

# Mikrobiologie pivovarské výroby – Bakterie mléčného kvašení a kultivační metody pro jejich detekci – I. část

## *Microbiology of brewing – Lactic Acid Bacteria and Cultivation Methods of their Detection – Part I*

Dagmar MATOULKOVÁ, Petra KUBIZNIAKOVÁ

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

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

Recenzovaný článek / Reviewed paper

### **Matoulková, D. – Kubizniaková, P.: Mikrobiologie pivovarské výroby – Bakterie mléčného kvašení a kultivační metody pro jejich detekci – I. část.** Kvasny Prum. 61, 2015, č. 3, s.76–88

Bakterie mléčného kvašení tvoří velmi heterogenní skupinu bakterií, některé se mohou vyskytovat jako kontaminace pivovarské výroby a piva. V publikaci je uveden přehled základních morfologických a fyziologických vlastností těchto mikroorganismů, popsána jsou místa jejich výskytu v pivovarském provozu a jejich schopnost kazit pivo. Článek dále popisuje použití různých kultivačních pūd – diskutováno je jejich složení, dostupnost a výsledky srovnávacích studií.

### **Matoulková, D. – Kubizniaková, P.: Microbiology of brewing – Lactic acid bacteria and cultivation methods of their detection – Part I.** Kvasny Prum. 61, 2015, No. 3, pp.76–88

Lactic acid bacteria form a very heterogeneous group of bacteria, some of which may be present as contaminants in beer brewing. We provide here an overview of basic morphological and physiological properties of these microorganisms. Their habitat in the brewing operations and their ability to spoil beer are also described. The article also describes the use of various culture media – their composition, availability and results of comparative studies are discussed.

### **Matoulková, D. – Kubizniaková, P.: Mikrobiologie der Brauherstellung – Milchsäurebakterien und Kultivationsmethoden zur ihren Detektion – Teil I.** Kvasny Prum. 61, 2015, Nr. 3, S. 76–88

Milchsäurebakterien bilden eine sehr heterogene Gruppe von Bakterien, einige davon als können eine Kontamination in der Brauherstellung und des Bieres auftreten. Im Artikel wird eine Übersicht von Grundmorphologischen und physiologischen Eigenschaften dieser Mikroorganismen beigefügt, weiterhin wurden die Auftretensorte in den Brauereien und ihre Fähigkeit das Bier verderben zu können beschrieben. Der Artikel befasst sich mit der Anwendung von verschiedenen Nährböden, diskutiert wird es auch ihre Zusammensetzung, Zugänglichkeit und Ergebnisse von den Vergleichsstudien.

**Klíčová slova:** bakterie mléčného kvašení, identifikace, kontaminace piva, kultivační metody, *Lactobacillus*, obtížná kultivovatelnost, *Pediococcus*, VBNC

**Keywords:** lactic acid bacteria, identification, contamination of beer, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, cultivation methods, difficult culturability, VBNC

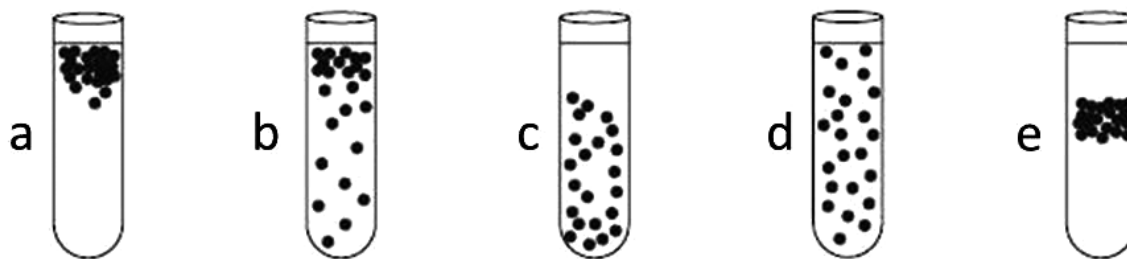
## 1 ÚVOD

Bakterie mléčného kvašení představují heterogenní skupinu bakterií se společným charakteristickým rysem – produkcí kyseliny mléčné. Mezi mléčné bakterie jsou řazeny rody *Lactobacillus*, *Lactococcus* a *Pediococcus*, a dále např. *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Paralactobacillus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Weisella* aj. Samotný rod *Lactobacillus* v současné době zahrnuje více než 180 platných druhů, které jsou nacházeny zejména v prostředí bohatém na živiny – na ovoci, na rostlinách, ve vodě, v gastrointestinálním traktu ptáků a savců, v ústní dutině (podílí se na tvorbě zubního kazu) apod., dále v prostředí vytvořeném člověkem (potravin rostlinného i živočišného původu, krmiva, různé fermentované výrobky a fermentační prostředí), v humánním i veterinárním klinickém materiálu. Některé druhy jsou využívány pro výrobu fermentovaných potravin (*L. casei*) nebo jako probiotika (*L. plantarum*). Jako kontaminace se mohou vyskytovat při výrobě piva, vína, saké a dalších fermentovaných nápojů. Pediokoky se běžně vyskytují v prostředí, na rostlinných zbytcích, v potravinách, nápojích, některé jsou využívány pro výrobu sýrů, siláže, mohou se také vyskytovat jako kontaminace piva, vína a moštů (Hammes a Hertel, 2009; Sedláček, 2007). Mléčné bakterie jsou součástí přirozené mikrobioty ječmene a přežívají během sladování a rmutování (O’ Sullivan et al., 1999). Pozitivní roli hrají mléčné bakterie během výroby piva při bio-acidifikaci sladiny. Cílem okyselování rmutu a sladiny jsou definované hodnoty pH rmutu, sladiny a hotového piva bez použití dalších zdrojů kyseliny (Lewis, 1998). Druhy mléčných bakterií používané při tomto procesu jsou např. *Lactobacillus amylolyticus*, *L. delbrueckii*, *L. fermentum*, *L. amylovorus*, *Pediococcus acidilactici*, *P. dextrinicus* atd. (Bohak et al., 1998; Vaughan et al., 2005).

Laktobacily a pediokoky jsou ve vztahu ke kyslíku v prostředí charakterizovány jako fakultativně anaerobní nebo přesněji ae-

## 1 INTRODUCTION

Lactic acid bacteria represent a heterogeneous group of bacteria with one main common feature – the production of lactic acid. Among the lactic acid bacteria are classified the genera *Lactobacillus*, *Lactococcus* and *Pediococcus*, and also *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Paralactobacillus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Weisella* and others. Only the *Lactobacillus* genus alone currently includes more than 180 valid species, which are found mainly in nutrient rich environment – on fruits, on plants, in water, in the gastrointestinal tract of birds and mammals, in the oral cavity (they contribute to the formation of dental caries), etc., as well as in an environment created by man (food of vegetable and animal origin, fodder, various fermented products and the fermentation medium), and human and veterinary clinical material. Some species are used for production of fermented foods (*L. casei*) or as probiotics (*L. plantarum*). The contamination can occur in the production of beer, wine, sake, and other fermented beverages. Pediococci are commonly found in the environment in plant residues, in foods, beverages, some are used for cheese production, silage, and may also be present as contamination of beer, wine and cider (Hammes and Hertel, 2009; Sedláček, 2007). Lactic acid bacteria are also present as part of the natural barley microbiota and persist during malting and mashing (O’Sullivan et al., 1999). They play a positive role in the beer-manufacturing process by contributing to wort bioacidification. The aims of mash and wort acidification are defined pH levels in the mash, wort and the resulting beer without the use of some additional source of acid (Lewis, 1998). The lactic acid bacteria employed in wort bioacidification processes include e.g. *Lactobacillus amylolyticus*, *L. delbrueckii*, *L. fermentum*, *L. amylovorus*, *Pediococcus acidilactici*, *P. dextrinicus* etc. (Bohak et al., 1998; Vaughan et al., 2005).



Obr. 1 Charakter mikrobiálního růstu podle vztahu mikroorganismů ke kyslíku / Fig. 1 Character of microbial growth according to the relationship of microorganisms to oxygen

a – striktně aerobní organismy / *strict aerobes*; b – fakultativní anaerobi / *facultative anaerobes*; c – striktní anaerobi / *strict anaerobes*; d – aerotolerantní anaerobi / *aerotolerant anaerobes*; e – mikroaerofilní bakterie / *microaerophiles* (upraveno / *modified*; Hogg, 2005).

rotolerantní anaerobní bakterie. Podle charakteru růstu v tekuté půdě, např. v thioglykolátovém médiu, je možné mikroorganismy obecně rozdělit do pěti skupin (obr. 1). Striktně aerobní mikroorganismy vyžadují pro svůj růst kyslík – ve zkumavce s půdou rostou ve svrchní části sloupce půdy (a); fakultativně anaerobní organismy jsou schopny „nastavit“ svůj metabolismus (tj. respirační nebo fermentativní) podle dostupnosti kyslíku – ve sloupci půdy budou převažovat spíše u hladiny, neboť respirací získají více energie než fermentací (b); striktní anaerobi vyžadují prostředí bez kyslíku (kyslík je pro ně toxický) a ve zkumavce rostou ve spodní části sloupce (c); aerotolerantní anaerobi nepotřebují kyslík, ale tolerují ho, není pro ně toxický – ve zkumavce rostou v celém objemu sloupce půdy (d); mikroaerofilní organismy mají specifické požadavky na kyslík – potřebují ho, ale pouze v určitém koncentračním rozmezí, vysoké koncentrace kyslíku jsou pro ně toxické – ve zkumavce rostou ve svrchní části sloupce, nikoliv však přímo u hladiny (e) (Hogg, 2005).

Pro kultivaci bakterií mléčného kvašení jsou doporučovány anaerobní podmínky, které lze navodit např. použitím vyvíječe anaerobní atmosféry a inkubací ve vzduchotěsných nádobách („anaerostatech“, „anaerobních hrncích“), nebo přímou inkubací v CO<sub>2</sub>-inkubátoru, kde je anaerobní atmosféra dosaženo přímo plynem z tlakové lahve. Kultivační teplota v rozmezí 25–30 °C vyhovuje většině mléčných bakterií vyskytujících se ve vzorcích z pivovarského prostředí. V metodikách EBC je jako optimální teplota doporučována 27±1 °C, anaerobní inkubace, doba inkubace 5–7 dní. I malé snížení kultivační teploty může vést k prodloužení lag-fáze a snížení růstové rychlosti bakterií a tím k prodloužení doby inkubace potřebné k vytvoření viditelných kolonií (Taskila et al., 2011; European Brewery Convention, 2011). Urychlení detekce mléčných bakterií ve vzorku umožňuje technika odečítání mikrokolonií – viditelné kolonie jsou tvořeny mnoha miliony buněk a dosažení velikosti kolonie viditelné pouhým okem (tedy „standardní technika“) trvá u mléčných bakterií adaptovaných na pivo několik dní. Metoda odečítání mikrokolonií (viditelných pouze v mikroskopu) urychluje stanovení – mikrokolonie jsou obarveny vhodným fluorescenčním barvivem a pozorovány pod mikroskopem už během 1.–2. dne od inokulace. Kombinace techniky mikrokolonií se specifickou detekcí (např. fluorescenční in situ hybridizace se specifickými sondami) pak umožní i identifikaci pomalu rostoucích kontaminantů do úrovně druhu během velmi krátké doby (Asano et al., 2009).

V souvislosti s mikrobiologickými analýzami piva byla u některých laktobacilů popsána obtížná kultivovatelnost, nebo tzv. „stav obtížné kultivace“ (tzv. hard-to-culture state), či stav „životaschopnosti ale nekultivovatelnosti“ (tzv. VBNC; viable but nonculturable), který je indukován při naočkování bakterií z piva na médium neobsahující pivo, a souvisí s adaptací bakterií na podmínky v pivu. Při opakovaném přeočkování na půdě bez piva postupně narůstá jejich schopnost růstu na běžné půdě, jak bylo zjištěno např. u *L. lindneri*, *L. paracollinoides* a *L. acetotolerans* (Deng et al., 2014; Suzuki et al., 2004; 2006a). Tzv. VBNC fenotyp, který je charakterizován neschopností buněk množit se na růstovém médiu, přestože jsou živé a udržují si metabolickou aktivitu, je běžným jevem a vyskytuje se u bakterií, které jsou vysoce adaptované na podmínky prostředí, v němž se vyskytují před přenesením na standardní živnou půdu (Oliver, 2005).

V článku je často popisována schopnost mléčných bakterií kazit pivo. Pokud uvádíme termín „škodlivost“, je i tímto termínem myšlena škodlivost z hlediska rizika kontaminace a kažení piva.

In relation to the oxygen in an environment, lactobacilli and pediococci are characterized as facultatively anaerobic or, better stated, aerotolerant anaerobic bacteria. According to the character of growth in a liquid, e.g. thioglycolate medium, the microorganisms can be generally divided into five groups (Fig. 1). Strictly aerobic organisms require oxygen for growth – in a test tube with the medium they grow in the upper part of the medium column (a); facultative anaerobic organisms are able to “adjust” their metabolism (i.e. respiratory or fermentative) depending on the availability of oxygen – in the column of medium they will prevail rather at the surface because they gain more energy through respiration than through fermentation (b); strict anaerobes require environment without oxygen (oxygen is toxic to them) and they grow in a test tube at the bottom of medium column (c); aerotolerant anaerobes do not need oxygen, but tolerate it (it is not toxic to them). In a test tube they grow throughout the volume of the medium (d); microaerophilic organisms have specific requirements for oxygen – they need it, but only in a certain concentration range; high oxygen concentrations are toxic to them. In a test tube they grow in the upper part of the medium column, but not directly at the surface (e) (Hogg, 2005).

Cultivation of lactic acid bacteria is recommended to proceed under anaerobic conditions which can be induced, e.g., using anaerobic atmosphere generators and incubating in airtight containers (“anaerostats”, “anaerobic pots”), or by direct incubation in a CO<sub>2</sub>-incubator, wherein the anaerobic atmosphere is achieved by direct gas feeding from the cylinder. Cultivation temperature range of 25–30 °C meets the requirements of most of lactic acid bacteria occurring in samples from the brewing environment. EBC methodologies recommend 27±1 °C as an optimal temperature, anaerobic incubation and incubation time 5–7 days. Even a small decrease in cultivation temperature may lead to prolonged lag phase and may reduce the growth rate of bacteria, resulting in a longer incubation time needed to produce visible colonies (Taskila et al., 2011; European Brewery Convention, 2011). Speed-up of the lactic acid bacteria detection can be achieved by the microcolony method. Visible colonies are formed by millions of bacterial cells and it takes several days for beer-adapted lactic acid bacteria to reach the size of colony visible with the naked eye (e.i. standard technique). Microcolony method allows for faster analysis – microcolonies are stained with suitable fluorescent dye and observed in microscope even during 1st-2nd day from inoculation. Combination of microcolony method and specific detection (fluorescent in situ hybridization with specific probe) then makes possible a short-time identification of slowly-growing bacteria on the species level (Asano et al., 2009).

In connection with microbiological analyzes of beer, some lactobacilli were described to exhibit difficult culturability or so-called “hard-to-culture state”, or the status of “viable but nonculturable (VBNC)” which is induced by inoculating bacteria from beer to a beer free medium, and is related to bacterial adaptation to conditions in beer. When the bacteria are inoculated on a medium without beer their ability to grow in ordinary medium gradually increases, as found, e.g., in *L. lindneri*, *L. paracollinoides* and *L. acetotolerans* (Deng et al., 2014; Suzuki et al. 2004; 2006a). The so-called VBNC phenotype, which is characterized by the inability of cells to proliferate in the growth medium although they are alive and retain metabolic activity is common and occurs in bacteria, which are highly adapted to the environmental conditions in which they appear before transfer to the standard broth (Oliver, 2005).

## 2 MLÉČNÉ BAKTERIE V PIVOVARSKÉM PROSTŘEDÍ

Pivo je nápoj s vysokou mikrobiologickou stabilitou. Hořké chmelové látky, alkohol, oxid uhličitý, nízké pH, nízký obsah živin a kyslíku jsou faktory zabraňující rozvoji většiny mikroorganismů včetně patogenních. Bakterie mléčného kvašení, zvláště rody *Lactobacillus* a *Pediococcus*, jsou považovány za nejvíce škodlivé (Vaughan et al., 2005). Podle odhadů jsou zodpovědné za 60–90 % případů mikrobiálního kažení piva v Evropě v období 1980–2002 (Back, 1994; 2003). Nežádoucí je jak primární kontaminace mléčnými bakteriemi, která může značně poškodit sensorické vlastnosti piva produkcí nežádoucích sensorických látek již během jeho výroby, tak i sekundární (post-pasterizační) kontaminace, která může finální výrobek poškodit tvorbou zákalu a negativně ovlivnit jeho chuť a vůni (Back, 2005).

Nejvíce rozšířeným rodem mléčných bakterií v pivu a pivovarském provozu je *Lactobacillus* a dále v menší míře *Pediococcus*. Z piva byly izolovány např. druhy *L. backii*, *L. brevis*, *L. brevisimilis*, *L. buch-*

This article repeatedly describes the ability of lactic acid bacteria to spoil beer. If we use the term „harmfulness“, this term is meant to reflect the risk of contamination and spoilage of beer.

## 2 LACTIC ACID BACTERIA IN THE BREWING ENVIRONMENT

Beer is a beverage with a high microbiological stability. Bitter hop substances, alcohol, carbon dioxide, low pH, low nutrient content and oxygen are factors preventing the development of most microorganisms, including pathogenic ones. Lactic acid bacteria, especially the genera *Lactobacillus* and *Pediococcus*, are considered the most noxious (Vaughan et al., 2005). According to estimates they have been responsible for 60–90% of cases of microbial spoilage of beer in Europe in the period 1980–2002 (Back, 1994; 2003). Undesirable is both the primary contamination by lactic acid bacteria, which can severely damage the sensory properties of beer by generating

Tab. 1 Přehled druhů mléčných bakterií, které se mohou uplatnit jako kontaminanty piva / Table 1 Survey of the species of lactic acid bacteria which may come to the fore as beer contaminants

Druh / Species	Škodlivost / Harmfulness <sup>a</sup>	Kontaminace / Contamination <sup>b</sup>
<i>L. acetotolerans</i>	NZ	NZ
<i>L. amylolyticus</i>	NZ	primární / primary
<i>L. backii</i>	škodlivý – kazí pivo / harmful – obligate beer-spoiler	NZ
<i>L. brevis</i>	škodlivý – kazí pivo, zkvašuje dextriny / harmful – obligate beer-spoiler, ferments dextrans	většinou sekundární / mostly secondary
<i>L. brevisimilis</i>	potenciálně škodlivý / potentially harmful	většinou primární / mostly primary
<i>L. buchneri</i>	NZ	NZ
<i>L. casei</i>	potenciálně škodlivý, může produkovat diacetyl / potentially harmful, diacetyl production	NZ
<i>L. coryniformis</i>	potenciálně škodlivý, může produkovat diacetyl / potentially harmful, diacetyl production	většinou primární / mostly primary
<i>L. curvatus</i>	NZ	NZ
<i>L. delbrueckii</i>	NZ	primární / primary
<i>L. fermentum</i>	NZ	NZ
<i>L. fructivorans</i>	NZ	NZ
<i>L. lindneri</i>	škodlivý – kazí pivo, obtížně kultivovatelný / harmful – obligate beer-spoiler, poor culturability	většinou primární / mostly primary
<i>L. malefermentans</i>	NZ	NZ
<i>L. parabuchneri</i>	NZ, izolován z kvasnic / yeast contamination	NZ
<i>L. paracasei</i>	potenciálně škodlivý / potentially harmful	NZ
<i>L. paracollinoides</i>	škodlivý – kazí pivo, obtížně kultivovatelný / harmful – obligate beer-spoiler, poor culturability	NZ
<i>L. paraplantarum</i>	NZ	NZ
<i>L. paucivorans</i>	NZ, typový kmen izolován z ležáckého tanku / type strain was isolated from beer storage tank	NZ
<i>L. plantarum</i>	potenciálně škodlivý, může produkovat diacetyl / potentially harmful, diacetyl production	většinou sekundární / mostly secondary
<i>P. acidilactici</i>	NZ	NZ
<i>P. claussenii</i>	NZ, může tvořit exopolysacharidy / may produce exopolysaccharides	NZ
<i>P. damnosus</i>	škodlivý – kazí pivo, kontaminace kvasnic, produkuje diacetyl, může tvořit exopolysacharidy, roste při nízkých teplotách / harmful – obligate beer-spoiler, yeast contamination, diacetyl production, may produce exopolysaccharides, grows at low temperature	většinou primární / mostly primary
<i>P. dextrinicus</i>	NZ, kazí málo chmelená piva / cause spoilage of weakly hopped beer	NZ
<i>P. inopinatus</i>	potenciálně škodlivý, kontaminace kvasnic / potentially harmful, yeast contamination	většinou primární / mostly primary
<i>P. parvulus</i>	NZ	NZ
<i>P. pentosaceus</i>	potenciálně škodlivý, kontaminace kvasnic / potentially harmful, yeast contamination	většinou primární / mostly primary

Informace v tabulce vycházejí z literatury / This table is based on prior literature (Back, 2005; Bokulich a Bamforth, 2013; Suzuki et al., 2008a; Suzuki, 2011; Vaughan et al., 2005)

<sup>a</sup> Škodlivost: škodlivý druh – většina kmenů kazí pivo; potenciálně škodlivý – některé kmeny kazí pivo / Harmfulness for beer: harmful species – majority of strains are beer-spoilers; potentially harmful – some of the strains are beer-spoilers.

<sup>b</sup> Primární kontaminace – kvasnice, nefiltrované pivo, přetlačné tanky atd. / Primary contamination – yeast, unfiltered beer, bright beer tanks etc.; Sekundární kontaminace – stáčírna lahví, kegů, plechovek atd. / Secondary contamination – bottling hall, keg and canning lines etc.; NZ – nedostatečně známo / not well known

*neri*, *L. casei*, *L. delbrueckii*, *L. lindneri*, *L. paucivorans*, *L. plantarum*, z rodu *Pediococcus* pak *P. acidilactici*, *P. claussenii*, *P. damnosus*, *P. dextrinicus*, *P. inopinatus*, *P. pentosaceus* a další (Back, 1987; Back et al., 1996; Bohak et al., 1998; 2006; Bokulich a Bamforth, 2013; Dobson et al., 2002; Ehrmann et al., 2010; Funahashi et al., 1998; Hollerová a Kubizniaková, 2002; Chaban et al., 2002; Priest, 2003; Russell a Walker, 1953; Storgårds et al., 1998; Suzuki et al., 2004; Taskila et al., 2010a). Přehled druhů laktobacilů a pediokoků, které se mohou uplatnit jako kontaminanty piva, je uveden v tab. 1.

Ne všechny izoláty uvedených druhů však mají schopnost kazit pivo – u mléčných bakterií je typický výskyt kmenů kazících pivo i kmenů nekazících. Druhy *L. brevis*, *L. lindneri* a *P. damnosus* jsou uváděny jako nejvíce rizikové a nejčastější kontaminanty hotového piva. *L. brevis* je podle odhadů zodpovědný za přibližně více než 50 % případů mikrobiálního kažení piva (Sakamoto a Konings, 2003). Druh *P. damnosus* je nacházen většinou v pivu při dokvašení a v hotovém pivu, méně často v kvasnicích. Druhy *P. inopinatus* a *P. pentosaceus* jsou detekovány zejména jako kontaminace kvasnic a jen zřídka v pivu (Priest, 2003). Ostatní zástupci mléčných bakterií, jako *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus* a *Enterococcus* nevykazují rezistenci k hořkým chmelovým látkám a v pivu se běžně nevyskytují (Bokulich a Bamforth, 2013).

## 2.1 Rod *Lactobacillus*

Laktobacily jsou grampozitivní, chemoorganotrofní, nesporelující, katalasa-negativní mikroorganismy se striktně fermentativním typem metabolismu. Ve vztahu ke kyslíku jsou anaerobní nebo mikroaerofilní, většina laktobacilů je však ke kyslíku značně tolerantní. Rostou v širokém rozmezí teplot (2–53 °C), teplotní optimum většiny zástupců je 30–40 °C. U druhu *L. lindneri* byla popsána maximální teplota růstu 28 °C, s optimem 19–23 °C (Back, 2005). Při nižších teplotách roste např. *L. sake* (5 °C), tzv. „termofilní“ laktobacily, např. *L. delbrueckii*, mají horní teplotní hranici až 55 °C. Optimální počáteční hodnota pH média je 5,5–6,2, laktobacily mohou růst i v prostředí s pH pod 5,0, zejména pokud jsou adaptované na podmínky v pivu (Suzuki, 2011). Tvorbou kyselin snižují pH prostředí až pod hodnotu 4,0. Při neutrálním a zásaditém pH je růst laktobacilů obvykle inhibován (Hammes a Hertel, 2009).

Buňky laktobacilů mají většinou tvar tyčky, mohou být však tvarově značně variabilní (obr. 2). Délka buněk i jejich tvar jsou závislé na stáří kultury, složení kultivačního média, tenzi kyslíku apod. Vyskytují se většinou jednotlivě, tvorba řetězků je méně častá. Některé druhy laktobacilů (např. *L. brevis*) obsahují i v případě čistých kultur směs dlouhých a krátkých buněk (Hammes a Hertel, 2009). Na agarových plotnách vytvářejí laktobacily hladké, lesklé, zpravidla bílé až krémové kolonie s pravidelnými okraji, o průměru 2–5 mm. V tekutých médiích je růst zpravidla rovnoměrný v celém objemu. Laktobacily se vyznačují komplexními nutričními požadavky. V kultivačním médiu vyžadují přítomnost zkvasitelných cukrů, aminokyselin, peptidů, esterů mastných kyselin, solí, derivátů nukleových kyselin a vitamínů skupiny B (Hammes a Hertel, 2009; Hammes a Vogel, 1995).

Druhy rodu *Lactobacillus* lze podle konečných produktů fermentace cukrů a glukonátů rozdělit do tří fyziologických skupin (Sedláček, 2007). První skupina zahrnuje obligátně homofermentativní laktobacily. Hexosy jsou fermentovány téměř výlučně (>90 %) na kyselinu mléčnou. Tato skupina zahrnuje např. druhy *L. backii*, *L. delbrueckii*, *L. amylolyticus* atd. Druhá skupina slučuje zástupce fakultativně heterofermentativní. Hexosy fermentují na kyselinu mléčnou (>90 %), pentosy a často i glukonáty zkvašují na kyselinu octovou, mravenčí a ethanol. Do této skupiny např. náleží v pivovarském prostředí se vyskytující *L. plantarum*, *L. curvatus*, či *L. paracasei*. Druhy řazené do třetí skupiny jsou obligátně heterofermentativní, hexosy fermentují na kyselinu mléčnou, octovou, ethanol a CO<sub>2</sub>. Pentosy zkvašují na kyselinu mléčnou a octovou. Do této skupiny patří např. *L. brevis*, který je z hlediska rizika kažení piva uváděn jako nejvíce škodlivý druh mléčných bakterií. Typická pro *L. brevis* je schopnost fermentovat dextriny a škrob, což vede k hlubšímu prokvašení piva, tzv. super-atenuaci (Hammes a Hertel, 2009; Vaughan et al., 2005).

## 2.2 Rod *Pediococcus*

Buňky rodu *Pediococcus* mají tvar koků, často uspořádaných v tetradách, popřípadě jednotlivě či ve dvojicích; nikdy v řetězcích (obr. 2). Někdy jsou souhrnně označovány jako „mléčné koky“ nebo nesprávně „sarciny“. Jedná se o grampozitivní, nesporelující, katalasa-negativní, chemoorganotrofní, anaerobní bakterie. Jsou homofermentativní, glukosu fermentují na kyselinu mléčnou bez produkce plynu. Optimální teplota růstu je uváděna v rozmezí 25–35 °C, ale např. *P. damnosus* roste v rozmezí 8–30 °C, u druhu *P. acidilactici* je

undesirable sensory substances already during beer production, and secondary (post-pasteurization) contamination, which can damage the final product by causing turbidity and adversely affecting its taste and smell (Back, 2005).

The most widespread genus of lactic acid bacteria in beer and brewing operations is *Lactobacillus* and to a lesser extent *Pediococcus*. From beer were isolated the species *L. backii*, *L. brevis*, *L. brevisimilis*, *L. buchneri*, *L. casei*, *L. delbrueckii*, *L. lindneri*, *L. paucivorans*, *L. plantarum*, and from the genus *Pediococcus* then *P. acidilactici*, *P. claussenii*, *P. damnosus*, *P. dextrinicus*, *P. inopinatus* and *P. pentosaceus* (Back, 1987; Back et al., 1996; Bohak et al., 1998; 2006; Bokulich and Bamforth, 2013; Dobson et al., 2002; Ehrmann et al., 2010; Funahashi et al., 1998; Hollerová and Kubizniaková, 2002; Chaban et al., 2002; Priest, 2003; Russell and Walker, 1953; Storgårds et al., 1998; Suzuki et al., 2004; Taskila et al., 2010a). Table 1 gives a survey of the species of *Lactobacillus* and *Pediococcus* which may come to the fore as beer contaminants. Not all isolates of these species, however, have the ability to spoil beer – lactic acid bacteria typically include both beer spoilers and non-spoilers. The species *L. brevis*, *L. lindneri* and *P. damnosus* are reported as the most risky and most common contaminants of finished beer. According to estimates, *L. brevis* is responsible for more than approximately 50 % of cases of microbial spoilage of beer (Sakamoto and Konings, 2003). The species *P. damnosus* is found mostly in beer during final fermentation and in finished beer, less frequently in yeast. The species *P. inopinatus* and *P. pentosaceus* are mainly detected as yeast contaminants and seldom in beer (Priest, 2003). Other representatives of lactic bacteria such as *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus* and *Enterococcus* do not show resistance to bitter substances of hops and are not commonly found in beer (Bokulich and Bamforth, 2013).

## 2.1 Genus *Lactobacillus*

Lactobacilli are Gram-positive, chemoorganotrophic, sporulating, catalase-negative organisms with a strictly fermentative type of metabolism. In relation to oxygen, most anaerobic, lactobacilli are substantially tolerant to oxygen. They grow in a wide range of temperatures (2–53 °C) and temperature optimum for most representatives is 30–40 °C. For the species *L. lindneri* was described the maximum growth temperature of 28 °C, with an optimum from 19 to 23 °C (Back, 2005). At lower temperatures grows, e.g., *L. sake* (5 °C); the so-called “thermophilic” lactobacilli, e.g. *L. delbrueckii*, have an upper temperature limit of 55 °C. The optimum initial pH of the medium is 5.5 to 6.2; lactobacilli can also grow in an environment with a pH below 5.0, particularly if they are adapted to the conditions in beer (Suzuki, 2011). Formation of acids reduces pH of the environment to below 4.0. The growth of lactobacilli is usually inhibited at neutral and alkaline pH (Hammes and Hertel, 2009).

Cells of lactobacilli are usually rod-shaped, but their shape may be highly variable (Fig. 2). The length of the cells and their shape are dependent on the age of the culture, culture medium composition, oxygen tension, etc. They are usually solitary, formation of chains is uncommon. Some species of lactobacilli (e.g. *L. brevis*) contain, even in the case of pure cultures, a mixture of long and short cells (Hammes and Hertel, 2009). On agar plates lactobacilli produce smooth, glossy, usually white to creamy colonies with regular edges and a diameter of 2–5 mm. In liquid media, growth is generally uniform throughout the medium volume. Lactobacilli are characterized by complex nutritional requirements. The culture medium requires the presence of fermentable sugars, amino acids, peptides, fatty acid esters, salts, nucleic acid derivatives and vitamins of group B (Hammes and Hertel, 2009; Hammes and Vogel, 1995).

According to the end products of carbohydrate and gluconate fermentation, species of the genus *Lactobacillus* may be divided into three physiological groups (Sedláček, 2007). The first group includes obligately homofermentative lactobacilli. Hexoses are fermented almost exclusively (> 90%) to lactic acid. This group includes, for example, the species *L. backii*, *L. delbrueckii*, *L. amylolyticus*, etc. The second group includes facultatively heterofermentative species that ferment hexoses to lactic acid (> 90%), and ferment pentoses and sometimes also gluconates to acetic acid, formic acid and ethanol. This group includes, e.g., *L. plantarum*, *L. curvatus*, or *L. paracasei* occurring in the brewing environment. The species belonging to the third group are obligately heterofermentative, ferment hexoses to lactic acid, acetic acid, ethanol and CO<sub>2</sub>. They ferment pentoses to lactic acid and acetic acid. This group includes, e.g., *L. brevis*, which is quoted as the most harmful type of lactic acid bacteria in terms of

uváděno optimum okolo 40 °C s maximální teplotou růstu 50–53 °C. Optimální pH pro růst je cca 5,5, ale rozmezí je druhově i kmenově závislé. Pediokoky podobně jako laktobacily vyžadují pro svůj růst přítomnost jednoduchých cukrů, aminokyselin, peptidů, vitamínů, solí apod. (Hammes a Hertel, 2009; Holzapfel et al., 2009; Sedláček, 2007).

Typickým zástupcem rodu *Pediococcus* je dříve se častěji v pivovarech vyskytující *P. damnosus* (neplatné synonymum „*P. cerevisiae*“). Zajímavostí u tohoto druhu je fakt, že jeho výskyt byl potvrzen v pivu, pivovarských kvasnicích, vínu, ale nikoliv v surovinách pro výrobu piva nebo na rostlinném materiálu (Priest, 2003). Dále se v pivovarském prostředí vyskytují druhy *P. acidilactici* a *P. pentosaceus*, které jsou nacházeny i ve sladu a mohou růst během počátečních etap výroby sladiny, kdy je technologická teplota pod 50 °C. Výskyt pediokoků v této fázi výroby však nemá negativní dopad na konečnou kvalitu piva (Simpson a Taguchi, 1995). *P. dextrinicus* jako jediný druh pediokoků může fermentovat dextriny a škrob; jeho výskyt v pivu je však méně častý než např. *P. damnosus* (Holzapfel et al., 2009). Pediokoková kontaminace během hlavního kvašení může zpomalovat kvašení, pivo může získat medové aroma, či obsahovat nežádoucí vysoké koncentrace diacetylu (Jespersen a Jakobsen, 1996). Při umělé kontaminaci kvasící mladiny pediokoky bylo prokázáno potlačení růstu kvasinek, zpomalení kvašení i nadměrná produkce diacetylu (McCaig a Weaver, 1983). Poměr diacetylu a pentandionu vyšší než 2 je uváděn jako indikátor proběhlé kontaminace kvasnic/piva mléčnými bakteriemi, zejména pediokoky (Inoue, 2008).

### 2.3 Schopnost laktobacilů a pediokoků kazit pivo

Základním předpokladem škodlivosti mléčných bakterií je jejich tolerance k hořkým chmelovým látkám, nižšímu pH, vyššímu obsahu alkoholu a CO<sub>2</sub>. Schopnost některých kmenů mléčných bakterií přežívat a pomnožovat se v pivu a pivovarském prostředí je dáвана do souvislosti s jejich rezistencí k hořkým chmelovým látkám. Hořké chmelové látky jsou ve své isomerované formě zodpovědné za hořkou chuť a aroma piva a zároveň vykazují antimikrobiální účinky proti gram pozitivním bakteriím a některým houbám (Sakamoto a Konings, 2003). Aspekty rezistence mléčných bakterií k hořkým látkám chmele jsou podrobně popsány v několika souhrnných studiích, např. Sakamoto a Konings (2003), Suzuki (2011), Suzuki et al., (2006b; 2008a) aj.

Mléčné bakterie se mohou rozvíjet v různých fázích výroby piva. Pro bakterie adaptované na hořké chmelové látky je mladina ideálním prostředím pro růst. V průběhu hlavního kvašení klesá obsah rozpuštěného kyslíku, snižuje se hodnota pH a pivovarské kvasinky uvolňují do prostředí značné množství vitamínů, aminokyselin a dalších látek, které stimulují růst bakterií mléčného kvašení (Vaughan et al., 2005).

Rozvoj kontaminace během hlavního kvašení a dokvašování způsobuje snížení kvality piva, poškození jeho organoleptických vlastností tvorbou organických kyselin a dalších senzoryckých významných látek. Primární kontaminace zpravidla bývá v dalších fázích výroby (filtrace, pasterace) z výrobku odstraněna, ne však její produkty, které poškozují senzorycký profil piva (Boulton a Quain, 2001). Pivo během nedokvašování v ležáckých tancích je vhodným prostředím pro růst laktobacilů a pediokoků. Při rozvoji kontaminace se uplatňuje několik významných faktorů (teplota dokvašování, stupeň prokvašení piva, hladina počáteční kontaminace). Pediokoky, zejména *P. damnosus*, jsou schopné růstu a množení i při velmi nízkých teplotách a v pivu ve fázi dokvašování mohou vytvořit značné množství diacetylu. Zvýšením teploty dokvašování nad 5 °C vzrůstá významně počet kontaminujících mikroorganismů. Piva s vyšším pH, málo prokvašená, s vyšším obsahem aminokyselin a zkvasitelných cukrů a s nižším obsahem CO<sub>2</sub> jsou více náchylná k rozvoji kontaminant. Bakterie mléčného kvašení mohou pivo poškodit i sekundárně, tedy v průběhu stáčení piva do obalů (tzv. sekundární, tj. postpasterizační, kontaminace). Riziko bakteriálního kažení piva je větší v pivovarech, které produkují piva nepasterovaná, nízkoalkoholická, nealkoholická nebo méně chmelená (Šavel, 1980; Vaughan et al., 2005).

Poškození piva mléčnými bakteriemi je typické tvorbou zákalu, zvýšením kyselosti piva, produkcí plynu a nežádoucích senzoryckých aktivních látek (kyselina mléčná, octová, diacetyl atd.), které jsou důsledkem jejich metabolické činnosti (Back, 2005). Vedle toho může být snižována výtěžnost alkoholu během fermentace (Narendranath et al., 1997). Vyšší množství diacetylu v pivu může signalizovat kontaminaci pediokoky nebo např. *L. casei* či *L. plantarum* (Back, 2005).

Jako nejvíce škodlivé mléčné bakterie jsou uváděny *L. brevis*, *L. lindneri* a *P. damnosus*. Druh *L. brevis* se vyskytuje v různém prostředí, i mimo pivovarský provoz, a schopnost kazit pivo se u jednot-

the risk of spoiling beer. Typical for *L. brevis* is the ability to ferment dextrins and starch, which leads to a deeper beer fermentation, the so-called super-attenuation (Hammes and Hertel, 2009; Vaughan et al., 2005).

### 2.2 Genus *Pediococcus*

The genus *Pediococcus* is represented by cocci often arranged in tetrads or solitary or in pairs; never in chains (Fig. 2). They are sometimes collectively referred to as „milk cocci“ or incorrectly „sarcina“. They are Gram-positive, non-sporulating, catalase-negative, chemoorganotrophic, anaerobic bacteria. They are homofermentative, ferment glucose to lactic acid without gas production. Optimal growth temperature is given in the range of 25–35 °C, but, e.g., *P. damnosus* grows in the range of 8–30 °C, the species *P. acidilactici* is reported to have a growth optimum at about 40 °C with a maximum growth temperature of 50–53 °C. The optimal pH for growth is about 5.5, but the range is species and strain dependent. Like lactobacilli, pediococci require for their growth the presence of simple sugars, amino acids, peptides, vitamins, salts and the like. (Hammes and Hertel, 2009; Holzapfel, et al., 2009; Sedláček, 2007).

A typical representative of the genus *Pediococcus* is *P. damnosus* (invalid synonym „*P. cerevisiae*“) which formerly used to occur more frequently in breweries. An interesting feature of this species is the fact that its presence was confirmed in beer, ale yeast, wine, but not in the raw materials for beer production or in plant material (Priest, 2003). Furthermore, the brewing environment may host the species *P. acidilactici* and *P. pentosaceus* which are found also in malt and may grow during the early stages of wort production, when the technological temperature is below 50 °C. The occurrence of pediococci at this stage of production, however, has no negative impact on the final quality of the beer (Taguchi and Simpson, 1995). *P. dextrinicus* as the only *Pediococcus* species can ferment dextrin and starch; its presence in beer is less frequent than, e.g., that of *P. damnosus* (Holzapfel et al., 2009). Pediococcal contamination during primary fermentation may slow the fermentation; the beer can get honey aroma, or contain undesirably high concentrations of diacetyl (Jespersen and Jakobsen, 1996). In artificial contamination, pediococci fermenting wort were shown inhibit the growth of yeasts, slow down the fermentation and cause an excessive production of diacetyl (McCaig and Weaver, 1983). The ratio of diacetyl to pentanedione higher than 2 is referred to as an indicator of a past contamination of yeast/beer by lactic acid bacteria, in particular pediococci (Inoue, 2008).

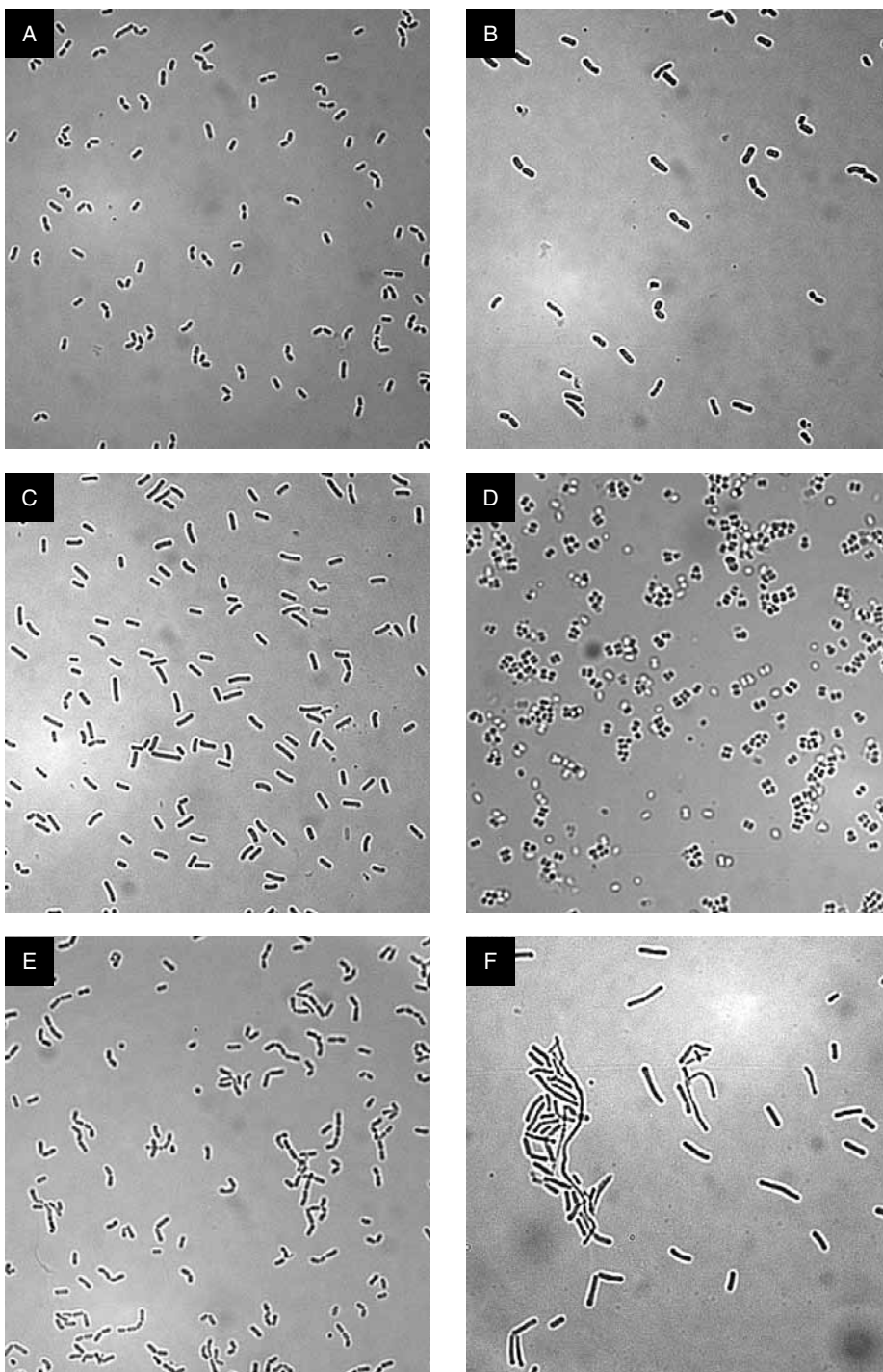
### 2.3 The beer-spoiling ability of lactobacilli and pediococci

The basic aspect of the harmfulness of lactic acid bacteria is their tolerance to bitter hop substances, lower pH, higher alcohol content and CO<sub>2</sub>. The ability of certain strains of lactic acid bacteria to survive and multiply in beer and the brewing environment has been associated with their resistance to bitter substances of hops. Bitter hop substances are in their isomerized form responsible for the bitter taste and aroma of the beer and also exhibit antimicrobial activity against Gram-positive bacteria and some fungi (Sakamoto and Konings, 2003). The basic features of resistance of lactic acid bacteria to bitter substances of hops are described in detail in several reviews, e.g. Sakamoto and Konings (2003), Suzuki (2011), Suzuki et al., (2006b; 2008a) and others.

Lactic acid bacteria can develop in various stages of beer production. Wort is an ideal environment for the growth of bacteria adapted to the bitter hop substances. During the main fermentation, the dissolved oxygen content decreases, the pH drops and brewer's yeast releases into the environment a large amount of vitamins, amino acids and other substances that stimulate the growth of lactic acid bacteria (Vaughan et al., 2005).

Development of contamination during the main and secondary fermentation causes a reduction in the quality of beer, damaging the organoleptic properties due to the formation of organic acids and other sensorially important substances. In further stages of production (filtration, pasteurization) the primary contamination is usually removed from the product but its products are not eliminated, damaging the sensory profile of beer (Boulton and Quain, 2001). During the final fermentation in lager tanks, beer is a suitable environment for the growth of lactobacilli and pediococci. The spread of contamination depends on several important factors (fermentation temperature, degree of wort attenuation, the initial level of contamination). Pediococci, particularly *P. damnosus*, are capable of growth and multiplication even at very low temperatures and can produce considerable amounts of diacetyl during the secondary beer fermentation. Increasing the temperature of fermentation above 5 °C sig-





Obr. 2 Mléčné bakterie / Fig. 2 Lactic acid bacteria

A – *Lactobacillus backii* DSMZ 18080; B – *L. lindneri* DSMZ 20690; C – *L. plantarum* RIBM 2-90; D – *Pediococcus damnosus* CCM 3453; E – *L. brevis* RIBM 2-4; F – *L. brevis* – RIBM ML10

livých kmenů liší, i v závislosti na místě izolace. Pivo zkažené působením *L. brevis* je typické zákalem, sedlinou, hlubokým prokvašením a kyselou vůní a chutí (Back, 2005). U izolátů z jiných prostředí je schopnost kazit pivo velmi nízká nebo žádná (Suzuki et al., 2008a). U *L. brevis* je uváděna ztráta schopnosti kazit pivo, pokud jsou bakterie přeočkovávány v médiu bez obsahu hořkých chmelových látek (Suzuki et al., 2006a). Druh *L. lindneri* vykazuje značnou rezistenci k hořkým kyselinám a jeho škodlivost se projevuje tvorbou zákalu a sedimentu v hotovém pivu, bez tvorby látek ovlivňujících chuť a vůni piva (Back, 2005).

Druhy *L. lindneri* a *L. paracollinoides* patří mezi obtížně kultivovatelné bakterie a často způsobují kažení piva, aniž by byly detekovány při mikrobiologické kontrole (Asano et al., 2009; Suzuki et al., 2008b). U druhů *L. lindneri* a *L. brevis* pomnožených v pivu byla zjištěna menší velikost buněk v porovnání s buňkami stejných kmenů v kultivačním médiu – malé buňky snadněji penetrují membránovými filtry používanými pro odstranění mikrobů z piva (Asano et

nificantly increases the number of contaminating microorganisms. Beers with a higher pH, little fermented, with a higher content of amino acids and fermentable sugars, and with lower CO<sub>2</sub> content are more prone to developing contaminations. Lactic acid bacteria can damage the beer also secondarily, i.e. during the bottling into containers (the so-called secondary, i.e. post-pasteurization contamination). The risk of bacterial spoilage of beer is larger in breweries that produce unpasteurized, low-alcoholic, non-alcoholic or low hopped beers (Šavel, 1980; Vaughan et al., 2005).

The damage of beer by lactic acid bacteria is characterized by turbidity, increased beer acidity, production of gas and undesirable flavor compounds (lactic acid, acetic acid, diacetyl, etc.), which are a consequence of bacterial metabolic activity (Back, 2005). In addition, the alcohol yield may be decreased during the fermentation (Narendranath et al., 1997). Higher amounts of diacetyl in beer may indicate contamination or pediococci or, e.g., *L. casei* and *L. plantarum* (Back, 2005).

The most harmful lactic acid bacteria are taken to be *L. brevis*, *L. lindneri* and *P. damnosus*. The species *L. brevis* occurs in various environments, even outside the brewing operations, and its ability to spoil beer varies for individual strains depending also on the site of isolation. Beer spoiled by the action of *L. brevis* has a typical turbidity, sediment, deep attenuation and sour aroma and flavor (Back, 2005). Isolates from other environments have a very low ability to spoil beer or even lack it (Suzuki et al., 2008a). *L. brevis* has been reported to lose the ability to spoil beer if subcultured in a medium without hop bitter compounds (Suzuki et al., 2006a). The species *L. lindneri* exhibits significant resistance to bitter acids and its harmfulness is manifested by the formation of sediment and haze in the finished beer, without the formation of substances affecting the beer taste and flavor (Back, 2005).

The species *L. lindneri* and *L. paracollinoides* belong among bacteria culturable with difficulty and often cause spoilage of beer without being detected during microbiological control (Asano et al., 2009; Suzuki et al., 2008b). For the species *L. brevis* and *L. lindneri* cultured in beer were found to exhibit smaller cell size compared to cells of the same strain in the culture medium; small cells easily penetrate the membrane filters used for removing microbes from beer (Asano et al., 2007). The literature reports on variable sensitivity of *L. lindneri* to higher temperatures – according to Back (2005) this species is not able to grow at tempera-

tures higher than 28 °C while in another study it was shown that *L. lindneri* can survive at higher temperatures and even survive a low pasteurization process (Back et al., 1992).

*Pediococcus damnosus* occurs most often during wort fermentation and secondary fermentation. It damages beer due to the formation of organic acids and diacetyl, which is produced in high concentration in particular during beer maturation (*P. damnosus* is capable of growth at low temperatures). Some strains may also produce polysaccharides that cause turbidity and „gelatinous“ character of beer (Back, 2005). Similar features have been reported for the species *P. clausenii* (Dobson et al., 2002). *P. damnosus* (and *L. lindneri*) have been shown to have the ability to adhere to the yeast cells, which can lead to premature sedimentation of yeast and slow or stuck fermentation (Priest, 2003; Storgards et al., 1998).

The species *L. casei/paracasei*, *L. plantarum* and *L. coryniformis* exhibit only a weak resistance to bitter hops substances and degrade only slightly hopped beer or beer with increased pH, causing the forma-

al., 2007). V literatuře je uváděna variabilní citlivost *L. lindneri* k vyšším teplotám – podle Backa (2005) není tento druh schopný růst při teplotách vyšších než 28 °C, avšak v jiné studii bylo prokázáno, že může přežívat při vyšších teplotách a dokonce i při nedostatečném pasterizačním procesu (Back et al., 1992).

*Pediococcus damnosus* se vyskytuje nejčastěji během kvašení mladiny a dokvašování. Poškozuje pivo tvorbou organických kyselin a diacetylu, který je ve vysoké koncentraci produkovan zejména ve fázi zrání piva (*P. damnosus* je schopen růstu i při nízkých teplotách). Některé kmeny mohou navíc produkovat polysacharidy, které způsobují zákal a „rosolovitý“ charakter piva (Back, 2005). Podobně je tomu u druhu *P. clausenii* (Dobson et al., 2002). U *P. damnosus* (a *L. lindneri*) je uváděna schopnost adherovat na buňky kvasinek, což může vést k předčasné sedimentaci kvasnic a zpomalení nebo zastavení kvašení (Priest, 2003; Storgards et al., 1998).

Druhy *L. casei/paracasei*, *L. coryniformis* a *L. plantarum* vykazují jen slabou rezistenci k hořkým chmelovým látkám a kazí pouze málo chmelená piva nebo piva se zvýšeným pH, která mohou poškodit tvorbou zákalu, sedimentu a produkcí organických kyselin a diacetylu (Back, 2005). Některé druhy mléčných bakterií (např. *L. backii*, *L. paracollinoides*, *P. clausenii*) byly popsány relativně nedávno a jejich výskyt a škodlivost nejsou ještě dostatečně známy.

Růst a množení některých mléčných bakterií v pivu může souviset také s produkcí biogenních aminů, které nejsou sensoricky aktivní, ale ve větším množství mohou u citlivých osob vést k bolestem hlavy, zvracení, hypertenzi, těžkým alergickým záchvatům provázeným dušností, vyrážkou, a v extrémním případě i šokem a ztrátou vědomí (Kalač a Křížek, 2003; Olšovská et al., 2014).

### 3 KULTIVAČNÍ PŮDY PRO DETEKCI MLÉČNÝCH BAKTERIÍ

Univerzální kultivační půda, která by umožňovala rychlou a spolehlivou detekci všech pivo škodících mléčných bakterií, neexistuje (Back, 2005). V literatuře je uváděna široká škála kultivačních půd, které jsou větším či menším kompromisem mezi selektivitou, citlivostí a rychlostí růstu bakterií (Gillet et al., 2004). Autoři se zaměřují zejména na průkaz těch mléčných bakterií, které způsobují kažení hotového piva, popřípadě mají schopnost pivo negativně ovlivňovat již během jeho výroby. Půdy ke kultivaci mléčných bakterií musí obsahovat minerály, vitamíny a růstové látky. Součástí půd jsou inhibitory, které zabrání rozvoji kvasinek, plísní a gramnegativních bakterií a současně neovlivňují růst mléčných bakterií. K potlačení kvasinek je doporučováno antibiotikum aktidion, růst gramnegativních bakterií lze inhibovat β-fenylethanolom nebo azidem sodným (Boatwright a Kirsop, 1976; Casey a Ingledew, 1981; Taguchi et al., 1990). Mléčné bakterie jsou fakultativně anaerobní, doporučuje se jejich kultivace za anaerobních podmínek (Matsuzuva et al., 1979; Šavel, 1980). Detekci mléčných bakterií komplikuje také jejich pomalý růst, doba inkubace při 28–30 °C bývá 5–7 dní, někdy i déle, např. pro druh *P. damnosus* je charakteristický velmi pomalý růst kolonií (Back, 2005), u *L. lindneri* a *L. paracollinoides* celkově obtížná kultivovatelnost, zejména v konvenčních médiích (neobsahujících pivo, např. běžný MRS agar) při izolaci z piva/pivovarského prostředí (Suzuki et al., 2008b). Tento jev byl dále pozorován u kmenů *L. acetotolerans* izolovaných z piva (Deng et al., 2014).

Pro účely stanovení pivo škodících mléčných bakterií byla vyvinuta řada různých kultivačních půd – tři z nich, MRS, Raka-Ray a modifikované NBB médium jsou obecně nejvíce používané. Mají rozdílné složení a jsou používány různým způsobem – v podobě koncentrátu, bujónu nebo agaru, případně s přísadkou piva. Tímto přísadkou není míněno vyšetřované pivo, ale sterilní pivo přidávané jako součást půdy. U některých mléčných bakterií byla prokázána adaptace na podmínky v pivu a při vyočkování na médium se složením naprosto odlišným od piva (obsah živin, pH, obsah solí, chmelových látek atd.) tyto bakterie nerostou. V provozní laboratoři je výhodné při přípravě půdy přidávat pivo vyráběné v daném provozu – předpokládá se adaptace pivo-škodících bakterií na toto pivo a tedy jejich snazší detekce (Jespersen a Jakobsen, 1996). Pivo je do půd přidáváno v různém poměru – Taskila (2011) doporučuje přísadku piva do kultivační půdy alespoň 25 % (v/v), médium ABD podle Suzukiho et al. (2008b) obsahuje 100 % piva – k jeho přípravě se vůbec nepoužívá voda. 800 ml piva na 1l média obsahuje KOT médium (Taguchi et al., 1990).

V 50. letech byla navržena široká škála půd vhodná pro detekci mléčných bakterií např. Brigg's Tomato Juice Medium obsahující rajčatový džus, Haynes Deep Liver médium s extraktem z jater, a půdy

of haze and sediment, and production of organic acids and diacetyl (Back, 2005). Some species of lactic acid bacteria (e.g. *L. backii*, *L. paracollinoides*, *P. clausenii*) have been described relatively recently, and their occurrence and harmfulness are not yet sufficiently known. Growth and reproduction of some lactic acid bacteria in beer may also be linked to the production of biogenic amines, which are sensorially active, but in larger quantities they may lead in susceptible individuals to headache, vomiting, hypertension, severe allergic attacks accompanied by shortness of breath, rash, and in extreme cases even shock and loss of consciousness (Kalač and Křížek, 2003; Olšovská et al., 2014).

### 3 CULTURE MEDIA FOR DETECTION OF LACTIC ACID BACTERIA

A universal culture medium which would allow a rapid and reliable detection of all beer-spoiling lactic acid bacteria does not exist (Back, 2005). The literature presents a wide variety of culture media which are more or less a compromise between selectivity, sensitivity and speed of bacterial growth (Gillet et al., 2004). The authors mainly focus on the proof of lactic acid bacteria that cause the spoilage of finished beer, or have the ability to adversely affect beer during its production. The media for culturing lactic acid bacteria must contain minerals, vitamins and growth substances. The media also contain inhibitors which prevent the development of yeasts, molds and Gram-negative bacteria and also affect the growth of lactic acid bacteria. The antibiotic actidione is recommended for suppressing yeast, the growth of Gram-negative bacteria can be inhibited by β-phenylethanol and sodium azide (Boatwright and Kirsop, 1976; Casey and Ingledew, 1981; Taguchi et al., 1990). Lactic bacteria are facultative anaerobes and it is recommended that the cultivation should proceed under anaerobic conditions (Matsuzuva et al., 1979; Šavel, 1980). Detection of lactic acid bacteria is also complicated by the slow growth; the incubation period at 28–30 °C is usually 5–7 days, sometimes longer. For instance, the species *P. damnosus* is characterized by very slow growth of colonies (Back, 2005). *L. lindneri* and *L. paracollinoides*, when isolated from beer/brewing environment show very poor culturability, especially in conventional media (which do not contain beer, e.g. normal MRS agar) (Suzuki et al., 2008b). This phenomenon was also observed in strains of *L. acetotolerans* isolated from beer (Deng et al., 2014).

Various culture media were developed for determining beer-spoiling lactic acid bacteria; generally the most used are three of them, MRS, Raka-Ray and modified NBB media. They have different compositions and are used in various ways – as a concentrate, broth or agar, optionally with the addition of beer. This addition does not mean the beer under investigation, but sterile beer added as part of the medium. Some lactic acid bacteria were demonstrated to be capable of adaptation to the conditions in beer and on inoculation on a medium with a composition quite different from beer (nutrients, pH, salt content, hop substances, etc.), these bacteria do not grow. In brewery laboratory it is advantageous, when preparing the medium, to add beer produced in a given operation – adaptation of beer-spoiling bacteria to this beer is assumed and this could facilitate their detection (Jespersen and Jakobsen, 1996). Beer is added to media in varying proportions – Taskila (2011) recommends the addition of at least 25 % (v/v) beer into the culture medium while the ABD medium according to Suzuki et al. (2008b) comprises 100% of the beer – no water is used in its preparation. The KOT medium contains 800 ml beer per 1 liter medium (Taguchi et al., 1990).

A wide variety of media suitable for detecting lactic acid bacteria have been proposed in the 50's, e.g. Brigg's Tomato Juice Medium containing tomato juice, Haynes Deep Liver medium with an extract from the liver, and media designed/modified to detect lactic acid bacteria in beer such as Dean's Beer Extract Medium with beer or Williamson's "Medium L.", a medium with a liver extract. They are complex, variously nutritionally rich media, whose preparation is complex and the results are not always satisfactory. The detailed medium development and composition for detecting lactic acid bacteria in beer is given in the review by Casey and Ingledew (1981).

Wallerstein Laboratories Differential Agar (WLD-agar) is recommended by EBC as a medium for the detection of bacterial contamination. It is a complex growth medium containing glucose as carbon source and bromocresol green as an indicator of pH change. It can be prepared from commercially available dehydrated WLN medium with an addition of actidione for inhibiting the growth of yeast.

určené/upravené pro detekci mléčných bakterií v pivu: Dean's Beer Extract Medium s pivem, či Williamson's „Medium L.“ a médium s extraktem z jater. Jednalo se o komplexní, nutričně různě bohatá média, jejichž příprava byla složitější a výsledky ne vždy uspokojivé. Podrobně je vývoj a složení půd pro detekci mléčných bakterií v pivu uvedeno ve studii Caseyho a Ingledewa (1981).

**Wallerstein Laboratories Differential Agar** (WLD-agar) je doporučen EBC jako médium pro detekci bakteriální kontaminace. Je to komplexní růstové médium, obsahující glukosu jako zdroj uhlíku a bromkresolovou zeleň jako indikátor změny pH. Lze ho připravit z komerčně dodávané dehydratované půdy WLN a přidávkem aktidionu pro inhibici růstu kvasinek. Za anaerobních růstových podmínek umožňuje detekci bakterií mléčného kvašení (Green a Grey, 1950).

Médium založené na extraktu z piva obohaceném o kvasničný extrakt navrhl Dean (1957). Anaerobní podmínky kultivace zajistily inhibici octových bakterií, obsah alkoholu a nízké pH limitovaly růst ostatních gramnegativních bakterií, kvasinky byly potlačeny přidávkem aktidionu.

**Williamsonovo médium** pro stanovení laktobacilů z piva bylo založeno na pivu, maltose, extraktu z jater a dalších složkách a na selektivním působení aktidionu a polymyxinu (Williamson, 1959). Polymyxin je antibiotikum působící inhibičně na gramnegativní bakterie, ale potlačuje také růst pediokoků, a to v koncentracích nižších nežli jsou nutné pro potlačení růstu gramnegativních bakterií. Varianta Williamsonova média, v níž je polymyxin nahrazen  $\beta$ -fenylethanolem, umožňuje růst laktobacilů a pediokoků za současného potlačení růstu gramnegativních bakterií a zároveň i kvasinek. „L médium“ bylo testováno v několika studiích a bylo vyhodnoceno jako srovnatelné s půdou WLD a umožňovalo vyšší záchyt laktobacilů z piva než Deanovo médium (Ault a Woodward, 1965; Casey a Ingledew, 1981).

V roce 1959 bylo pro účely taxonomické studie rodu *Pediococcus* použito selektivní médium „**Original Nakagawa Medium**“, jehož základem je nehořčené pivo a jako zdroj uhlíku D-manosa, kterou umí fermentovat pouze pediokoky, ale ne laktobacily (Nakagawa a Kitahara, 1959). Půda dále obsahuje acetát sodný pro inhibici koliformních bakterií a aktidion pro potlačení růstu kvasinek. Anaerobní kultivace zabrání růstu octových bakterií. Modifikací původního „Original“, Nakagawova média je „Nakagawa médium“ založené na nehořčeném pivu, D-manose a uvedených inhibitech, určené opět pro detekci pediokoků (Nakagawa, 1964). Další modifikací média podle Nakagawy je varianta s glukosou a s přidávkem 0,2% rajčatového džusu, která byla vyvinuta pro kultivaci pomalu rostoucího kmene *Pediococcus cerevisiae* (nyní *P. damnosus*). Růstový faktor v rajčatovém džusu podporující růst pediokoků byl identifikován jako 4-O- $\beta$ -D-glukosylpantotenát. Médium bylo dále obohaceno o redukující složky, cystein hydrochlorid aj. (Eto a Nakagawa, 1975).

Potíže s nestandardností (zejména v případě rajčatového džusu), s přípravou i variabilním růstem různých kmenů mléčných bakterií na různých půdách odstranil v roce 1960 de Man a kol., když navrhl tzv. **MRS agar** (de Man Rogosa Sharpe agar), který je i v současné době jednou z nejvíce používaných půd. Jedná se o komplexní médium obsahující glukosu jako zdroj uhlíku, vyvinuté jak pro kultivaci a detekci širokého spektra mléčných bakterií, tak i k izolaci a uchování kmenů (de Man et al., 1960; Casey a Ingledew, 1981). Autoři MRS agaru zároveň prokázali, že přidávek rajčatového džusu do půdy nestimuluje růst mléčných bakterií. 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). Půda MRS byla v pozdější době různě modifikována za účelem zvýšení selektivity nebo urychlení růstu pivu škodících mléčných bakterií, viz dále chronologicky v textu.

V roce 1968 Wackerbauer a Emeis navrhli půdu pro detekci mléčných bakterií **VLB-L41**, která je založená na pivu (varem zkoncentrovaném na polovinu původního objemu), s obsahem maltosy, xylosy a fruktosy jako zdroji uhlíku. Půda dále obsahuje aktidion a  $\beta$ -fenylethanol a bromkresolovou zeleň (Casey a Ingledew, 1981). Další půda **VLB-S7** byla původně navržena pro izolaci a identifikaci pediokoků (Emeis, 1969), ale rostou na ní i laktobacily (Casey a Ingledew, 1981). Obě půdy jsou rozšířeny zejména v Německu. Půda VLB-S7 je komerčně dostupná, je dodávána hotová ve ztužené podobě, připravěná k rozehrání a nalití na misky.

Univerzální pивní agar (Universal beer agar – **UBA**) obsahující pivo, rajčatový džus a glukosu umožňuje detekci pivu škodících mikroorganismů – mléčných a octových bakterií a kvasinek (Kozulis a Page, 1968). Půda UBA je dodávána komerčně v dehydratované formě různými dodavateli. Přidávkem aktidionu lze eliminovat růst

Under anaerobic growth conditions it allows the detection of lactic acid bacteria (Green and Grey, 1950).

Medium based on beer extract supplemented with yeast extract was suggested by Dean (1957). Anaerobic culture conditions ensured the inhibition of acetic acid bacteria, alcohol content and low pH have limited the growth of other Gram-negative bacteria while yeast cells were suppressed by the addition of actidione.

**Williamson medium** for Lactobacilli determination in beer was based on beer, maltose, liver extract and other components, and the selective action of actidione and polymyxin (Williamson, 1959). Polymyxin is an antibiotic with inhibitory action on Gram-negative bacteria, but it also suppresses the growth of pediococci at concentrations lower than those required for suppressing the growth of Gram-negative bacteria. A variant of the Williamson medium in which polymyxin is replaced by  $\beta$ -phenylethanol allows the growth of lactobacilli and pediococci while suppressing the growth of Gram-negative bacteria and also yeasts. „L medium“ has been tested in several studies and it was evaluated as comparable with WLD medium. It permitted a higher capture of beer lactobacilli than Dean medium (Ault and Woodward, 1965; Casey and Ingledew, 1981).

In 1959, a taxonomic study of the genus *Pediococcus* made use of selective „**Original Nakagawa Medium**“, which is based on unhopped beer and uses as the carbon source D-mannose, which can be fermented only by pediococci but not by lactobacilli (Nakagawa and Kitahara, 1959). The medium further comprises sodium acetate for inhibition of coliform bacteria and actidione to suppress the growth of yeasts. Anaerobic cultivation prevents the growth of acetic bacteria. A modification of the original „Original Nakagawa medium“ is the „Nakagawa medium“ based on unhopped beer, D-mannose and the above inhibitors, intended again for the detection of pediococci (Nakagawa, 1964). Another modification of the Nakagawa medium is a variant with glucose and an addition of 0.2% tomato juice, which was developed for the cultivation of the slow-growing strain *Pediococcus cerevisiae* (now *P. damnosus*). The growth factor in tomato juice promoting growth of pediococci was identified as 4-O- $\beta$ -D-glucosyl pantothenate. The medium was further enriched with reducing components, cysteine hydrochloride and other substances (Eto and Nakagawa, 1975).

Problems with a non-standard character (especially in the case of tomato juice), with the preparation and variable growth of the various strains of lactic acid bacteria on different media were eliminated in 1960 by de Man et al., who devised the so-called **MRS agar** (de Man Rogosa Sharpe agar), which is even now one of the most used media. This is a complex medium containing glucose as a carbon source, developed both for the cultivation and detection of a broad spectrum of lactic acid bacteria as well as for the isolation and preservation of strains (de Man et al., 1960; Casey and Ingledew, 1981). The authors of MRS agar also demonstrated that the addition of tomato juice in the medium does not stimulate the growth of lactic acid bacteria. MRS agar is recommended by three main brewer's associations – European Brewery Convention (2011), the American Society of Brewing Chemists (Crumplen et al., 1991) and Brewery Convention of Japan (1999). The MRS medium was subsequently variously modified in order to increase its selectivity or to accelerate the growth of beer-spoiling lactic acid bacteria (as listed below in a chronological order).

In 1968 Wackerbauer and Emeis designed the **VLB-L41** medium for the detection of lactic acid bacteria, which is based on beer (concentrated by boiling to half the original volume) with maltose, xylose and fructose as carbon sources. The medium further comprises actidione and  $\beta$ -phenylethanol and bromocresol green (Casey and Ingledew, 1981). Another medium, **VLB-S7**, was originally designed for the isolation and identification of pediococci (Emeis, 1969), but it also supports the growth of lactobacilli (Casey and Ingledew, 1981). Both media are widespread, particularly in Germany. Medium VLB-S7 is commercially available, is delivered ready in a solidified form, ready to warm up and poured onto plates.

**Universal Beer Agar (UBA)** containing beer, tomato juice and glucose allows the detection of beer-spoiling microorganisms – lactic acid and acetic acid bacteria and yeasts (Kozulis and Page, 1968). Medium UBA is supplied commercially by different suppliers in dehydrated form. Addition of actidione can eliminate the growth of yeasts and anaerobic culture conditions suppress the growth of acetic acid bacteria. The medium will then enable the determination of lactic acid bacteria adapted to growth in beer.

**Raka-Ray No. 3**, a complex medium containing maltose and fructose has been proposed for detecting lactic acid bacteria (Saha et al., 1974). Compared with UBA, WLD and medium with tomato



kvasek a anaerobní podmínky kultivace potlačí růst octových bakterií – půda pak umožní stanovení mléčných bakterií adaptovaných na růst v pivu.

**Raka-Ray No. 3**, komplexní médium obsahující maltosu a fruktosu, bylo navrženo pro detekci mléčných bakterií (Saha et al., 1974). V porovnání s UBA, WLD a půdou z rajčatového džusu na ní mléčné bakterie rostly rychleji a tvořily větší kolonie (Casey and Ingledew, 1981). Půda je doporučována Evropskou pivovarskou konvencí (European Brewery Convention; EBC) k rutinním kontrolám piva a pivovarského provozu. Neobsahuje pivo a její součástí jsou maltosa a fruktosa. Není dostatečně selektivní vůči bakteriím, které nekazí pivo, současně má menší záchyt piva škodících mléčných bakterií, a proto má spíše informativní význam (Jespersen a Jakobsen, 1996). Médium je používáno ve srovnávacích studiích (Crumplen et al., 1991; Suzuki et al., 2008b; Taskila et al., 2011).

**Hsuovo *Lactobacillus-Pediococcus* médium** (HLP-médium, HLPm) ve ztuženém nebo poloztuženém formě bylo navrženo pro identifikaci bakterií mléčného kvašení (Hsu et al., 1975). Při přípravě půdy není nutné použití autoklávu. Kultivace mléčných bakterií na tomto médiu nevyžaduje anaerobní podmínky, pravděpodobně obsahuje alespoň jedno redukční činidlo a potlačuje růst octových bakterií (Casey a Ingledew, 1981). HLP-médium bylo v roce 2009 schváleno komisí American Society of Brewing Chemists (ASBC) jako médium vhodné pro stanovení mléčných bakterií v pivovarské laboratoři (Fischborn, 2009). V metodikách EBC uvedeno není.

**Leeho multidiferenciální agar** (Lee's multidifferential agar, LMDA) je živné médium, které umožňuje detekci běžných mikroorganismů vyskytujících se v prostředí pivovaru, včetně piva škodících bakterií. Médium není plně selektivní, přidávkem aktidionu lze zabránit růstu kvasinek. LMDA obsahuje bromkresolovou zeleně a uhlíkatý vápenatý – křída. Ve vodě nerozpustná křída vytváří v agaru mléčný zákal, který se v případě produkce kyseliny rozpustí a kolem kolonií se vytvoří zřetelné „vyčerené zóny“ způsobené vznikem octanu vápenatého, který již je ve vodě rozpustný; při použití bromkresolové zeleně dochází k probarvení média v okolí kolonií vlivem změny pH a také k různému zbarvení kolonií v důsledku zadržování barvičky. Nastavením kultivačních podmínek lze rozlišit bakterie produkující kyseliny – kultivace za aerobních podmínek dovoluje růst octových bakterií a za anaerobních podmínek pediokoků a laktobacilů (Lee et al., 1975).

Jednoduchým a levným médiem pro růst laktobacilů a pediokoků nacházejících se v pivovarském provozu je **sacharosový agar** (Sucrose agar), který však je ve své základní formě neselektivní a umožňuje růst i ostatních piva škodících organismů (Boatwright a Kirsop, 1976). Autoři uvádějí různé možnosti modifikace sacharosového agaru, např. přidávek práškové křída a/nebo bromkresolové zeleně pro zvýšení kontrastu mezi koloniemi a agarem. Přidávek mikrobiálních inhibitorů (aktidion,  $\beta$ -fenylethanol) umožní zvýšení selektivity média pro mléčné bakterie. V roce 1978 byla půda mezi metodami doporučenými EBC pro detekci mléčných bakterií při pivovarské kontrole. V jiných studiích je však použitelnost sacharosového agaru pro účely detekce mléčných bakterií zpochybňována – u různých druhů a kmenů byla pozorována různá schopnost utilizace sacharosu a jiných cukrů (Lawrence a Leedham, 1979).

MRS agar modifikovaný přidávkem 0,5 % maltosy (tzv. **MRS+M agar**) byl porovnáván s WLD, standardním MRS, UBA a LMD-agary. Půda obsahující zároveň glukosu a maltosu zachycuje větší spektrum mléčných bakterií než ostatní uvedené půdy a je také vhodnější než sacharosový agar (Lawrence a Leedham, 1979).

Půda **NBB** byla původně vyvinuta Backem (1980) jako základní nesespecifické médium. Její složení bylo dále upraveno tak, aby poskytla rychlejší výsledky a umožnila větší záchyt piva škodících mikroorganismů než VLB-S7 (Back et al., 1984). Později byla NBB půda modifikována tak, aby umožnila detekci bakterií mléčného kvašení. Zdrojem uhlíku jsou glukosa i maltosa ve stejném poměru (po 15 g/l půdy), dále obsahuje pivo a indikátor změny pH (chlorfenolovou červeně). Půda NBB je dodávána v různých variantách – hotová, připravená k rozliti na Petriho misky (NBB-agar) nebo do vyšetřovacích lahví na stanovení mléčných bakterií v pivu (NBB-C, koncentrát), dehydratovaná (NBB-P), a pro účely inkubace vzorků odebraných stěrem (NBB-B-AM). Podle Wackerbauera a Rincka (1983) je VLB-S7 selektivnější médium pro piva škodící mléčné bakterie než NBB, ve kterém mohou růst gramnegativní bakterie (např. *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Hafnia* a *Klebsiella* ssp.) a kvasinky. VLB-S7 i NBB jsou mezi půdami doporučenými analytikou EBC. Modifikaci NBB média publikovali Nishikawa a Kohgo (1985). Původní složení podle Backa (1980) bylo upraveno nahrazením octanu sodného (0,2 % octanem draselným (0,6 %). Tato úprava zvýšila specifitu média

juice it promotes a faster growth of lactic acid bacteria and formation of larger colonies (Casey and Ingledew, 1981). The medium is recommended by European Brewery Convention (EBC) for routine checks of beer and brewing operations. It contains beer and includes maltose and fructose. It is not selective enough for bacteria that do not spoil beer and provides a lower capture of beer-spoiling lactic acid bacteria, and has therefore rather informative use (Jespersen and Jakobsen, 1996). The medium is used in comparative studies (Crumplen et al., 1991; Suzuki et al., 2008b; Taskila et al., 2011).

**Hsu's *Lactobacillus-Pediococcus* medium (HLP-medium HLPm)** in a solidified or semi-solidified form was designed to identify lactic acid bacteria (Hsu et al., 1975). In the preparation of the medium it is not necessary to use an autoclave. Culturing of lactic acid bacteria in this medium does not require anaerobic conditions since it probably contains at least one reducing agent and inhibits the growth of acetic acid bacteria (Casey and Ingledew, 1981). HLP-medium was approved in 2009 by the American Society of Brewing Chemists (ASBC) committee as a medium suitable for the determination of lactic acid bacteria in the brewery laboratory (Fischborn, 2009). It is not listed in EBC methodologies.

**Lee's multidifferential agar (LMDA)** allows for detection of common microorganisms from brewery environment including beer-spoiling bacteria. The medium is not selective, yeast cells can be suppressed by the addition of actidione. LMDA contains bromocresol green and calcium carbonate – chalk. Water insoluble chalk causes a milky haze of the agar, which is dissolved in the case of the production of acids and distinct „clarified zones“ are formed around the colonies due to the formation of calcium acetate, which is water-soluble. When using bromocresol green, coloring occurs in the medium around the colonies due to pH changes and the colonies assume different color due to the retention of the dye. Depending on cultivation conditions acid-producing bacteria can be discriminate – aerobic cultivation allows for the growth of acetic acid bacteria, anaerobic conditions enable the detection of pediococci and lactobacilli (Lee et al., 1975).

A simple and inexpensive medium for the growth of lactobacilli and pediococci occurring in the brewing operation is the **sucrose agar**, which is however nonselective in its basic form and allows the growth of other beer-spoiling organisms (Boatwright and Kirsop, 1976). The authors described various modifications of sucrose agar, e.g. addition of powdered chalk and/or bromocresol green for increasing the contrast between the colonies and agar. Addition of microbial inhibitors (actidione,  $\beta$ -phenylethanol) allows increasing the selectivity of the medium for lactic acid bacteria. In 1978 the medium was among the EBC methods recommended for detection of lactic acid bacteria in brewery control. In other studies, however, the applicability of sucrose agar for detection of lactic bacteria was challenged – different capacity of utilization of sucrose and other sugars was observed for different species and strains (Leedham and Lawrence, 1979).

MRS agar modified by adding 0.5% maltose (i.e. M+MRS agar) was compared with WLD, standard MRS, UBA and LMD-agars. The medium containing glucose and maltose captured a larger spectrum of lactic bacteria other than the other media and was also more suitable than sucrose agar (Leedham and Lawrence, 1979).

**The NBB medium** was originally developed by Back (1980) as a basic non-specific medium. Its composition was further modified to provide faster results and to allow greater capture of beer-spoiling microorganisms than VLB-S7 (Back et al., 1984). NBB medium was later modified to allow detection of lactic acid bacteria. The carbon sources are glucose and maltose in the same proportion (15 g/l of medium each) and the medium further comprises beer and a pH change indicator (chlorophenol red). Medium NBB is supplied in different variants – ready made, prepared to pour onto Petri dishes (NBB-agar) or into test vessels for determination of lactic acid bacteria in beer (NBB-C concentrate), dehydrated (NBB-P), and in the form suitable for incubation of swab samples (NBB-B-AM). According to Wackerbauer and Rinck (1983) the S7-VLB medium is more selective for beer-spoiling lactic acid bacteria than NBB, which can support the growth of Gram-negative bacteria (e.g. *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Klebsiella* and *Hafnia* ssp.) and yeast. VLB-S7 and NBB are among the media recommended by EBC analytics. A modification of NBB medium was published by Nishikawa and Kohgo (1985). The initial composition of the Back (1980) was modified by replacing sodium acetate (0.2%) with potassium acetate (0.6%). This modification increased the specificity of the medium for beer-spoiling bacteria (Nishikawa and Kohgo, 1985). Kindraka (1987) indicates that the modified NBB medium is more specific and ensures a higher capture of beer-spoiling microorganisms than UBA. In contrast, Crumplen et al. (1988) evaluated both the initial and modified NBB medium to have lower efficiency than UBA.

pro pivu-škodící bakterie (Nishikawa a Kohgo, 1985). Kindraka (1987) uvádí, že modifikované NBB médium je více specifické a má větší záchyt piva škodících mikroorganismů než UBA. Crumplen et al. (1988) naopak vyhodnotili původní i modifikované NBB médium jako méně účinné než UBA.

**Médium LGM** (*Lactobacillus* growth medium; *Lactobacillus* růstové médium) bylo navrženo a porovnáno s dalšími půdami na základě rychlosti růstu a velikosti kolonií bakterií rodu *Lactobacillus* (Van Keer et al., 1983). LGM je komplexní médium s glukosou jako zdrojem uhlíku a bromkresolovou zelení jako indikátorem pH. Růst mléčných bakterií na této půdě je srovnatelný s Raka-Ray 3 (co se týče počtu kolonií z původního inokula), ale u všech testovaných kmenů (33) bylo na LGM agaru dosaženo zkrácení doby inkubace, po které lze vyhodnotit počet kolonií, z 48 na 24 hodin. Půda není selektivní, přidávkem  $\beta$ -fenylethanolu lze zabránit růstu gramnegativních bakterií.

V pivovaru Kirin byla v roce 1981 navržena půda **KL-2B** obsahující maltosu jako zdroj uhlíku, aktidion pro potlačení růstu kvasinek a azid sodný ( $\text{NaN}_3$ ) pro inhibici gramnegativních bakterií. Půda však neumožňovala detekci některých pediokoků a byla proto upravena přidávkem piva (Taguchi et al., 1990). Nové médium **KOT** (Kirin-Ohkochi-Taguchi) obsahovalo 800 ml piva v 1 litru půdy, kromě maltosy také glukosu, a další látky (např. kyselinu jablečnou, či cytidin). Pro zvýšení selektivity pro pivo-škodící mléčné bakterie byl do půdy přidán cysteinhydrochlorid. Při srovnání KOT půdy s původní KL-2B na ní rostlo více kmenů *Pediococcus* a médium KOT bylo vyhodnoceno jako vhodnější pro kontrolu mikrobiologické kvality. V porovnání s půdami NBB a VLB-S7 vykazovala vyšší záchyt pediokokové kontaminace (Taguchi et al., 1990). Půda KL-2B ani KOT nejsou komerčně dostupné. Jejich kompletní složení je uvedeno v práci Taguchi et al. (1990).

Jednou z modifikací MRS půdy je **B-MRS**, kde při přípravě 1000 ml kultivační půdy je k základní MRS přidáno 250 ml piva (Holzapfel 1992, Taskila et al., 2010a). Modifikaci **MRS B+** popisují ve své práci Gillet et al. (2004). Základní MRS půda byla obohacena o cukry, růstové látky a 10% pivo. V porovnání se základní MRS půdou tvořily testovací kmeny rodu *Lactobacillus* a *Pediococcus* větší kolonie a v tekutém médiu měly vyšší růstovou rychlost.

MRS-bujón obsahující pivo byl dále aplikován při stanovení piva škodících mléčných bakterií s použitím tzv. **EnBase systému**, kdy je během kultivace do média kontinuálně přidávána glukosa (Taskila et al., 2009). K aplikaci glukosy je používán dvoufázový gel, ze kterého se do kultivačního média uvolňuje škrob, který je ihned enzymaticky rozkládán na glukosu. Pivo kazící laktobacily (*L. brevis*, *L. backii*, *L. lindneri* a *L. malefermentans*) se v tomto systému pomnožovaly rychleji než při srovnávací kultivaci v B-MRS médiu. Při testování systému na kontaminovaných vzorcích byl u 68 % vzorků spektrofotometricky detekován růst bakterií po 18 hodinách s EnBase a u 50 % vzorků bez enzymatického systému. Po 48 hodinách kultivace byl růst detekován u všech vzorků s i bez EnBase. Při kontrole reálných vzorků piv se v několika vzorcích mléčné bakterie pomnožily pouze při použití EnBase. Výhodou systému EnBase je postupné doplňování glukosy do média během inkubace bez počáteční vysoké koncentrace glukosy, která by mohla buňkám způsobit osmotický šok (Taskila et al., 2009).

Haakensen et al. (2009) použili MRS agar modifikovaný přidávkem piva pro testování techniky gradientu chmelových látek v agaru pro stanovení mléčných bakterií, které vykazují různý stupeň adaptace na podmínky v pivu.

Další modifikací B-MRS bujónu pro stanovení piva škodících mléčných bakterií je tzv. **S-MRS** (supplemented MRS) bujón obsahující L-cystein-HCl a uhlíčan sodný pro snížení obsahu rozpuštěného kyslíku (Taskila et al., 2010a). Při porovnání půdy s B-MRS rostly pivo-škodící *L. brevis* a *L. backii* rychleji v S-MRS, při srovnání na reálných vzorcích piva však bylo pozorováno mírně větší pomnožení bakterií v B-MRS médiu. Pouze u těch vzorků, kde byl přítomen druh *L. brevis* nebo *L. backii*, popřípadě jiný kmen vyžadující snížený obsah rozpuštěného kyslíku v médiu, byl pozorován rychlejší růst kontaminace v S-MRS půdě. Autoři doporučují použití S-MRS bujónu v případě, je-li z nějakého důvodu nepraktická běžná anaerobní kultivace (Taskila et al., 2010a).

Optimalizací složení B-MRS a pozměněním kultivačních podmínek navrhli Taskila et al. (2010b) půdu **PDM** pro detekci piva-škodící bakterie *Pediococcus damnosus*. V porovnání s výchozí B-MRS půdou obsahuje veškeré složky v nižších koncentracích, základní dávkování MRS dehydratované půdy je 40 g/l (v B-MRS půdě 55 g/l). Dále je do půdy PDM přidáván L-cystein hydrochlorid v koncentraci 0,3 mg/l, pH půdy je v porovnání s B-MRS nižší, a to 5,2. Autoři

**LGM medium** (*Lactobacillus* growth medium) was devised and compared with other media on the basis of growth rate and colony sizes of test strains of *Lactobacillus* (Van Keer et al., 1983). LGM is a complex medium with glucose as carbon source and bromocresol green as the pH indicator. The growth of lactic acid bacteria on the medium is comparable with that on Raka-Ray 3 in terms of the number of colonies from the original inoculum. However, with the LGM agar a shortening of the incubation time after which the number of colonies can be evaluated from 48 to 24 hours was achieved in all 33 tested strains. The medium is not selective; addition of  $\beta$ -phenylethanol can inhibit the growth of Gram-negative bacteria.

In 1981 the Kirin brewery designed a KL-2B medium containing maltose as a carbon source, actidione for suppressing the growth of yeasts and sodium azide ( $\text{NaN}_3$ ) to inhibit Gram-negative bacteria. The medium did not allow the detection of some pediococci and was therefore modified by adding beer (Taguchi et al., 1990). The new **KOT medium** (Kirin-Ohkoch-Taguchi) contained 800 ml beer in 1 liter of medium, maltose and glucose, and other substances (e.g. malic acid or cytidine). To increase the selectivity for beer-spoiling lactic acid bacteria the medium was supplemented with cysteine hydrochloride. When compared with the original KL-2B, KOT medium supported the growth of more strains of *Pediococcus* and it was assessed as more suitable for microbiological quality control. Compared with NBB and VLB-S7 media it showed a higher capture of pediococcal contamination (Taguchi et al., 1990). Media KL-2B or OTC are not commercially available. Their complete composition is given in the report by Taguchi et al. (1990).

One of the modifications of the MRS medium is **B-MRS**, in which 250 ml beer is added to 1000 ml of the basic MRS culture medium (Holzapfel, 1992; Taskila et al., 2010a). Modification **MRS B+** was described by Gillet et al. (2004). Basic MRS medium was enriched with sugars, growth substances and 10% beer. Compared to the basic MRS medium the test strains of the genera *Lactobacillus* and *Pediococcus* produced larger colonies, and in liquid medium they had a higher growth rate.

MRS-broth containing beer was further used for the determination of beer-spoiling lactic acid bacteria by using so-called **EnBase system** consisting of continuous addition of glucose into the medium during the cultivation (Taskila et al., 2009). The supply of glucose is done through a biphasic gel which releases starch into the culture media; this is then immediately enzymatically degraded to glucose. Beer-spoilage lactobacilli (*L. brevis*, *L. backii*, *L. lindneri* and *L. malefermentans*) proliferated in this system faster than during the comparative cultivation on B-MRS medium. When testing the system on contaminated samples bacterial growth was spectrophotometrically detected in 68% of the samples after 18 hours with EnBase and in 50% of the samples without enzyme system. After 48 hours of cultivation the growth was detected in all samples, with or without EnBase. When checking real beer samples, lactic acid bacteria propagated in several samples only when using EnBase. The advantage of the EnBase system is a gradual supply of glucose to the medium during the incubation period without an initial high glucose concentration that could cause osmotic shock to the cells (Taskila et al., 2009).

Haakensen et al (2009) used MRS agar modified by the addition of beer for testing of hop-gradient agar plate technique for detection of lactic acid bacteria adapted on the stringent conditions of beer.

Another modification of the B-MRS broth for determination of beer spoilage lactic acid bacteria is the so-called **S-MRS (supplemented MRS)** broth containing L-cysteine-HCl and sodium carbonate to reduce the dissolved oxygen content (Taskila et al., 2010a). On comparing the medium with the B-MRS, beer-spoiling *L. brevis* and *L. backii* grew faster in MRS-S while with real beer samples a slightly higher growth of bacteria was observed in B-MRS medium. Only those samples which contained the species *L. brevis* or *L. backii* or another strain requiring a reduced content of dissolved oxygen in the medium showed faster growth of contamination in S-MRS medium. The authors recommend the use of S-MRS broth in the case when normal anaerobic incubation is for some reason impractical (Taskila et al., 2010a).

By optimizing the composition of B-MRS and modifying culture conditions, Taskila et al. (2010b) designed the **PDM medium** for detection of the beer-spoiling bacterium *Pediococcus damnosus*. In comparison with the initial B-MRS medium, this medium contains all ingredients at lower concentrations. The basic base dosage of dehydrated MRS medium is 40 g/l (55 g/l with B-MRS medium). Furthermore, the PDM medium contains L-cysteine hydrochloride in a concentration of 0.3 mg/l and the pH of the medium (5.2) is lower in comparison with the B-MRS. When detecting *Pediococcus damnosus*, the authors recommend reducing the temperature of cultivation from 29 °C to 27 °C.

doporučují snížit teplotu kultivace při průkazu bakterie *Pediococcus damnosus* z 29 °C na 27 °C.

Americká ASBC doporučuje ke stanovení piva škodících mléčných bakterií piva **BMB** (Barney-Miller Brewery). 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.

Suzuki et al. (2008b) navrhli novou půdu **ABD** (advanced beer-spoiler detection) pro detekci piva škodlivých a hůře kultivovatelných mléčných bakterií *L. paracollinoides* a *L. lindneri*. Půda ABD je založená na bázi piva s přísadkou malého množství MRS (2,61 g/l), dále obsahuje octan sodný pro inhibici gramnegativních bakterií a aktidion pro potlačení růstu kvasinek. Na ABD půdě nerostou mléčné bakterie, které nemají schopnost kazit pivo. ABD půda tak podle autorů umožňuje průkaz piva škodících bakterií ve vzorku, které jsou hůře detekovatelné běžnými půdami jako je MRS, BMB, Raka-Ray a NBB-A. Ve studii Asana et al. (2009) byla půda použita pro identifikaci pomalu rostoucích bakterií *L. lindneri* a *L. paracollinoides* v kombinaci s technikou odečtu mikrokolonií a fluorescenční detekcí. Oproti tomu Taskila et al. (2010a) prezentují porovnání půdy ABD s B-MRS na 19 reálných vzorcích piva a nedoporučují ji k rutinní mikrobiologické kontrole piva a pivovarského provozu.

Preissler et al. (2010) navrhli test umožňující rozlišení kmenů *L. brevis* podle jejich potenciální schopnosti kazit různá piva. Autoři předpokládali, že kmeny s různou tolerancí k iso- $\alpha$ -hořkým kyselínám mají také různou schopnost kazit jednotlivé druhy pív. Jako indikátor buněčné metabolické aktivity kmene v pivu autoři zvolili NADH<sub>2</sub>. Výhodou sledování dehydrogenázové aktivity buněk oproti posuzování viditelného růstu spočívá v tom, že měřitelné koncentrace NADH<sub>2</sub> jsou produkovány buňkami i ve fázi, kdy ještě nelze posoudit nárůst např. ve formě kolonií. Metabolická aktivita byla stanovena pomocí redox indikátoru resazurinu, který má v redukované a oxidované formě různé barvy – pozitivní reakci (tedy pozitivní metabolickou aktivitu bakterií v pivu, která je předpokladem schopnosti kazit pivo) představuje růžová barva redukovaného resazurinu (oxidovaná forma je modrá). Pivo kazičích a nekazičích kmenů *L. brevis* lze touto metodou odlišit za dva dny inkubace v pivu a následné hodinové inkubaci s indikátorem. Proloužení doby inkubace s resazurinem na 24 hod pak umožní odlišit kmeny s nízkou schopností kazit pivo od kmenů nekazičích (Preissler et al., 2010).

Ve studii Denga et al. (2014) byla testována MRS půda modifikovaná přísadkou různých koncentrací katalasy. Přísadka katalasy v koncentraci 800 U/Petriho misku urychlil dobu detekce kolonií *L. plantarum*, *L. acetotolerans* a *P. damnosus* až o několik dní. Katalasa je enzym vyskytující se téměř ve všech organismech vystavených působení kyslíku – katalyzuje rozklad volných radikálů a peroxidu vodíku a chrání tak organismy před oxidativním stresem při vyšších tenzích kyslíku. Přísadka katalasy do růstových médií zabraňuje inhibici anaerobních/fakultativně anaerobních mikroorganismů vlivem foto-oxidace složek půdy (Hoffman et al., 1983). Při porovnání půdy bez katalasy a s katalasou byly na modifikované variantě MRS při použití stejného inokula z piva a po stejné době inkubace pozorovány větší počty kolonií a tyto kolonie měly větší průměr nežli na půdě bez katalasy. Autoři upozorňují na postupnou ztrátu účinnosti katalasy v hotové půdě již po dvou dnech skladování při teplotě 2 °C; misky je tedy nutné připravovat vždy čerstvé (Deng et al., 2014).

## 4 ZÁVĚR

Na téma detekce bakterií mléčného kvašení s použitím různých kultivačních půd bylo publikováno velké množství prací. Některé z nich jsou koncipovány přímo jako srovnávací studie, např. často citované práce Caseyho a Ingledewa (1981) a Jespersena a Jakobsena (1996). Výsledky srovnávacích studií jsou často velmi rozdílné a některé si přímo odporují (např. Matsuzawa et al., 1979; Suzuki et al., 2008b).

Jak vyplývá z přehledu vývoje půd pro detekci bakterií mléčného kvašení v pivu, jejich běžnou součástí je kvasničný extrakt, dále cukr (nejčastěji glukosa), pepton, masový extrakt, Tween 80 a různé organické a anorganické soli. Média mají různá pH, v rozmezí 4,8–6,8, a u některých je složkou pivo (v množství 25–100 %). Běžnou složkou půd bývá L-cysteinhydrochlorid, který snižuje redoxpotenciál média. Může být nahrazen/doplňen např. kyselinou askorbovou nebo thioglykolátem sodným. Půda Raka-Ray je jediná, která obsahuje osmoprotekční látku, která snižuje osmotický stres prostředí.

Nejběžněji používanými půdami jsou MRS a NBB, buď ve standardním složení, nebo různě modifikované a také v kombinaci s dal-

American ASBC recommended **BMB medium** (Barney Miller Brewery) for determining beer spoilage lactic acid bacteria. The medium contains tomato juice, maltose, beer and L-cysteine-HCl (Barney et al., 1990). Crumplen et al. (1991) showed in their comparative study that lactic acid bacteria grow faster on BMB than on MRS, NBB and KOT.

Suzuki et al. (2008b) proposed a new **ABD (advanced beer-spoiler detection) medium** for the detection of beer-spoiling and less cultivable lactic acid bacteria *L. paracollinoides* and *L. lindneri*. The medium is based on beer with the addition of small quantities of MRS (2.61 g/l), and comprises also sodium acetate for inhibition of Gram-negative bacteria and actidione for suppressing the growth of yeasts. ABD-medium does not support the growth of lactic acid bacteria which do not spoil beer. According to the authors ABD medium allows the detection of beer spoilage bacteria in the sample that are harder to detect by conventional media such as MRS, BMB, Raka-Ray and NBB-A. Asano et al. (2009) used the ABD-medium in combination with microcolony method and fluorescent detection for identification of slowly-growing bacteria *L. lindneri* and *L. paracollinoides*. In contrast, Taskila et al. (2010a) published a comparison of ABD medium with B-MRS on 19 real samples of beer and did not recommend it for routine microbiological control in beer and brewing operation.

Preissler et al. (2010) proposed a test that enables the discrimination of *L. brevis* strains according to their ability to spoil different beers. Authors assumed that strains with different tolerance to iso- $\alpha$ -acids also possess different ability to spoil various kinds of beer. NADH<sub>2</sub> was used as an indicator of cellular metabolic activity of the strain in beer. To evaluate the beer-spoilage ability of the *L. brevis* strains. Resazurin was used as a redox indicator, which enabled the detection of the metabolic activity of the spoilage bacterial strains in beer before the occurrence of visible colonies (NADH<sub>2</sub> is produced by dehydrogenase activity, before visible growth occurs). Resazurin has a different colour in its reduced and oxidized forms – positive reaction (i.e. positive metabolic activity of bacteria in beer that is a prerequisite of their ability to spoil beer) is represented by pink colour of reduced resazurin (oxidized form is blue). Beer-spoiling and non-spoilers strains of *L. brevis* can be discriminated in two days of incubation in beer followed by 1 hour of incubation with the indicator. Extended incubation (24 hours) with resazurin allows for discriminating even strains with low ability to spoil beer from non-spoilers (Preissler et al., 2010).

Deng et al. (2014) tested MRS medium modified by the addition of various concentrations of catalase. Addition of catalase at a concentration of 800 U/plate for accelerated the detection of colonies of *L. plantarum*, *L. acetotolerans* and *P. damnosus* by several days. Catalase is an enzyme found in nearly all organisms exposed to oxygen – it catalyzes the decomposition of free radicals and hydrogen peroxide and thus protects organisms from oxidative stress at higher partial pressures of O<sub>2</sub>. Addition of catalase to growth media prevents the inhibition of anaerobic/facultative anaerobic microorganisms due to photo-oxidation of medium components (Hoffman et al., 1983). Using the same inoculum from beer and the same incubation period, the modified variant of MRS with catalase produced a greater number of colonies, and these colonies had greater diameter, than on the medium without catalase. The authors pointed out the gradual loss of effectiveness of catalase in the finished medium after two days of storage at 2 °C; the plates therefore have to be prepared always fresh (Deng et al., 2014).

## 4 CONCLUSIONS

Detection of lactic acid bacteria on/in various culture media is the subject of many publications. Some of them are conceived directly as comparative studies, e.g. the frequently cited reviews by Casey and Ingledew (1981) and Jespersen a Jakobsen (1996). The results of comparative studies are often very different and some of them are even conflicting (e.g. Matsuzawa et al., 1979; Suzuki et al., 2008b).

As seen from the survey of culture media for detection of lactic acid bacteria in beer their common component is yeast extract, sugar (mostly glucose), peptone, meat extract, Tween 80 and various organic and inorganic salts. The media have various pH, within the range of 4.8–6.8, some of them contain beer (in 25–100% concentration); L-cysteine hydrochloride (and/or ascorbic acid and sodium thioglycollate) is often used for lowering the redox-potential of the media. Raka-Ray is the only medium containing an osmoprotective compound lowering the osmotic stress of the environment.

MRS and NBB media, in their standard or modified forms and also in combination with other detection techniques (e.g. PCR), are

šími detekčními technikami (např. PCR). Z uvedené rešerše vyplývá, že žádné z kultivačních médií nemožňuje zachyt všech mléčných bakterií, které se mohou vyskytnout jako kontaminace piva. Je to dáno značnou variabilitou této skupiny mikroorganismů, jejich růstovými požadavky (anaerobní/mikroaerofilní podmínky, růst při nižších teplotách atd.) a zejména adaptací na podmínky prostředí, z něhož jsou na daná média očkována (pivo).

#### PODĚKOVÁNÍ

Výsledky byly získány s využitím institucionální podpory Ministerstva zemědělství ČR na dlouhodobý koncepční rozvoj VÚPS – Výzkum kvality a zpracování sladařských a pivovarských surovin (RO1914) a podpory Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy ČR – Výzkumné sensorické centrum v Praze a Výzkumná a vývojová vlna – udržitelnost a rozvoj (LO1312).

#### LITERATURA / REFERENCES

- Asano, S., Suzuki, K., Iijima, K., Motoyama, H., Kuriyama, H., Kitagawa, Y., 2007: Effect of morphological changes in beer-spoilage lactic acid bacteria on membrane filtration in breweries. *J. Biosci. Bioeng.* 104: 334–338. DOI: 10.1263/jbb.104.334.
- Asano, S., Iijima, K., Suzuki, K., Motoyama, Y., Ogata, T., Kitagawa, Y., 2009: Rapid detection and identification of beer-spoilage lactic acid bacteria by microcolony method. *J. Biosci. Bioeng.* 108: 124–129. DOI: 10.1016/j.jbiosc.2009.02.016.
- 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., 1987: New description of a type of *Lactobacillus* harmful to beer-*Lactobacillus brevisimilis* spec. nov. *Monatsschr. Brauwiss.*, 40: 484–488.
- Back, W., 1994: Secondary contaminations in the filling area. *Brauwelt Int.*, 12: 326–333.
- Back, W., 2003: Biofilme in der Brauerei und Getränkeindustrie – 15 Jahre Praxiserfahrung. *Brauwelt* 24/25: 766–777.
- Back, W., 2005: Brewery. In: Back W. (Ed.), *Colour atlas and handbook of beverage biology*. Verlag Hans Carl, Nürnberg, Germany, pp. 10–112.
- Back, W., Bohak, I., Ehrmann, M., Ludwig, W., Schleifer, K. H., 1996: Revival of the species *Lactobacillus lindneri* and the design of a species specific oligonucleotide probe. *Syst. Appl. Microbiol.*, 19: 322–325. DOI:10.1016/S0723-2020(96)80058-0.
- Back, W., Leibhard, M., Bohak, I., 1992: Flash pasteurization – membrane filtration. Comparative biological safety. *Brauwelt Int.* 1: 42–49.
- 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.
- Boatwright, J., Kirsop, B. H., 1976: Sucrose agar—a growth medium for spoilage organisms. *J. Inst. Brew.* 82: 343–346. DOI: 10.1002/j.2050-0416.1975.tb06960.x.
- Bohak, I., Back, W., Richter, L., Ehrmann, M., Ludwig, W., Schleifer, K. H., 1998: *Lactobacillus amylolyticus* sp. nov., isolated from beer malt and beer wort. *Syst. Appl. Microbiol.* 21: 360–364. DOI:10.1016/S0723-2020(98)80045-3.
- Bohak, I., Thelen, K., Beimfohr, C., 2006: Description of *Lactobacillus backii* sp. nov., an obligate beer-spoiling bacterium. *Monatsschr. Brauwiss.* 59: 78–82.
- Bokulich, N. A., Bamforth, C. W., 2013: The microbiology of malting and brewing. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 77:157–172. DOI: 10.1128/MMBR.00060-12.
- Boulton, C., Quain, D., 2001: *Brewing yeast and fermentation*. 1st edition, Blackwell Science Ltd., London, England.
- 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., Hjortshøj, 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.
- Dobson, C. M., Deneer, H., Lee, S., Hemmingsen, S., Glaze, S., Ziola, B., 2002: Phylogenetic analysis of the genus *Pediococcus*, including *Pediococcus clausenii* sp. nov., a novel lactic acid bacterium isolated from beer. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52: 2003–2010. DOI: 10.1099/ijs.0.02191-0.
- Ehrmann, M. A., Preissler, P., Danne, M., Vogel, R. F., 2010: *Lactobacillus paucivorans* sp. nov., isolated from a brewery environment. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 60: 2353–2357. DOI: 10.1099/ijs.0.018077-0.
- Emeis, C. C., 1969: Methoden der brauereibiologischen Betriebskontrolle. III. VLB-S7 agar zum Nachweis bierschädlicher Pediokokken. *Monatsschr. Brau.* 22: 8–11.
- Eto, M., Nakagawa, A., 1975: Identification of a growth factor in tomato juice for a newly isolated strain of *Pediococcus cerevisiae*. *J. Inst. Brew.*, 81(3): 232–236. DOI: 10.1002/j.2050-0416.1975.tb03683.x.
- European Brewery Convention, 2011: Detection of contaminants, Section 4. In *Analytica-Microbiologica-EBC 2nd edn.* ed. EBC Microbiology Subcommittee. Nürnberg: Verlag Hans Carl.
- Fischborn, T., 2009: HLP medium for the detection of lactic acid bacteria (International Method). *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 247–248. DOI:10.1094/ASBCJ-2009-1006-01.
- Funahashi, W., Suzuki, K., Ohtake, Y., Yamashita, H., 1998: Two novel beer-spoilage *Lactobacillus* species isolated from breweries. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 56: 64–69. DOI: 10.1094/ASBCJ-56-0064.
- Gillet, A., Dupuche, M. H., Velings, N., 2004: Supplementation to the MRS medium for the cultivation of fastidious beer spoilage bacteria. *Kvasny Prum.* 50(7–8): 221–223.
- Green, S. R., Gray, P. P., 1950: Wallerstein Laboratories Communications 13: 357.
- Haakensen, M., Schubert, A., Ziola, B., 2009: Broth and agar hop-gradient plates used to evaluate the beer-spoilage potential of *Lactobacillus* and *Pediococcus* isolates. *Int. J. Food Microbiol.* 130: 56–60. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2009.01.001.
- Hammes, W. P., Hertel, C., 2009: Genus I. *Lactobacillus*. In: De Vos, P., Garrity, G. M., Jones, D., Krieg, N. R., Ludwig, W., Rainey, F. A., Schleifer, K. H., Whitman, W. B., editors. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. 2nd ed. Vol. 3. New York (NY): Springer. p. 465–511.
- Hammes, W. P., Vogel, R. F., 1995: The genus *Lactobacillus*. In: Wood, B. J. B., Holzapfel, W. H. (editors). *The lactic acid bacteria*. Vol. 2. The genera of lactic acid bacteria. Black & London, 19 54.



- 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.
- Hogg, S., 2005: *Essential Microbiology* (1st ed.). Wiley. pp. 99–100, 118–148.
- Hollerová, I., Kubizniaková, P., 2002: Monitoring gram-positive bacterial contamination in Czech breweries. *Kvasny Prum.* 48: 309–313.
- 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.
- Holzappel, W. H., Franz, M. A. P., Ludwig, W., Dicks, L. M. T., 2009: Genus III. *Pediococcus*. In: De Vos, P., Garrity, G. M., Jones, D., Krieg, N. R., Ludwig, W., Rainey, F. A., Schleifer, K. H., Whitman, W. B., editors. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. 2nd ed. Vol. 3. New York (NY): Springer. p. 513–520.
- Hsu, W. P., Taparowsky, J. A., Brenner, M. W., 1975: Two new media for culturing of brewery organisms. *Brewer's Dig.* 50: 52–57.
- Chaban, B., Dobson, C. M., Whiting, M. S., Bjarnason, J., Ziola, B., 2002: Immunoblotting used for identification of beer spoilage pediococci including the new species *Pediococcus clausenii*. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 60: 170–175. DOI: 10.1094/ASBCJ-60-0170.
- Inoue, T., 2008: *Diacetyl in Fermented Foods and Beverages*. American Society of Brewing Chemists: St. Paul, pp. 72–75.
- 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.
- Kalač, P., Křížek, M., 2003: A review of biogenic amines and polyamines in beer. *J. Inst. Brew.* 109: 123–128. DOI: 10.1002/j.2050-0416.2003.tb00141.x.
- 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.
- Lawrence, D. R., Leedham, P. A., 1979: The detection of lactic acid bacteria. *J. Inst. Brew.* 85(2): 119–121. DOI: 10.1002/j.2050-0416.1979.tb06839.x.
- Lee, S. Y., Jandgaard, O., Coors, J. H., 1975: Lee's Multi-Differential Agar (LMDA); a culture medium for enumeration and identification of brewing bacteria. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 33: 18–25.
- Lewis, D., 1998: Biological mash and wort acidification. *The New Brewer* 15: 36–45.
- Matsuzawa, K., Kirchner, G., Wackerbauer, K., 1979: Vergleichende Untersuchungen mit bekannten Nährböden zum Nachweis bierschädlicher Milchsäurebakterien. *Monatss. Brau.* 32: 312–318.
- McCaig, R., Weaver, R. L., 1983: Physiological studies on *Pediococcus*. *Tech. Q. Master Brew. Assoc. Am.* 20(1): 31–38.
- Nakagawa, A., 1964: A simple method for the detection of beer-sarcinae. *Bull. Brew. Sci.* 10: 7–10.
- Nakagawa, A., Kitahara, K., 1959: Taxonomic studies on the genus *Pediococcus*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 5: 95–126. DOI: 10.2323/jgam.5.95.
- Narendranath, N. V., Hynes, S. H., Thomas, K. C., Ingledew, W. M., 1997: Effects of lactobacilli on yeast-catalyzed ethanol fermentations. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 4158–4163.
- Nishikawa, N., Kohgo, M., 1985: Microbial control in the brewery. *MBAA T.Q.* 22: 61–66.
- Oliver, J. D., 2005: The viable but nonculturable state in bacteria. *J. Microbiol.* 43: 93–100.
- Olšovská, J., Matoulková, D., Čejka, P., Jurková, M.: Beer and health. *Kvasny Prum.* 60(7–8): 174–181, 2014.
- O'Sullivan, T. F., Walsh, Y., O'Mahony, A., Fitzgerald, G. F., van Sinderen, D., 1999: A comparative study of malthouse and brewhouse microflora. *J. Inst. Brew.* 105: 55–61. DOI: 10.1002/j.2050-0416.1999.tb00006.x.
- Priest, F. G., 2003: Gram-positive brewery bacteria. In: *Brewing Microbiology* 3rd ed., Priest, F. G., Campbell, I., Eds. Kluwer Academic/Plenum Publishers: New York, pp. 181–217.
- Preissler, P., Behr, J., Vogel, R. F., 2010: Detection of beer-spoilage *Lactobacillus brevis* strains by reduction of resazurin. *J. Inst. Brew.* 116: 399–404. DOI: 10.1002/j.2050-0416.2010.tb00790.x.
- Russell, C., Walker, T. K., 1953: *Lactobacillus malefermentans* n.sp. isolated from beer. *J. Gen. Microbiol.* 8: 160–162. DOI: 10.1099/00221287-8-1-160.
- 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.
- Sakamoto, K., Konings, W. N., 2003: Beer spoilage bacteria and hop resistance. *Int. J. Food Microbiol.* 89: 105–124. DOI:10.1016/S0168-1605(03)00153-3.
- Sedláček, I., 2007: *Taxonomie prokaryot*. 1. vydání, Masarykova univerzita, Brno.
- Simpson, W. J., Taguchi, H., 1995: The genus *Pediococcus*, with notes on the genera *Tetragenococcus* and *Aerococcus*. In: Wood, B. J. B., Holzappel, W. H. (editors), *The lactic acid bacteria*. Vol. 2. The genera of lactic acid bacteria. Blackie Academic and Professional, London, 125–172.
- Storgårds, E., Suihko, M. L., Pot, B., Vanhonacker, K., Janssens, D., Broomfield, P. L. E., Banks, J. G., 1998: Detection and identification of *Lactobacillus lindneri* from brewing environments. *J. Inst. Brew.* 104: 46–54. DOI: 10.1002/j.2050-0416.1998.tb00974.x.
- Suzuki, K., 2011: 125th Anniversary Review: Microbiological instability of beer caused by spoilage bacteria. *J. Inst. Brew.* 117: 131–155. DOI: 10.1002/j.2050-0416.2011.tb00454.x.
- Suzuki, K., Asano, S., Iijima, K., Kitamoto, K., 2008a: Sake and beer spoilage lactic acid bacteria—a review. *J. Inst. Brew.* 114: 209–223. DOI: 10.1002/j.2050-0416.2008.tb00331.x.
- 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.
- Suzuki, K., Iijima, K., Asano, S., Kuriyama, H., Kitagawa, Y., 2006a: Induction of viable but nonculturable state in beer spoilage lactic acid bacteria. *J. Inst. Brew.* 112: 295–301. DOI: 10.1002/j.2050-0416.2006.tb00734.x.
- Suzuki, K., Iijima, K., Sakamoto, K., Sami, M., Yamashita, H., 2006b: A review of hop resistance in beer spoilage lactic acid bacteria. *J. Inst. Brew.* 112: 173–191. DOI: 10.1002/j.2050-0416.2006.tb00247.x.
- Šavel, J., 1980: *Mikrobiologická kontrola v pivovarech*. 1. vyd. Praha: SNTL, 184 s.
- Taguchi, H., Ohkochi, M., Uehara, H., Kojima, K., Mawatari, M., 1990: KOT medium, a new medium for the detection of beer spoilage lactic acid bacteria. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 48: 72–75. DOI: 10.1094/ASBCJ-48-0072.
- Taskila, S., Neubauer, P., Tuomola, M., Breitenstein, A., Kronlöf, J., Hillukkala, T., 2009: Improved enrichment cultivation of beer spoiling lactic acid bacteria by continuous glucose addition to the culture. *J. Inst. Brew.* 115: 177–182. DOI: 10.1002/j.2050-0416.2009.tb00366.x.
- 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.
- Taskila, S., Kronlöf, J., Ojamo, H., 2011: Enrichment cultivation of beer-spoiling lactic acid bacteria. *J. Inst. Brew.*, 117: 285–294. DOI: 10.1002/j.2050-0416.2011.tb00473.x.
- Van Keer, C., Van Melkebeke, L., Vertriest, W., Hoozee, G., Van Schoonenberghe, E., 1983: Growth of *Lactobacillus* species on different media. *J. Inst. Brew.* 89(5): 361–363. DOI: 10.1002/j.2050-0416.1983.tb04203.x.
- Vaughan, A., O'Sullivan, T., van Sinderen, D., 2005: Enhancing the microbiological stability of malt and beer—a review. *J. Inst. Brew.* 111: 355–371. DOI: 10.1002/j.2050-0416.2005.tb00221.x.
- Wackerbauer, K., Rinck, M., 1983: Über den Nachweis von bierschädlichen Milchsäurebakterien. *Monatsschr. Brauwiss.*, 36(10): 392–395.
- 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.