis* RIBM 2-111 na půdě NBB (vlevo) a BMB po 5 dnech inkubace / Fig. 3 Colonies of *Lactobacillus brevis* RIBM 2-111 after 5 days of incubation on NBB (left) and BMB agar

detection of the colonies of lactobacilli was 73 hours, with pediococci 120 hours. The average colony size was 1.4 mm in lactobacilli and 0.9 mm in pediococci, i.e. the smallest for both genera in all culture media.

Raka-Ray (R-R) is a beer-free complex medium containing maltose and fructose, designed for detecting lactic acid bacteria (Saha et al., 1974). The results of cultivation on medium were very similar with the results of culture on UBA – the rate of appearance of visible colonies in lactobacilli was 74 hours, for pediococci 120 hours. Colony sizes were also among the smallest – 1.5 mm for lactobacilli and below 1 mm for pediococci. Detection of lactic acid bacteria was somewhat higher than on UBA medium – 95.3% in lactobacilli and 90% in pediococci. In a comparative study Ingledew and Casey (1981) lactic bacteria grew faster and formed larger colonies on R-R than on UBA and WLB media. In our study, the bacteria did not grow on R-R significantly faster than on UBA and WLB. The colonies of lactobacilli were larger than on UBA and WLD, those of pediococci were comparable. According to Jespersen and Jakobsen (1996), R-R is not sufficiently selective against beer-nonspoiling bacteria. At the same time, it shows a lower capture of beer-spoiling lactic acid bacteria, and the results are therefore rather preliminary. The medium is nevertheless recommended by the European Brewery Convention (EBC) for routine checks of beer and brewing operation.

NBB medium was originally developed by Back (1980) as a basic nonspecific medium. Its composition was later variously modified so as to provide faster results and allow for greater capture of beer-spoiling microorganisms (Back et al., 1984; Nishikawa and Kohgo, 1985). NBB medium is supplied in different variants – ready, prepared for pouring on Petri dishes (NBB-agar) or in testing bottles for the determination of lactic acid bacteria in beer (NBB-C concentrate), dehydrated (NBB-P), and a version for incubating collected swab samples (NBB-B-AM). Kindraka (1987) reported that the modified NBB medium is more specific and has higher detection of beer-spoiling microorganisms than UBA. On the other hand, Crumplen et al. (1988) evaluated both the original and modified NBB medium as less effective than the UBA. In our study, NBB medium gave very good results. Although the lactobacilli *L. paracollinoides* and *L. backii* and the pediococcus *P. damnosus* (CCM 3454) did not grow on NBB, the average growth rate for both genera was high and the size of colonies was among the largest (Fig. 3). The average time of first detection of colonies of lactobacilli was 57 hours, which is the second highest rate after growth on MRS medium. Most lactobacilli were clearly detected after three days of culture at the latest, only *L. lindneri* after 4 days and *L. amyolyticus* after 6 days. Pediococci were slightly below the average value of 93 hours; the slowest growing on the medium was *P. damnosus* (CCM 3453) that was detected after 7 days of cultivation. The average colony size, 2.2 mm for lactobacilli and 1.5 mm for pediococci was the second largest.

B-MRS medium is one of the modifications of MRS medium. When preparing 1000 ml of culture broth, 250 ml of beer is added to MRS (Holzapfel, 1992). B-MRS medium showed excellent results, the only species that did not grow on it was *L. paracollinoides*. The

první detekce kolonií kmenů rodu *Lactobacillus* byla 57 hodin, což je po růstu na MRS půdě druhá nejvyšší rychlost. Většina laktobacilů byla jednoznačně detekována nejpозději po třech dnech kultivace, pouze *L. lindneri* po 4 dnech a *L. amylolyticus* po 6 dnech. U rodu *Pediococcus* to bylo lehce pod průměrnou hodnotou 93 hodin, nejpomaleji na této půdě rostl *P. damnosus* (CCM 3453), který byl detekován po 7 dnech kultivace. Průměrné velikosti kolonií 2,2 mm pro laktobacily a 1,5 mm pro pediokoky byly druhé největší.

Půda **B-MRS** je jednou z modifikací MRS půdy, kde při přípravě 1000 ml kultivační půdy je k základní MRS přidáno 250 ml piva (Holzapfel, 1992). Půda B-MRS vykazovala výborné výsledky, na půdě nerostl pouze druh *L. paracollinoides*. Průměrná doba detekce prvních kolonií byla 62 hodin pro laktobacily a 91 hodin pro pediokoky, což je pro oba rody nadprůměrná rychlost. Velikost kolonií laktobacilů byla nadprůměrná (2,2 mm) u pediokoků průměrná (1,3 mm).

PDM je půda navržena pro průkaz bakterií druhu *P. damnosus*. Vychází půdou je B-MRS se sníženými koncentracemi všech složek a nižším pH (Taskila et al. 2010b). Na půdě rostou všechny pediokoky použité ve studii a široké spektrum laktobacilů (95,3 %), což je v souladu s výsledky studie Taskily et al. (2010b). Rychlost růstu kmenů byla stejná jako u předcházející půdy B-MRS, a to 61 / 91 h pro laktobacily / pediokoky, což je nadprůměrná rychlost pomnožení. Velikost kolonií byla pro oba rody průměrná. Průměrná velikost kolonií 1,8 mm u laktobacilů byla nejmenší mezi půdami, jejichž základem je MRS agar.

Na americké půdě **BMB** (Barney-Miller Brewery) rostly všechny kmeny mléčných bakterií kromě *L. paracollinoides*, průměrná doba detekce kolonií laktobacilů byla 65 hodin, pediokoků 98 hodin. Velikost kolonií byla u obou rodů lehce podprůměrná, 1,7 mm u laktobacilů a 1,2 mm u pediokoků. Porovnání velikosti kolonií kmene *L. brevis* RIBM 2-111 na půdě MRS a BMB je zobrazeno na obr. 4. Půda obsahuje tomatový džus, maltosu, pivo a L-cystein-HCl (Barney et al., 1990). Crumplen et al. (1991) ve své srovnávací studii uvádí, že mléčné bakterie rostou rychleji na BMB než na MRS, NBB a KOT.

Na médiu **ABD**, které bylo navrženo pro průkaz a kultivaci obtížně kultivovatelných pivo-kazících bakterií *L. lindnerii* a *L. paracollinoides* (Suzuki et al., 2008b) a je stejně jako Deanovo médium připraveno z piva s minimálním přídatkem živin, nerostl jediný kmen mléčných bakterií. Půda ABD je založená na bázi piva s přídatkem malého množství MRS, octanem sodným (inhibice gramnegativních bakterií) a aktidionem (inhibice kvasinek). ABD půda podle autorů (Suzuki et al., 2008) umožňuje průkaz piva škodících bakterií ve vzorku, které jsou hůře detekovatelné běžnými půdami jako je MRS, BMB, Raka-ray a NBB-A. Oproti tomu Taskila et al. (2010a) prezentují porovnáni půdy ABD s B-MRS na 19 reálných vzorcích piva a nedoporučují ji k rutinní mikrobiologické kontrole piva a pivovarského provozu.

Na **K-MRS** agaru, na jehož povrch byl aplikován enzym katalasa, rostly všechny kmeny mléčných bakterií a to výrazně rychleji v porovnání s ostatními kultivačními médii. Průměrná detekce prvních kolonií byla kratší než 2 dny (43 hodin) u laktobacilů a 58 hodin u pediokoků. Velikost kolonií byla pro oba rody nadstandardní, průměr 2,2 mm u laktobacilů byl po základní půdě MRS druhý největší a 1,3 mm pro pediokoky byl lehce nadprůměrný.

Ve studii Denga et al. (2014) přídatkem katalasy v koncentraci 800 U na miskou urychlil dobu detekce kolonií *L. plantarum*, *L. acetotolerans* a *P. damnosus* až o několik dní.

3.4 Růst mléčných bakterií v tekutých médiích

Souhrnné výsledky růstu rodů *Lactobacillus* a *Pediococcus* v tekutých médiích jsou prezentovány v tab. 3. Zaznamenáván byl počet dní potřebných k vytvoření viditelného zákalu či sedimentu. V polotuhém HLP médiu bakterie tvořily zákal podobný chomáčku vaty (obr. 5). Všechny kmeny rostly v médiích MRS, B-MRS a PDM. V půdách NBB-B a HLP rostlo 100% pediokoků a 95,3% laktobacilů. V půdě S-MRS se pomnožilo nejméně mléčných bakterií, a to přibližně 77% kmenů laktobacilů a 60% pediokoků. Stejně jako u tuhé podoby půdy ABD nevyrostl žádný kmen ani v její tekuté verzi.

Průměrná doba detekce růstu laktobacilů a pediokoků v testovaných půdách je velmi podobná, 51 hodin pro laktobacily a 49 hodin pro pediokoky. Bakterie rodu *Lactobacillus* rostly nejrychleji v půdě HLP, kde byly detekovány průměrně po 36 hodinách a v PDM, kde byla doba první detekce 46 hodin. Nejpomaleji se pomnožovaly v půdě S-MRS, kde doba detekce byla téměř 3 dny (67 hodin). U pediokoků byla průměrná doba detekce růstu v půdách MRS, PDM a HLP pod 2 dny a to 46 hodin. Nejpomaleji rostly pediokoky v půdě B-MRS, kde byla průměrná doba první detekce 58 hodin.

V tekuté půdě **MRS** rostly nejrychleji kmeny druhu *L. plantarum* a některé pediokoky (*P. acidilactici*, *P. claussenii*, *P. dextrinicus*,

average time for the early detection of colonies was 62 hours for the lactobacilli and 91 hours for pediococci, which is an above average speed for both genera. The size of colonies of lactobacilli was above average (2.2 mm) for pediococci it was average (1.3 mm).

PDM is a medium designed for the detection of *P. damnosus*. Initial medium is B-MRS with reduced concentrations of all the components and a lower pH (Taskila et al., 2010b). The medium allows the growth of all pediococci used in the study and a wide range of lactobacilli (95.3%), which is consistent with the results of Taskila et al. (2010b). The growth rate of the strains was the same as in the previous B-MRS medium and was 61 / 91 h for lactobacilli/pediococci, which is above the average speed of propagation. Colony size was average for both genders. The average colony size of 1.8 mm with lactobacilli was the smallest among MRS agar-based media.

The American **BMB** medium (Barney Miller Brewery) allowed the growth of all strains of lactic acid bacteria except *L. paracollinoides*, the average detection time of lactobacilli colonies was 65 hours, for pediococci 98 hours. Colony size in both genera was slightly below the average, 1.7 mm for the lactobacilli and 1.2 mm for pediococci. Comparison of colony size of *L. brevis* strain RIBM 2-111 on MRS and BMB media is shown in Fig. 4. The medium contains tomato juice, maltose, beer, and L-cysteine-HCl (Barney et al., 1990). Crumplen et al. (1991) attested in their comparative study that lactic acid bacteria grow faster on BMB than on MRS, NBB and KOT.

ABD medium, which was designed for the detection and cultivation of poorly cultivable beer-spoiling bacteria *L. lindnerii* and *L. paracollinoides* (Suzuki et al., 2008b) and, like Dean's medium, is prepared from beer with minimal addition of nutrients, did not support the growth of any strain of lactic acid bacteria. ABD medium is based on beer with the addition of small quantities of MRS, sodium acetate (inhibition of Gram negative bacteria) and actidione (inhibition of yeast). According to the authors (Suzuki et al., 2008) ABD medium allows determination of beer-spoiling bacteria which are harder to detect by conventional media such as MRS, BMB, Raka-Ray and NBB-A. In contrast, Taskila et al. (2010a) compared ABD with B-MRS on 19 real samples of beer and recommended it for routine microbiological control of beer and brewing operation.

K-MRS agar, the surface of which was treated with the catalase, allows the growth of all strains of lactic acid bacteria, which is significantly faster compared with other culture media. The average for the early detection of colonies was less than 2 days (43 hours) for lactobacilli and 58 hours for pediococci. Colony size for both genera was above-average, 2.2 mm diameter for lactobacilli, second largest after basic MRS medium, and 1.3 mm for pediococci, which was slightly above average.

In a study of Deng et al. (2014) the addition of catalase at a concentration of 800 U/dish accelerated the detection of colonies of *L. plantarum*, *L. acetotolerans* and *P. damnosus* by up to several days.



Obr. 4 Kolonie *Lactobacillus brevis* RIBM 2-111 na půdě MRS (vlevo) a BMB po 5 dnech inkubace / Fig. 4 Colonies of *Lactobacillus brevis* RIBM 2-111 after 5 days of incubation on MRS (left) and BMB agar



Obr. 5 Nárůst bakterií *L. brevis* RIBM 2-111 ve zkumavce s polotuhým médiem HLP / Fig. 5 Growth of *L. brevis* RIBM 2-111 in a test tube with semi-solid medium HLP

P. pentosaceus), které byly detekovatelné již za 24 hodin kultivace. Kmeny *L. brevis* a *L. casei/paracasei* (izoláty z pivovarských provozů) narostly po přibližně 2 dnech kultivace. Nejpomaleji v této půdě rostly druhy *L. backii*, *L. lindneri*, které jsou považovány za velmi škodlivé, a dále *L. amylolyticus*, u kterých byl pozorován nárůst až po 4 dnech kultivace (pozn. – škodlivost jednotlivých druhů mléčných bakterií je popsána v první části studie, Matoulková a Kubizniaková, 2015). V porovnání s tuhou variantou půdy byl růst mléčných bakterií rychlejší, u laktobacilů průměrně o 7 hodin, a u pediokoků byl v tekutém médiu nárůst pozorován dříve o 41 hodin.

V polotuhém médiu HLP byla většina kmenů laktobacilů detekovatelná po dvou dnech kultivace, pouze kmen *L. malefermentans* po 4 a *L. amylolyticus* až po 7 dnech. Růst pediokoků byl rozpoznatelný do 3 dnů od zaočkování.

Průměrná doba detekce laktobacilů na půdě NBB-A a NBB-B je téměř stejná 57 (55) hodin, pediokoky rostou stejně jako v tekuté MRS rychleji, průměrná doba detekce jejich růstu se zkrátila o 43 hodin na 50. V tekuté variantě půdy NBB se pomnožovaly všechny kmeny rodu *Pediococcus*, a 95,3% kmenů rodu *Lactobacillus*.

V modifikované půdě MRS s přidavkem piva (B-MRS) se pomnožovaly všechny kmeny mléčných bakterií, rychlost růstu laktobacilů

3.4 Growth of lactic acid bacteria in liquid media

Summary results on the growth of *Lactobacillus* and *Pediococcus* genera in liquid media are given in Table 3. The number of days needed to produce a visible turbidity or sediment was recorded. In the semi-solid HLP medium, bacteria formed a cotton wool-like haze (Fig. 5). All strains were grown in MRS, B-MRS and PDM media. NBB-B and HLP media supported the growth of 100% pediococci and 95.3% lactobacilli. The propagation of lactic acid bacteria was the lowest in S-MRS medium, approximately 77% of strains of lactobacilli and 60% of pediococci. Like in the solid form of ABD medium, no strains grew in its liquid version.

Average time of detection of growth of lactobacilli and pediococci in tested media is very similar, 51 hours for lactobacilli and 49 hours for pediococci. *Lactobacillus* bacteria grew the fastest in HLP medium, on which they were detected on average after 36 hours, and in PDM where the time of first detection was 46 hours. The growth was the slowest in S-MRS medium where the detection time was nearly 3 days (67 hours). The average detection time of growth of pediococci in media MRS, PDM and HLP was under 2 days – 46 hours. The slowest growth of pediococci was recorded in B-MRS medium, where the average time for the first detection was 58 hours.

The liquid MRS medium supported the fastest growth of strains of *L. plantarum* and some pediococci (*P. acidilactici*, *P. clausenii*, *P. dextrinicus*, *P. pentosaceus*) which were detectable as early as after 24 hours of culture. Strains of *L. brevis* and *L. casei/paracasei* (isolates from brewing operations) showed detectable growth after approximately 2 days of cultivation. The slowest growth in this medium was observed with *L. backii* and *L. lindneri*, which are considered highly beer-spoiling, and *L. amylolyticus*, the growth of which was observed after 4 days of culture (Note – the beer-spoiling ability of individual species of lactic acid bacteria is described in the first part of the study (Matoulková and Kubizniaková, 2015). Compared with the solid variant of the medium, the growth of lactic acid bacteria was on average 7 hours faster with lactobacilli, the growth of pediococci in liquid medium was faster by 41 hours.

In the semi-solid HLP medium, most strains of lactobacilli were detectable after two days in culture, only *L. malefermentans* showed detectable growth after 4 and *L. amylolyticus* after 7 days. The growth of pediococci was recognizable within 3 days after the inoculation.

The average time to detection of lactobacilli in NBB-A and NBB-B media was almost the same (57 versus 55 hours); pediococci grew faster similarly as in liquid MRS and the average detection time of their growth was 43 hours shorter and reached 50 hours. All *Pediococcus* strains and 95.3% of lactobacilli reproduced in the liquid variant of the NBB medium.

In the modified MRS medium supplemented with beer (B-MRS) grew all strains of lactic acid bacteria, and lactobacilli growth rate was comparable with that of pediococci (55 versus 58 hours). When comparing the growth of bacteria in the liquid and solid variant of B-MRS medium, growth faster by about 7 hours was observed in the liquid medium for lactobacilli and up to 33 hours for pediococci. In comparison with the original variant of MRS medium without the addition of beer, lactic acid bacteria grew slower – lactobacilli by about 5 hours, pediococci by about 12 hours. The reason is probably the use of collection strains that were maintained longer in laboratory conditions and are therefore not adapted to the conditions in beer (as assumed, this may reflect the action of bitter hop substances; Suzuki et al., 2004).

In S-MRS medium (MRS modification enriched with beer and L-cysteine hydrochloride) grew only 76.7% of *Lactobacillus* strains and 60% of pediococci, which was the least among the test liquid

Tab. 3 Souhrnné výsledky růstu bakterií v tekutých půdách / Table 3 Summary results on growth rate of bacteria on liquid media

Rod / Genus	Kultivační médium / Culture media						
	MRS	HLP	NBB	B-MRS	S-MRS	PDM	ABD
Počet kmenů (%) / Number of strains (%)							
<i>Lactobacillus</i>	100	95.3	95.3	100	76.7	100	0
<i>Pediococcus</i>	100	100	100	100	60	100	0
Doba inkubace* (h) / Incubation time* (hour)							
<i>Lactobacillus</i>	50	36	55	55	67	46	–
<i>Pediococcus</i>	46	46	50	58	55	46	–

* doba, po které mohou být viditelné kolonie vyhodnoceny / Time after which the number of visible colonies can be evaluated

i pediokoků byla srovnatelná 55 (58) hodin. Při porovnání nárůstu bakterií v tekuté a na tuhé variantě půdy B-MRS byl pozorován rychlejší nárůst v půdě tekuté o 7 hodin u laktobacilů a až o 33 hodin u pediokoků. V porovnání s původní variantou půdy MRS bez přídavku piva rostly mléčné bakterie pomaleji, laktobacily o 5 hodin, pediokoky o 12 hodin. Důvodem je pravděpodobně použití sbírkových kmenů, které byly delší dobu uchovávané v laboratorních podmínkách a nebyly tedy adaptované na podmínky v pivu (předpokládá se zejména působení hořkých chmelových látek; Suzuki et al., 2004).

V půdě **S-MRS** (modifikace MRS obohacená o pivo a L-cystein hydrochlorid) narostlo pouze 76,7% kmenů *Lactobacillus* a 60% pediokoků, což je nejméně v testovaných tekutých půdách. Růst u kmenů *Lactobacillus* byl také nejpomalejší, průměrná detekce růstu byla 67 hodin, pediokoky rostly rychleji a srovnatelně s nárůstem v tekutých půdách B-MRS a NBB-B. Médium **PDM** bylo původně navrženo pro detekci *P. damnosus* (Taskila et al., 2010b), úspěšně v něm však rostou další druhy pediokoků a také kmeny laktobacilů. V naší studii se v tomto médiu pomnožily všechny kmeny, a to rychlostí stejnou pro oba rody – průměrná doba detekce 46 hodin řadí PDM půdu na druhé místo za HLP médium, ve kterém rostly laktobacily o 10 hodin rychleji.

Jak již bylo výše zmíněno, nenarostl v kultivační půdě **ABD** ani jediný kmen mléčných bakterií. Půda byla navržena hlavně pro průkaz a kultivaci obtížně kultivovaných druhů *L. lindneri* a *L. paracollinoides* (Suzuki et al 2008), ani tyto kmeny se však v půdě nepomnožily. Po desetidenní kultivaci kultur v tekuté ABD bylo 0,1 ml (odebráno ode dna zkumavky) vyočkováno na tuhou MRS půdu, 83,7% kmenů *Lactobacillus*, včetně zmiňovaných druhů, a 80,0% kmenů *Pediococcus* bylo schopno růstu. Kmeny tedy nebyly schopné růstu a množení v ABD médiu, avšak dokázaly v něm přežít.

☒ 4 ZÁVĚR

V průběhu laboratorních experimentů jsme posuzovali nejen rychlost růstu bakterií, velikost kolonií na/v jednotlivých půdách, ale také vlastní přípravu a práci s médii. Nárůst kolonií byl sledován v průběhu kultivace, po 5 dnech byla proměřována velikost kolonií.

Při použití základního MRS agaru a jeho modifikace s katalasou (K-MRS) byly detekovány všechny použité kmeny mléčných bakterií. Na K-MRS byl zaznamenán jejich nejrychlejší nárůst (43 hodin pro *Lactobacillus*, 58 hodin pro *Pediococcus*), na MRS pak 2. nejrychlejší (58 hodin pro *Lactobacillus*, 86 hodin pro *Pediococcus*). Oba rody mléčných bakterií tvořily po 5 dnech inkubace největší kolonie na základní půdě MRS (2,7 mm u laktobacilů a 1,6 mm u pediokoků). O něco užší spektrum kmenů postihuje MRS agar s přídavkem piva (B-MRS) a půda BMB, která umožnila růst všem kmenům pediokoků. Z rodu *Lactobacillus* nerostl na těchto půdách *Lactobacillus paracollinoides*. Doba detekce na B-MRS 62 hodin / *Lactobacillus* a 91 hodin / *Pediococcus*. Na půdě BMB 65 hodin / *Lactobacillus* a 98 hodin / *Pediococcus*.

Rychlého růstu bakterií a poměrně velké velikosti kolonií bylo dosaženo s půdou NBB. Z laktobacilů na NBB však nerostly *L. paracollinoides* a *L. backii*, z pediokoků *P. damnosus* (CCM 3454). Průměrná doba první detekce kolonií kmenů rodu *Lactobacillus* byla 57 hodin, což je po růstu na MRS půdě druhá nejvyšší rychlost. Většina laktobacilů byla jednoznačně detekována nejpозději po třech dnech kultivace, pouze *L. lindneri* po 4 dnech a *L. amylyticus* po 6 dnech. U rodu *Pediococcus* to bylo lehce pod průměrnou hodnotou 93 hod. Průměrné velikosti kolonií 2,2 mm pro laktobacily a 1,5 mm pro pediokoky byly druhé největší v rámci rodů.

Doba detekce v tekutých půdách je kratší než při kultivaci na ztužených půdách. Nevýhodou tekutých médií je malé množství vyšetřovaného vzorku nasazené ke kultivaci, současně nároky na kvalitativní hotového výrobku požadují nulovou kontaminaci minimálně ve 100 ml piva. Proto je vhodnější používat kultivaci v tekutých médiích pro rychlý orientační screening na přítomnost mléčných bakterií.

U HLP média je nevýhodou jeho příprava – médium nelze autoclovat a po jeho minutovém převažení ve vodní lázni je potřeba jej asepticky rozplnit do sterilních zkumavek a co nejrychleji spotřebovat. Velmi náročná příprava je u Williamsova média, které předchází prokvašení sladiny, následuje její filtrace a odpaření na polovinu původního objemu (tento krok je velmi nebezpečný). Příprava komerčně nedostupné BMB půdy není náročná, médium však obsahuje velké množství ingrediencí, z nichž ne všechny jsou běžnou součástí pivovarských mikrobiologických laboratoří. Vyšší nároky na přípravu klade modifikovaný agar MRS s katalasou (K-MRS). Na klasický

media. Growth of *Lactobacillus* strains was also the slowest, the average time of detection being 67 hours; pediococci grew faster and comparably with the growth in liquid B-MRS and NBB-B media. PDM medium was originally designed for the detection of *P. damnosus* (Taskila et al., 2010b), but it successfully supports the growth of other species of pediococci and strains of lactobacilli. In our study, all strains propagated in this medium at the same rate for both genera – the average detection time of 46 hours ranks the PDM medium second after HLP medium in which lactobacilli grew about 10 hours faster.

As mentioned above, not a single strain of lactic acid bacteria grew in the **ABD** culture medium. Though the medium was designed primarily for the detection and cultivation of poorly cultivable species *L. lindneri* and *L. paracollinoides* (Suzuki et al., 2008), in the medium these strains failed to grow. After ten days of cultivation in liquid culture, 0.1 ml ABD was withdrawn from the bottom of the tube and plated onto solid MRS medium. 83.7% *Lactobacillus* strains, including the above two species, and 80.0% *Pediococcus* strains were capable of growth. The strains were therefore not capable of proliferation in ABD medium but managed to survive in it.

☒ 4 CONCLUSION

In the course of laboratory experiments, we assessed not only the rate of bacterial growth and colony size on/in various media, but also preparation of the media and work with them. The growth of colonies was observed in the course of the cultivation, colony size was measured after 5 days.

When using basic MRS agar and its modifications with catalase (K-MRS), we detected all the strains of lactic acid bacteria. Their fastest growth was recorded on K-MRS (43 hours for *Lactobacillus*, 58 hours for *Pediococcus*), the second fastest on MRS (58 hours for *Lactobacillus*, 86 hours for *Pediococcus*). The two genera of lactic acid bacteria formed after 5 days of incubation the largest colonies on basic medium MRS (2.7 mm for the lactobacilli and 1.6 mm for pediococci). A slightly narrower range of strains thrived on MRS agar supplemented with beer (**B-MRS**) and **BMB** medium, which enabled the growth of all the strains of pediococci. The *Lactobacillus* species that did not grow on these media was *Lactobacillus paracollinoides*. The detection time on B-MRS was 62 hours (*Lactobacillus*) and 91 hours (*Pediococcus*), for the BMB medium it was 65 hours (*Lactobacillus*) and 98 hours (*Pediococcus*).

Rapid growth of bacteria and a relatively large size of colonies were obtained with the NBB medium. The lactobacilli that did not grow on NBB were *L. paracollinoides* and *L. backii*, pediococci that failed to grow included *P. damnosus* (CCM 3454). The average time of first detection of colonies of lactobacilli was 57 hours, which is the second highest rate after growth on MRS medium. Most lactobacilli were clearly detected after three days of culture at the latest, with *L. lindneri* being detected after 4 days and *L. amylyticus* after 6 days. For the genus *Pediococcus* the detection times were slightly below the average value of 93 hours. The average colony sizes, 2.2 mm for lactobacilli and 1.5 mm for pediococci, were the second largest within the genera.

The detection time in liquid media is shorter compared to solid media. The disadvantage of liquid media is a small amount of the inoculated sample; the current demands on the quality of the finished product require zero contamination in at least 100 ml of beer. It is preferable to use liquid media for rapid screening indicative of the presence of lactic acid bacteria.

The disadvantage of HLP medium is its preparation – the medium cannot be autoclaved and, after a 1-min boiling in a water bath, it needs to be aseptically dispensed into sterile tubes and use it as quickly as possible. Very demanding is the preparation of Williams medium that is preceded by the fermentation of wort, followed by filtration and evaporation to half the original volume (this step is very dangerous). Preparing commercially unavailable BMB medium is not difficult but the medium contains a large number of ingredients, not all of which are a normal part of brewery microbiological laboratories. Modified MRS agar with catalase (K-MRS) puts higher demands on preparation. A sterile solution of catalase is aseptically applied on a classically prepared MRS medium and, after drying, the dishes are ready for use. Dishes with the enzyme cannot be stored and must be prepared fresh each time before the microbiological analysis. Raky-Ray and UBA media have been frequently observed to be contaminated even during cold storage.

připravenou MRS půdu se asepticky nanese sterilní roztok enzymu katalasa a po zaschnutí jsou misky připravené k přímému použití. Misky s enzymem nelze uchovávat a je nutné připravit je čerstvé vždy před vlastním mikrobiologickým rozbořem. U pūd Raky-Ray a UBA byla pozorována poměrně častá kontaminace i při skladování v chladu.

PODĚKOVÁNÍ

Výsledky byly získány s využitím institucionální podpory Ministerstva zemědělství České republiky na dlouhodobý koncepční rozvoj VÚPS – Výzkum kvality a zpracování sladařských a pivovarských surovin (RO1916) a podpory Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy ČR – Výzkumné senzorické centrum v Praze a Výzkumná a vývojová varna – udržitelnost a rozvoj (LO1312).

LITERATURA / REFERENCES

- Ault, R. G., Woodward, J. D., 1965: Estimation of viable lactobacilli in beer and pitching yeasts. I. a rapid method for the estimation of viable brewery lactobacilli. *J. Inst. Brew.*, 71: 36–40. DOI: 10.1002/j.2050-0416.1965.tb02020.x.
- Back, W., 1980: Bierschädliche Bakterien, Nachweis und Kultivierung bierschädlicher Bakterien im Betriebslabor. *Brauwelt*, 120: 1562–1569.
- Back, W., Diirr, P., Anthes, S., 1984: Naehrboeden VLB-S7 und NBB. Erfahrungen mit beiden Medien in Jahre 1983. *Monatsschr. Brauwiss.* 37: 126–131.
- Barney, M. C., Kot, E. J., Chicoye, E., 1990: Culture medium for detection of beer spoilage microorganisms. U.S. patent 4,906,573. Brewery Convention of Japan, 1999: Detection methods for contaminants in wort and beer. In BCOJ Microbiology Methods. ed. BCOJ Analysis Committee. Tokyo: Brewers Association of Japan.
- Casey, G.P., Ingledew, W.M., 1981: The use and understanding of media used in brewing bacteriology II. Selective media for the isolation of lactic acid bacteria. *Brew. Dig.*, X: 38–45.
- Crumplen, R., Armstrong, J., Barney, M., Bendiak, D., Berndt, R., Gould, A., Hatfield, E., Holmay, S., Ingledew, W., Lin, Y., Mill, J., Russell, I., Schroeder, R., Vargas, G., Middlekauff, J., 1988: NBB Agar. *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, 46: 129–131. DOI: 10.1094/ASBCJ-46-0129.
- Crumplen, R., Bendiak, D., Curran, C., DeBruyn, L., Dowhanick, T., Hedges, P., Hjørtshøj, B., Holmay, S., Jansen, G., Van Engel, E., Müller, J., 1991: Media for lactobacilli. *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, 49: 174–176.
- Dean, R.T., 1957: Some investigations on *Lactobacillus* infection. *J. Inst. Brew.*, 63: 36–43. DOI: 10.1002/j.2050-0416.1957.tb02903.x.
- De Man, J.C., Rogosa, M., Sharpe, M.E., 1960: A medium for the cultivation of lactobacilli. *J. Appl. Bacteriol.*, 23: 130–135. DOI: 10.1111/j.1365-2672.1960.tb00188.x.
- Deng, Y., Liu, J., Li, H., Li, L., Tu, J., Fang, H., Chen, J., Qian, F., 2014: An improved plate culture procedure for the rapid detection of beer-spoilage lactic acid bacteria. *J. Inst. Brew.*, 120: 127–132. DOI: 10.1002/jib.121.
- Emeis, C. C., 1969: Methoden der brauereibiologischen Betriebskontrolle. III. VLB-S7 agar zum Nachweis bierschädlicher *Pediococcus*. *Monatsschr. Brau.*, 22: 8–11.
- European Brewery Convention, 2011: Detection of contaminants, Section 4. In *Analytica-Microbiologica-EBC 2nd edn.* ed. EBC Microbiology Subcommittee. Nürnberg: Verlag Hans Carl.
- Green, S.R., Gray, P.P., 1950: Wallerstein Laboratories Communications, 13: 357.
- Hoffman, P. S., Pine, L., Bell, S., 1983: Production of superoxide and hydrogen peroxide in medium used to culture *Legionella pneumophila*: Catalytic decomposition by charcoal. *Appl. Environ. Microbiol.*, 45: 784–791.
- Holzappel, W.H., 1992: Culture media for non-sporulating gram-positive food spoilage bacteria. *Int. J. Food Microbiol.*, 17: 113–133. DOI:10.1016/0168-1605(92)90110-O.
- Jespersen, L., Jakobsen, M., 1996: Specific spoilage organisms in breweries and laboratory media for their detection. *Int. J. Food Microbiol.*, 33: 139–155. DOI:10.1016/0168-1605(96)01154-3.
- Kindraka, J. A., 1987: Evaluation of NBB anaerobic medium for beer spoilage organisms. *MBAA T.Q.* 24: 146–151.
- Kozulis, J. A., Page, M.E., 1968: A new universal beer agar medium for the enumeration of wort and beer microorganisms. *Proc. Am. Soc. Brew. Chem.*, 52–58.
- Matoulková, D., Kubizniaková, P., 2015: Brewing microbiology – lactic acid bacteria and cultivation methods for their detection – Part I. *Kvasny Prum.*, 61(3): 76–88.
- Nishikawa, N., Kohgo, M., 1985: Microbial control in the brewery. *MBAA T.Q.* 22: 61–66.
- Saha, R.B., Sondag, R. J., Middlekauff, J. E., 1974: An improved medium for the selective culturing of lactic acid bacteria. *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, 32: 9–10.
- Suzuki, K., Asano, S., Iijima, K., Kuriyama, H., Kitagawa, Y., 2008b: Development of detection medium for hard-to-culture beer spoilage lactic acid bacteria. *J. Appl. Microbiol.*, 104: 1458–1470. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2007.03669.x.
- Suzuki, K., Funahashi, W., Koyanagi, M., Yamashita, H., 2004: *Lactobacillus paracollinoides* sp. nov., isolated from brewery environments. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 54: 115–117. DOI: 10.1099/ijs.0.02722-0.
- Šavel, J., 1980: Mikrobiologická kontrola v pivovarech. 1. vyd. Praha: SNTL, 184 s.
- Taskila, S., Tuomola, M., Kronlöf, J., Neubauer, P., 2010a: Comparison of enrichment media for routine detection of beer spoiling lactic acid bacteria and development of trouble-shooting medium for *Lactobacillus backii*. *J. Inst. Brew.*, 116: 151–156. DOI: 10.1002/j.2050-0416.2010.tb00411.x.
- Taskila, S., Tuomola, M., Kronlöf, J., Ruuska, J., Neubauer, P., 2010b: Note – preliminary applications of response surface modelling to the evaluation of optimal growth conditions for beer-spoiling *Pediococcus damnosus*. *J. Inst. Brew.*, 116: 211–214. DOI: 10.1002/j.2050-0416.2010.tb00423.x.
- Williamson, D. H., 1959: Selective media in the enumeration of bacteria in pitching yeasts. *J. Inst. Brew.*, 65: 154–164. DOI: 10.1002/j.2050-0416.1959.tb01440.x.

Do redakce došlo / Manuscript received: 20/09/2016
Přijato k publikování / Accepted for publication: 11/10/2016