

DOI: 10.18832/kp201813

# Brewing Microbiology – Bacteria of the Genera *Bacillus*, *Brevibacillus* and *Paenibacillus* and Cultivation Methods for their Detection – Part 1

## Mikrobiologie pivovarské výroby – bakterie rodů *Bacillus*, *Brevibacillus* a *Paenibacillus* a kultivační metody pro jejich detekci – 1. část

Martina BROŽOVÁ, Petra KUBIZNIAKOVÁ, Dagmar MATOULKOVÁ

Department of Microbiology, Research Institute of Brewing and Malting, Lípová 15, 120 44 Praha, Czech Republic  
Mikrobiologické oddělení, Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, a.s., Lípová 15, 120 44 Praha  
e-mail: brozova@beerresearch.cz

Reviewed paper / Recenzovaný článek

**Brožová, M., Kubizniaková, P., Matoulková, D., 2018: Brewing microbiology – bacteria of the genera *Bacillus*, *Brevibacillus* and *Paenibacillus* and cultivation methods for their detection – Part 1. Kvasny Prum. 64(2): 50–57**

Bacteria of the genus *Bacillus* are often detected in brewing operations, but they rank among less hazardous contaminants. They are not able to survive in the vegetative form in beer and spoil it. Spores of *Bacillus* bacteria are present especially in malt and grain adjuncts. They are able to survive wort boiling, however in the following phases they are not able to germinate because of their sensitivity to bitter hop substances and low pH of fermenting wort and finished beer. We provide here an overview of basic morphological and physiological properties of these bacteria and describe their importance in brewing process. Particular attention is given to species *B. cereus* and *B. licheniformis* for which has been proved the presence of the *horA* gene, which is associated with resistance of lactic acid bacteria to hop substances. Species *Brevibacillus brevis* and *Paenibacillus macerans*, which were previously included in the genus *Bacillus*, are also described.

**Brožová, M., Kubizniaková, P., Matoulková, D., 2018: Mikrobiologie pivovarské výroby – bakterie rodů *Bacillus*, *Brevibacillus* a *Paenibacillus* a kultivační metody pro jejich detekci – 1. část. Kvasny Prum., 64(2): 50–57**

Bakterie rodu *Bacillus* jsou v pivovarských provozech často detekovány, řadí se však mezi méně rizikové kontaminanty. Ve vegetativní formě nejsou schopné přežít v pivu a nekazí ho. Spory bakterií *Bacillus* jsou přítomny zejména ve sladu a obilných náhražkách sladu, přežijí chmelovar, ale v navazujících fázích výroby piva nevyklíčí – jsou citlivé na hořké chmelové látky a nízké pH kvasící mladiny a hotového piva. V publikaci jsou popsány základní morfologické a fyziologické vlastnosti těchto bakterií, je zde popsán jejich význam v procesu výroby piva. Zvláštní pozornost je věnována druhům *B. cereus* a *B. licheniformis*, u kterých byla prokázána přítomnost genu *horA*, který je spojován s rezistencí bakterií mléčného kvašení k chmelovým látkám. Publikace se dále věnuje druhům *Brevibacillus brevis* a *Paenibacillus macerans*, které byly dříve řazeny do rodu *Bacillus*.

**Keywords:** aerobic/facultative anaerobic bacteria, *Bacillus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus licheniformis*, *Brevibacillus*, contamination of malt and beer, *Paenibacillus***Klíčová slova:** aerobní/fakultativně anaerobní bakterie, *Bacillus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus licheniformis*, *Brevibacillus*, kontaminace sladu a piva, *Paenibacillus*

## 1 INTRODUCTION

Bacteria of the genus *Bacillus* are generally considered to be hazardous contaminants of various foods and food ingredients (meat, vegetables, milk, cereals). Due to their frequent occurrence in nature and thermoresistant spores, they enter the brewing operation mostly with raw materials (water, malt, hop). *Bacillus* bacteria are able to survive mashing and wort boiling, therefore they can also be found in finished beer (Back, 2005; Vaughan et al., 2005). However, in most species their following growth in beer is inhibited by bitter hop products and acid pH (Back, 2005; Basařová et al., 2010). Generally, they are not considered hazardous brewing contaminants, due to their inability to grow in beer, nor after adaptation to outer conditions, and the fact that they do not affect biological stability of finished beer. Undesirable is the ability of some bacilli to reduce nitrates to nitrites that may cause the formation of N-nitrosamines in beer (Back, 2005; Bokulich and Bamforth, 2013; Briggs et al., 2004).

## 2 GENERAL CHARACTERISTICS OF GENUS *BACILLUS*

Bacteria of the genus *Bacillus* are aerobic or facultative anaerobic, Gram-positive, mostly catalase-positive and sporogenous. Cells are rod-shaped with rounded or straight ends. In later stages of growth some species may have Gram-variable character. *Bacillus* cells occur singly, in pairs, or in shorter chains. The width and the length of cells are in the range of 0.4–1.8  $\mu\text{m}$  and 0.9–10  $\mu\text{m}$  (Logan and De Vos, 2015a; Šilhánková, 2002). The genus name is derived from the latin word „bacillus“ which means a small rod (Logan and De Vos, 2015a).

Representatives of the genus *Bacillus* are mostly motile by means of lateral (i.e. only on one side of the cell) or more often peritrichous (i.e. over the cell surface) flagella (Logan and De Vos, 2015a;

## 1 ÚVOD

Bakterie rodu *Bacillus* jsou obecně považovány za rizikové kontaminanty různých potravin a potravinářských surovin (maso, zelenina, mléko, obilniny). Díky svému hojnému výskytu v přírodě a termorezistenci spor se dostávají do prostředí pivovarských provozů většinou se vstupními surovinami (voda, slad, chmel). Bakterie rodu *Bacillus* jsou schopny přežít rmutování i chmelovar a mohou tak být nalezeny i v hotovém pivu (Back, 2005; Vaughan et al., 2005). Jejich následný růst v pivu je však u většiny druhů inhibován hořkými chmelovými látkami a kyselým pH (Back, 2005; Basařová et al., 2010). Díky neschopnosti růstu v pivu ani po adaptaci na vnější podmínky a faktu, že neovlivňují biologickou stabilitu hotového piva, nejsou považovány za rizikové pivovarské kontaminanty. Nežádoucí je schopnost některých bacilů redukovat dusičnany na dusitany, které mohou být příčinou vzniku N-nitrosaminů v pivu (Back, 2005; Bokulich a Bamforth, 2013; Briggs et al., 2004).

## 2 OBECNÁ CHARAKTERISTIKA RODU *BACILLUS*

Bakterie rodu *Bacillus* jsou aerobní či fakultativně anaerobní, gram pozitivní, většinou katalasa pozitivní, sporulující bakterie tyčinkového tvaru se zakulacenými nebo rovnými konci. Starší buňky v kultuře mohou u některých druhů vykazovat gramvariabilní charakter. Buňky bacilů se vyskytují samostatně, v párech či v kratších řetězcích. Šířka a délka buněk se pohybuje v rozmezí 0,4–1,8  $\mu\text{m}$  a 0,9–10  $\mu\text{m}$  (Logan a De Vos, 2015a; Šilhánková, 2002). Název rodu je odvozen od latinského výrazu „bacillus“ pro malou tyčinku (Logan a De Vos, 2015a).

Zástupci rodu *Bacillus* jsou většinou pohybliví prostřednictvím bičíků umístěných laterálně (tj. pouze na jedné straně buňky) nebo častěji peritrichálně (tj. po celém povrchu buňky) (Logan a De Vos,

Šilhánková, 2002). Spores are formed inside cells (endospores), they may be located centrally, paracentrally, subterminally, terminally or laterally. Only one endospore is always formed – bacteria form it during growth, but also e.g. when some essential nutrients are lacking in the environment (sporulation of bacilli is not related to reproduction, contrary to sporulation of yeasts and molds). The germination of spores of most *Bacillus* species takes place without any activating factors. Based on the shape of the spore and the maternal cell, *Bacillus* species are divided into three morphological groups (Sedláček, 2017).

Most species grow in common cultivation media such as nutrient or blood agar. Colonies of bacilli are very variable in terms of morphology, size and coloring. Large differences are observed between but also within species. The composition of the cultivation medium and cultivation conditions have a large influence. Some representatives produce pigments or capsules (Logan and De Vos, 2015a). This variability is often used for their identification. An example is the use of *Bacillus* differentiation agar for microbiological control of sugar syrups. On this medium *B. cereus* forms colorless colonies while the colonies of *B. subtilis* are yellow (Hill et al., 2015).

The genus *Bacillus* has a variety of physiological properties – it also includes psychrophilic, mesophilic and thermophilic representatives. In relation to pH bacilli are halophilic, acidophilic and alkaliphilic (Turnbull, 1996). Optimal growth temperature is within a range of 15–55 °C. Bacilli ranks among microorganisms with chemoheterotrophic metabolism, only two species being facultative chemolithotrophic. Bacteria of the genus *Bacillus* are mostly isolated from soil or from environment which is directly or indirectly in contact with soil, i.e. from water, food, food waste, and human clinical specimens (Logan and De Vos, 2015a).

The genus *Bacillus* is very widespread in nature, due to the unusual resistance of endospores, antibiotic formation, formation of mucous capsules, and entomopathogenic effects (i.e. the ability to induce insect disease). Endospores of genus *Bacillus* are one of the most resistant life forms, which are resistant to high temperatures, radiation, disinfectants, drying and other adverse effects. Species of this genus are equipped with rich enzyme system (pectolytic, proteolytic, amyolytic enzymes). These enzymes are used in a wide range of industries (brewing industry, textile industry, starch industry, detergents production, sugar industry, etc.). Many species also produce antibiotics during sporulation, which is used in the industrial production of bacitracin or polymyxin (Šilhánková, 2002; Turnbull, 1996). Due to their resistance they may be undesirable and problematically removable contaminants of operating rooms, pharmaceutical products or food (Logan and De Vos, 2015a).

Most of the representatives of genus *Bacillus* are not pathogenic nor potentially pathogenic and they are rarely associated with human or animal disease. An exception is *Bacillus anthracis*, which is the cause of anthrax. Some other *Bacillus* species may cause food poisoning. The most common cause of food poisoning is *Bacillus cereus*, which produces toxins in the course of growth on polysaccharide substrates. The food poisoning occurs when a consumer consumes a food containing 10<sup>7</sup> cells per g of food (Logan and De Vos, 2015a; Šilhánková, 2002).

Important is the use of some bacilli in agriculture and food industry. The *Bacillus thuringiensis* synthesizes toxins with effects on certain species of insects. Genes responsible for the synthesis of these toxins were used in the preparation of transgenic „Bt“ plants (cereals, potatoes, cotton, tomatoes, soy, corn). The effects of „Bt“ genes are directed against larval stages of insects (beetles, butterflies, aphids, mosquitoes, flies, etc.). Some *Bacillus* species (e.g. *B. sphaericus*) are also used as an active ingredient in microbial pesticides. The use of these bacteria in agricultural production has increased crops yield (Betz et al., 2000; Turnbull, 1996). *Bacillus subtilis* subsp. *globigii* is generally used to verify the effectiveness of alternative sterilization and fumigation processes, due to its high resistance to chemical and physical agents (Turnbull, 1996).

The genus *Bacillus* currently contains 95 species. The current classification, see Table 1, is based on gene analysis for 16S rRNA sequences. This method has revealed a significant phylogenetic heterogeneity of the *Bacillus* genus and therefore some of the representatives were reclassified to new genera and even to new families. We can mention some bacteria which are interesting from the brewer's point of view – e.g. „*Bacillus brevis*“ (now *Brevibacillus brevis*, family *Paenibacillaceae*) and „*Bacillus macerans*“ (now *Paenibacillus macerans*) (Logan and De Vos, 2015a).

2015a; Šilhánková, 2002). Spory jsou vytvářeny uvnitř buněk (endospory), umístěny mohou být centrálně, paracentrálně, subterminálně, terminálně nebo laterálně. Vytvářena je vždy jedna endospora – jde o klidovou formu, kterou bakterie vytvářejí během růstu, ale také např. po vyčerpání některé esenciální živiny z prostředí (sporulace u bacilů nesouvisí s rozmnožováním, jako např. u kvasinek a plísní). Klíčení spor většiny druhů rodu *Bacillus* probíhá bez jakýchkoliv aktivizačních faktorů. Na základě tvaru spory a mateřské buňky se druhy rodu *Bacillus* dělí do tří morfologických skupin (Sedláček, 2017).

Většina druhů roste na běžných kultivačních půdách (např. maso-peptonový nebo krevní agar). Kolonie bacilů jsou velmi variabilní, pokud se týká morfologie, velikosti i zbarvení, velké rozdíly jsou pozorovány mezi jednotlivými druhy, ale i v rámci druhů. Významný vliv má složení kultivačního média a podmínky kultivace. Někteří zástupci produkují pigmenty nebo pouzdra (Logan a De Vos, 2015a). Těto variability se často využívá při mikrobiologické identifikaci. Jako příklad lze uvést použití *Bacillus* differentiation agaru používaného pro mikrobiologickou kontrolu cukerných sirupů, na kterém *B. cereus* tvoří bezbarvé kolonie, zatímco *B. subtilis* kolonie žluté (Hill et al., 2015).

Rod *Bacillus* má rozmanité fyziologické vlastnosti – zahrnuje psychrofilní, mesofilní i termofilní zástupce, ve vztahu k pH jsou bacily halofilní, acidofilní a alkalifilní (Turnbull, 1996), optimální růstová teplota je 15–55 °C. Bacily se řadí mezi mikroorganismy s chemoheterotrofním metabolismem, pouze dva druhy jsou fakultativně chemolitotrofní. Bakterie rodu *Bacillus* jsou izolovány z půdy nebo z prostředí, která jsou s půdou v přímém či nepřímém kontaktu, vody, potravin, odpadů potravinářských výrobníků a humánních klinických vzorků (Logan a De Vos, 2015a).

Díky neobvyklé odolnosti endospor, tvorbě antibiotik, tvorbě slizovitých pouzder a entomopatogenním účinkům (tj. schopnosti vyvolat onemocnění hmyzu) je rod *Bacillus* v přírodě velmi rozšířený. Endospory rodu *Bacillus* tvoří jednu z nejodolnějších dosud poznáných životních forem, které jsou rezistentní vůči vysokým teplotám, záření, desinfekčním prostředkům, vysušení a jiným nepříznivým vlivům. Druhy tohoto rodu jsou vybaveny bohatým enzymovým aparátem (pektolytické, proteolytické, amyolytické enzymy), které jsou využívány v celé řadě odvětví (pivovarský průmysl, textilní průmysl, škrobárenský průmysl, výroba detergentů, cukrovarský průmysl atd.). Řada druhů produkuje ve stádiu sporulace látky s antibiotickými účinky, čehož je využíváno při průmyslové výrobě bacitracinu či polymyxinu (Šilhánková, 2002; Turnbull, 1996). Díky své rezistenci mohou být nežádoucími a problematicky odstranitelnými kontaminanty operačních místností, farmaceutických produktů i potravin (Logan a De Vos, 2015a).

Většina zástupců rodu *Bacillus* není patogenní ani potenciálně patogenní a jsou jen zřídka spojovány s onemocněním člověka či zvířat. Výjimkou je *Bacillus anthracis*, který je původcem onemocnění antraxu čili sněti slezinné. Některé další druhy rodu *Bacillus* mohou způsobit otravu z potravin. Nejčastějším původcem potravinových otrav je *Bacillus cereus*, který produkuje toxiny při růstu na polysaccharidových substrátech. K otravám poté dochází, pokud konzument pozře potraviny obsahující 10<sup>7</sup> buněk/kg potraviny (Logan a De Vos, 2015a; Šilhánková, 2002).

Významné je využívání některých bacilů v zemědělství a potravinářství. Druh *Bacillus thuringiensis* syntetizuje toxiny s účinky na některé druhy hmyzu. Geny zodpovědné za syntezu těchto toxinů byly využity při přípravě transgenních „Bt“ rostlin (obilniny, brambory, bavlník, rajčata, soja, kukuřice). Účinky „Bt“ genů jsou namířeny proti larválním stádiím hmyzu (brouci, motýli, mšice, komáři, moskyti, mouchy a další). Některé druhy rodu *Bacillus* (např. *B. sphaericus*) jsou používány také jako aktivní složka tzv. mikrobiálních pesticidů. Využitím těchto bakterií v zemědělské produkci došlo ke zvýšení výnosů pěstovaných plodin (Betz et al., 2000; Turnbull, 1996). *Bacillus subtilis* subsp. *globigii* se díky své vysoké odolnosti vůči chemickým i fyzikálním činidlům obecně používá k ověření účinnosti alternativních sterilizačních a fumigačních postupů (Turnbull, 1996).

Do rodu *Bacillus* je v současné době řazeno 95 druhů. Současná klasifikace (tab. 1) vychází ze sekvenace genu pro 16S rRNA. Tato metoda odhalila výraznou fylogenetickou heterogenitu rodu *Bacillus*, a proto byli někteří zástupci reklasifikováni do nových rodů a dokonce i čeledí. Z pivovarsky zajímavých druhů lze zmínit např. „*Bacillus brevis*“ (nyní *Brevibacillus brevis*, čeleď *Paenibacillaceae*) a „*Bacillus macerans*“ (nyní *Paenibacillus macerans*) (Logan a De Vos, 2015a).

Table 1 Classification of the genera *Bacillus*, *Brevibacillus* a *Paenibacillus*Tab. 1 Klasifikace rodů *Bacillus*, *Brevibacillus* a *Paenibacillus*

Domain Doména	<i>Bacteria</i>	<i>Bacteria</i>	<i>Bacteria</i>
Phylum Oddělení	<i>Firmicutes</i>	<i>Firmicutes</i>	<i>Firmicutes</i>
Class Třída	<i>Bacilli</i>	<i>Bacilli</i>	<i>Bacilli</i>
Order Řád	<i>Bacillales</i>	<i>Bacillales</i>	<i>Bacillales</i>
Family Čeď	<i>Bacillaceae</i>	<i>Paenibacillaceae</i>	<i>Paenibacillaceae</i>
Genus Rod	<i>Bacillus</i>	<i>Brevibacillus</i>	<i>Paenibacillus</i>

### 3 BACILLUS BACTERIA IN MALTING AND BREWING

Bacteria are predominant in a total count of microorganisms in healthy barley (Priest and Campbel, 2003). In publications, bacteria like *Erwinia herbicola* and *Xanthomonas campestris* are often mentioned in connection with bacterial contamination of barley (Clarke and Hill, 1981). The presence of the genus *Bacillus* has also been proved in stored barley, which was intended for malting. Therefore it is assumed that the genus *Bacillus* is present also on barley before harvesting (Kosař, 1979; Priest and Campbell, 2003). Dohnal (1956) states that the presence of *Bacillus subtilis*, *Bacillus mycoides* and "*Bacillus mesentericus*" (now *Bacillus pumilus*) has been proven on stored barley and other cereal grains, which have been heavily contaminated with dust particles.

Barley malting involves three basic steps: soaking of barley, germination of barley and drying and kilning of green malt. An increase of microbial microflora occurs during soaking and germination of barley (Bokulich and Bamforth, 2013; Kosař and Šavel, 2015). Therefore multiplied microorganisms that were already present on the barley accepted for brewing are also present on green malt. Some representatives of the genus *Bacillus* may survive kilning temperatures, therefore they may be present even on properly kilned malts (Priest and Campbell, 2003). More vulnerable to microbial contamination are malts for which lower kilning temperatures were used (e.g. light pilsner malt or diastatic malt). Representatives of genus *Bacillus* might also enter the brewing operations with malt surrogates (unmalted cereals, starch extracts, syrups and concentrates, malt extracts, etc.) or with improperly treated and stored wort extract. Due to the high degree of proteolytic activity and production of metabolites (e.g. butyric acid, sulfur compounds), these bacteria may cause irreversible debasement of these substrates. These substrates then show the odor of butyric acid and rotteness (Back, 2005; Bamforth et al., 2009). Representatives of genus *Bacillus* may also survive in the form of spores even in environments with high osmotic pressure and low water activity. For example, sugar and fruity syrups, which are used as an additive for the preparation of a Radler like beverages, represent such an environment in the brewing industry. The species of *B. cereus* and *B. subtilis* are usually associated with contamination of syrups (Hill et al., 2015).

During beer brewing (mainly during mashing), the genus *Bacillus* presents a risk due to its ability to reduce nitrate to nitrite (Smith et al., 1992). The nitrite ions, which are well soluble in water, then form nitrous acid in the acidic aqueous medium and further react to form nitrogen oxides. Nitrogen oxides and protonated form of nitrous acid act as nitrosating agents and cause the formation of N-nitrosamines (Smith, 1992). On their long-term consumption N-nitrosamines have carcinogenic, teratogenic and mutagenic effects. Although the concentration of N-nitrosamines in beer is relatively low, it should be taken into account that N-nitrosamines are introduced into the body from other foods (meat and dairy products). Regular consumption of such spoiled beer may represent a certain health risk for the consumer. The maximum acceptable amount of NDMA (N-nitrosodimethylamine – classified as one of the more hazardous volatile nitrosamines, which mainly come from malt) for beer is according to the Czech brewery and malt association 0.5 µg/kg. The maximum acceptable value for ATNC (apparent total nitrosamine content = the total content of N-nitro compounds which are produced during the production of beer) is not established within the EU. However, the

### 3 BAKTERIE BACILLUS VE SLADAŘSTVÍ A PIVOVARSTVÍ

V celkovém zastoupení mikroorganismů ve zdravém ječmeni převládají svým množstvím právě bakterie (Priest a Campbel, 2003). V publikacích bývají často s bakteriální kontaminací ječmene zmiňovány spíše *Erwinia herbicola* a *Xanthomonas campestris* (Clarke a Hill, 1981). V suchém skladovaném ječmeni určeném pro sladování byla ovšem prokázána i přítomnost rodu *Bacillus* a má se tedy za to, že je rod *Bacillus* přítomen v ječmeni i před sklizní (Kosař, 1979; Priest a Campbell, 2003). Dohnal (1956) uvádí, že byla prokázána přítomnost *Bacillus subtilis*, *Bacillus mycoides* a „*Bacillus mesentericus*“ (nyní *Bacillus pumilus*) u skladovaného ječmene a obilných zrn, která byla silně znečištěna prachovými částicemi.

Sladování ječmene zahrnuje tři základní kroky: máčení ječmene, klíčení ječmene a sušení a hvozďení zeleného sladu. Během máčení a klíčení ječmene dochází k nárůstům mikrobiální mikroflóry (Bokulich a Bamforth, 2013; Kosař a Šavel, 2015). Na zeleném sladu se nacházejí pomnožené mikroorganismy, které byly přítomny již na přijatém ječmeni. Někteří zástupci rodu *Bacillus* mohou přežít i teploty při hvozďení a mohou se dostat do hotových řádně odhvozďených sladů (Priest a Campbell, 2003). Více náchylné na kontaminaci jsou tedy slady, u nichž se při hvozďení používají nižší dotahovací teploty (např. světlé slady plzeňského typu či diastatické slady). Zástupci rodu *Bacillus* mohou být do pivovarského provozu zavlečeni také prostřednictvím sladových náhražek (nesladované obiloviny; škrobnaté výluhy, sirupy a koncentráty; sladové výtažky; atd.) nebo nevhodně ošetřeného a skladovaného mladinového extraktu. Díky svému vysokému stupni proteolytické aktivity a produkci metabolitů (např. kyselina máselná, sírné sloučeniny) mohou tyto bakterie způsobit nevratné znehodnocení takovýchto substrátů, které poté vykazují pach po kyselině máselné a hnilobě (Back, 2005; Bamforth et al., 2009). Zástupci rodu *Bacillus* mohou ve formě spor přežívat i v prostředí s vysokým osmotickým tlakem a nízkou aktivitou vody. V pivovarství představují takovéto prostředí např. cukerné a ovocné sirupy, které jsou využívány jako přídavná látka pro přípravu nápoje typu radler. S kontaminací sirupů bývají spojovány druhy *B. cereus* a *B. subtilis* (Hill et al., 2015).

Na varně (hlavně během rmutování) představuje rod *Bacillus* riziko díky své schopnosti redukovat dusičnany na dusitany (Smith et al., 1992). Dusitanové ionty, které jsou dobře rozpustné ve vodě, pak tvoří v kyselém vodním prostředí kyselinu dusitou a dále reagují na oxidy dusíku. Oxidy dusíku a protonisovaná forma kyseliny dusité pak působí jako nitrosací činidla a zapříčiňují vznik N-nitrosaminů (Smith, 1992). Ty mají při dlouhodobé konzumaci karcinogenní, teratogenní a mutagenní účinky. Ačkoliv je jejich koncentrace v pivu relativně nízká, je nutné brát v potaz, že N-nitrosaminy přijímáme do těla i z jiných potravin (masné a mléčné výrobky). Pravidelná konzumace takto poškozeného piva pak může pro konzumenta představovat určité zdravotní riziko. Nejvyšší přípustné množství NDMA (N-nitrosodimethylamin – řadí se mezi více rizikové těkavé nitrosaminy, které se do piva dostávají převážně ze sladu) pro pivo je podle ČSPS 0,5 µg/kg. Pro ATNC (apparent total nitrosamine content = celkový obsah N-nitrosloučenin, které vznikají během výroby piva) není v rámci EU legislativně stanovena nejvyšší přípustná hodnota. Většinou je však vyžadován obsah ATNC do limitu 20 µg N-NO/kg, který je doporučený ve Velké Británii. U kvalitních piv se obsah ATNC pohybuje pod či na hranici 20 µg N-NO/l. Zvýšené obsahy ATNC svědčí o zhoršené mikrobiologické čistotě pivovarského procesu (Olšovská et al., 2014). Vznik N-nitrosaminů v důsledku působení nitrát-redukujících zástupců rodu *Bacillus* (Caldebrank & Hammond, 1989) se dá snížit používáním vstupních surovin s nízkým obsahem dusičnanů, zajištěním vyhovující mikrobiologické čistoty (Kellner, 1998) či přidáváním chmelových látek (Basařová et al., 2010).

Sladina je pro kontaminující mikroorganismy bohatým zdrojem nutrientů, avšak po povaření (chmelovar) je vzniklá mladina téměř bez mikrobiologické kontaminace. V této fázi představují v pivovarství hlavní problém právě sporotvorné mikroorganismy převážně z rodu *Bacillus*, které jsou schopné přežít i vysoké teploty během varu, a mohou se tak dostat až do hotového piva. To ovšem nepodporuje jejich následný růst díky své nízké hodnotě pH a přítomnosti hořkých chmelových látek (Bamforth et al., 2009; Bokulich a Bamforth, 2013; Back, 2005; Basařová et al., 2010). Výjimku představují *Bacillus cereus* a *Bacillus licheniformis* disponující genem *horA*, u nichž byl prokázán jejich růst i po reinokulaci do piva (Bokulich a Bamforth, 2013; Haakensen a Ziola, 2008), viz dále v textu. Riziko představuje zejména *B. cereus*, který je producen-

content of ATNC 20 µg N-NO/kg is usually required. This content is recommended in the UK. The content of ATNC is below or at the limit of 20 µg N-NO/l for quality beers. Increased levels of ATNC indicate a deteriorated microbiological purity of the brewing process (Olšovská et al., 2014). The formation of N-nitrosamines due to the nitrate-reducing effects of *Bacillus* (Caldebrank & Hammond, 1989) species can be reduced by the use of raw materials with a low nitrate content, by ensuring a satisfactory microbiological purity (Kellner, 1998) or by the addition of hop substances (Basařová et al., 2010).

Wort is a rich source of nutrients for contaminating microorganisms, but after the wort boiling the boiled wort is almost free of microbial contamination. In this phase, the main problem in the brewing process is spore-forming microorganisms, generally of the genus *Bacillus*. These spore-forming microorganisms are able to survive high temperatures during boiling and can thus get into the finished beer. However, the finished beer does not enable their following growth due to its low pH and the presence of bitter hop substances (Bamforth et al., 2009; Bokulich and Bamforth, 2013; Back, 2005; Basařová et al., 2010). The exception is *Bacillus cereus* and *Bacillus licheniformis*, which have the *HorA* gene. It has been shown that these bacteria are able to grow even after reinoculation into beer (Bokulich and Bamforth, 2013; Haakensen and Ziola, 2008), see below. Especially *B. cereus*, which produces a variety of toxins (emetic toxin, diarrheagenic toxins) and enzymes (proteases, lipases), presents a risk and may be responsible for the formation of foreign substances in beer (Drobniewski, 1993). Further, *B. megaterium*, *B. pumilus*, *B. subtilis*, *B. circulans*, *B. coagulans*, *B. brevis* (now *Brevibacillus brevis*, family *Paenibacillaceae*) and *B. macerans* (now *Paenibacillus macerans*, family *Paenibacillaceae*) species have been detected in breweries (Back, 2005; Briggs et al., 2004; Logan and De Vos, 2015a). The basic characteristics of species detected in breweries are shown in Table 2.

The genus *Bacillus* has also positive significance for brewing. Some representatives such as *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens* and *B. licheniformis* are used for industrial production of amylolytic enzymes (thermostable  $\alpha$ -amylases,  $\beta$ -glucosidases) (Basařová et al., 2010; Sundarram and Murthy, 2014). Amylolytic enzymes are used for optimization of the mashing process and their addition thus makes it possible to prepare the wort with adequate and constant composition. The addition of industrially produced exogenous enzymes can solve a number of process problems and economic problems. For example, substrates with a low content of amylolytic enzymes (corn, rice, sorghum, unmodified or badly malted barley) may be used for the production of beer. It allows using readily available local resources. Enzymatic kits are also used in the preparation of special beer types (high-alcohol beers, gluten-free beers, or low-calorie beers) (Basařová et al., 2010; Preedy, 2009).

It has been shown that *Bacillus coagulans* is able to produce a considerable amount of lactic acid in the wort which is maintained at 55–70 °C (Vaughan et al., 2005). The production of lactic acid is generally taken as a positive factor. Acidification of wort is used to increase yield, promote enzyme activity, or preserve coloring (Škach et al., 1987). However, the ability to reduce nitrate to nitrite was also demonstrated in this species, and the amount of created ATNC significantly exceeded the recommended limit of 20 µg N-NO/kg (Vaughan et al., 2005).

### 3.1 The resistance of *Bacillus* bacteria to bitter hop substances

It is generally known that the growth of bacteria of genus *Bacillus* is inhibited especially by acid pH (it affects the enzyme activity of the cells and enhances the inhibitory effect of hop substances) and by the content of bitter hop substances (they have an effect only on Gram-positive bacteria and inhibit the cell membrane functions) in beer. However, some studies show that *B. cereus* is able to survive and to grow for a certain period of time even at pH 4.2–4.8. Thus, *B. cereus* may grow even at pH values that are common for beer (the pH of beer is in the range of 3.4–4.8) (Kim et al., 2014; Vrsekoop et al., 2012). The other factor inhibiting the growth of *B. cereus* in beer is the content of bitter hop substances. The most important components of hop in terms of bitterness and antimicrobial effects are hop resins.  $\beta$ -Acids cannot be isomerized due to their structural differences (they do not contain a tertiary alcohol group in the aromatic nucleus). Also their solubility in wort is lower and their antimicrobial effects are not as significant as those of  $\alpha$ -acids (Krofta and Mikyška, 2014; Vrsekoop et al., 2012).  $\alpha$ -Acids are isomerized to iso- $\alpha$ -acids during wort boiling. Iso- $\alpha$ -acids are more soluble in the boiled wort, therefore they have higher antimicrobial effects.  $\alpha$ -Acids in their isomerized form act as proton ionophores and negatively affect the permeability of the

tem celé řady toxinů (emetický toxin, diarhogenní toxiny) a enzymů (proteasy, lipasy), a může tak být zodpovědný za tvorbu cizorodých látek v pivu (Drobniewski, 1993). Dále byly v pivovarských provozech detekovány druhy *B. megaterium*, *B. pumilus*, *B. subtilis*, *B. circulans*, *B. coagulans*, *B. brevis* (nyní *Brevibacillus brevis*, čeleď *Paenibacillaceae*) a *B. macerans* (nyní *Paenibacillus macerans*, čeleď *Paenibacillaceae*) (Back, 2005; Briggs et al., 2004; Logan a De Vos, 2015a). Základní charakteristika druhů detekovaných v pivovarských provozech je uvedena v tab. 2.

Rod *Bacillus* má pro pivovarství i pozitivní význam. Někteří zástupci (např. *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens* a *B. licheniformis*) jsou používáni pro průmyslovou produkci amylolytických enzymů (termostabilní  $\alpha$ -amylasy,  $\beta$ -glukosidasy) (Basařová et al., 2010; Sundarram a Murthy, 2014). Ty jsou využívány pro optimalizaci průběhu rmutování a jejich přísadky umožňuje zajistit odpovídající a konstantní složení mladiny. Přídavek průmyslově vyráběných exogenních enzymů může vyřešit řadu procesních a ekonomických problémů. Například mohou být pro výrobu piva použity i substráty s nízkým obsahem amylolytických enzymů (kukuřice, rýže, čirok, nesladovaný či špatně rozluštěný ječmen) a mohou být využity dostupnější lokální zdroje. Enzymatické kity jsou využívány při přípravě speciálních typů pív (piva s vysokým obsahem alkoholu, bezlepková piva či piva se sníženým obsahem kalorií) (Basařová et al., 2010; Preedy, 2009).

Bylo prokázáno, že *Bacillus coagulans* je schopen produkovat značné množství kyseliny mléčné ve sladině udržované při teplotě 55–70 °C (Vaughan et al., 2005). Tvorba kyseliny mléčné je obecně brána jako pozitivní faktor. Acidifikace rmutů je využívána pro zvýšení výtěžku, podpoření enzymové aktivity či zachování barvy (Škach et al., 1987). Zároveň však byla u tohoto druhu prokázána i schopnost redukovat dusičnany na dusitany a množství vytvořených ATNC výrazně převyšovalo doporučený limit 20 µg N-NO/kg (Vaughan et al., 2005).

### 3.1 Rezistence bakterií *Bacillus* k hořkým chmelovým látkám

Růst bakterií rodu *Bacillus* v pivu je inhibován zejména kyselým pH (ovlivňuje enzymovou aktivitu buněk a posiluje inhibiční vliv chmelových látek) a obsahem hořkých chmelových látek (působí pouze na gram pozitivní bakterie a inhibují funkce buněčné membrány). Některé studie ukazují, že *B. cereus* je schopen přežít a po určité době vykazovat růst i při pH 4,2–4,8. Tedy i při hodnotách pH, které jsou pro pivo běžné (pH piva se pohybuje v rozmezí 3,4–4,8) (Kim et al., 2014; Vrsekoop et al., 2012). Dalším faktorem inhibujícím růst *B. cereus* v pivu je obsah hořkých chmelových látek. Nejvýznamnější složkami chmele z hlediska hořkosti a antimikrobiálních účinků jsou chmelové pryskyřice.  $\beta$ -hořké kyseliny nemohou v důsledku strukturní odlišnosti isomerovat (neobsahují terciární alkoholovou skupinu v aromatickém jádru). Jejich rozpustnost v mladině je nižší a jejich antimikrobiální účinky nejsou ve srovnání s  $\alpha$ -hořkými kyseliny tak významné (Krofta a Mikyška, 2014; Vrsekoop et al., 2012).  $\alpha$ -hořké kyseliny v průběhu chmelovaru isomerují na iso- $\alpha$ -hořké kyseliny, které jsou v mladině více rozpustné a mají vyšší antimikrobiální účinky.  $\alpha$ -hořké kyseliny ve své isomerované formě působí jako protonové ionofory a negativně ovlivňují propustnost cytoplasmatické membrány (zvyšují propustnost pro  $H^+$ ). To následně vede u citlivých bakterií k inhibici aktivního transportu nutrientů (cukrů a aminokyselin), buněčné respirace a syntesy proteinů, DNA a RNA. Tím dochází k potlačení buněčného růstu a usmrcení buňky (Bokulich a Bamforth, 2013; Vrsekoop et al., 2012). Haakensen a Ziola (2008) izolovali kmeny *B. cereus* MH1 a *B. licheniformis* MH2 z piva vyrobeného domovárny a prokázali u nich přítomnost genu *horA*. Ten kóduje syntesu ATP-dependentního transportního proteinu *HorA*, který je lokalizován na cytoplasmatické membráně a zajišťuje u rezistentních bakterií transport hořkých chmelových látek z buňky (Bokulich a Bamforth, 2013). Autoři potvrdili schopnost *B. cereus* MH1 a *B. licheniformis* MH2 růst i po naočkování do průmyslově vyráběného piva a inkubaci při teplotě 30 °C. Toto pivo vykazovalo viditelný zákal již za 18 dnů (*B. cereus* MH1) a 14 dnů (*B. licheniformis* MH2) od inkulace. Vliv bacilů na aroma a chuť kontaminovaného piva prozatím nebyl popsán (Haakensen a Ziola, 2008).

### 3.2 Pivovarsky významné druhy rodu *Bacillus*

#### *Bacillus cereus*

Fakultativně anaerobní tyčinky se zakulacenými konci, vyskytující se jednotlivě či v dlouhých řetězcích, viz obr. 1. Buňky *B. cereus* mají průměrnou velikost  $\geq 1 \mu m$  a tvoří vždy jednu endosporu. Ta má ovál-

Table 2 The characteristics of significant brewery species *Bacillus*, *Brevibacillus* and *Paenibacillus*Tab. 2 Charakteristika pivovarsky významných druhů *Bacillus*, *Brevibacillus* a *Paenibacillus*

	<i>B. cereus</i>	<i>B. licheniformis</i>	<i>B. megaterium</i>	<i>B. pumilus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>B. circulans</i>	<i>B. coagulans</i>	<i>Brevibacillus brevis</i>	<i>Paenibacillus macerans</i>
anaerobic growth růst v anaerobním prostředí	+	+	-	-	-	+	+	-	+
Voges-Proskauer test	+	+	-	-	-	-	+	-	-
lecithinase activity lecitinasová aktivita	+	-	-	-	-	-	-	-	-
glucose utilization utilisace glukosy	+	+	+	+	+/-	+	+	+/-	+/-
lactose utilization utilisace laktosy	-	-	-	-	+/-	+	+/-	-	+
maltose utilization utilisace maltosy	+	+	+	-	+/-	+	+	-	+
arabinose utilization utilisace arabinosy	-	+	+/-	+	+/-	+	+/-	-	+
xylose utilization utilisace xylosy	-	+	+/-	-	+/-	+	+/-	-	+
mannitol utilization utilisace manitolu	-	+	+/-	+	+	+	+/-	+/-	+
citrate utilization utilisace citrátu	+	+	+	+	+	-	+/-	+/-	+/-
propionate utilization utilisace propionátu	+	+	N	-	-	N	-	-	N
starch hydrolysis hydrolysa škrobu	+	+	+	-	+	+	+	-	+
casein hydrolysis hydrolysa kaseinu	+	+	+	+	+	-	+/-	+	-
nitrate reduction redukce dusičnanů	+	+	+/-	-	+	-	+	+/-	+/-
growth at 50 °C / růst při 50 °C	-	+	-	+/-	+/-	+/-	+	+/-	+/-
growth at 60 °C / růst při 60 °C	-	+/-	-	-	-	-	+/-	+/-	-
growth in 7% NaCl / růst v 7% NaCl	+/-	+	+/-	+	+	+/-	-	-	-
growth in presence of lysosyme / růst v přítomnosti lysosymu	+	+/-	-	+/-	+/-	-	-	+/-	-

+, positive / pozitivní; -, negative / negativní; +/-, variable within species / variabilní v rámci druhu; N, not defined / nedefinováno (Djordjevic et al., 2000; Marshall a Beers, 1967; Nakamura, 1993; Priest, 2013; Logan a de Vos, 2015a)

cytoplasmic membrane (they increase the permeability of H<sup>+</sup>). The lowering of cytoplasmic membrane permeability inhibits the active transport of nutrients (sugars and amino acids), cellular respiration and synthesis of proteins, DNA and RNA in sensitive bacteria. These effects lead to suppression of cell growth and then to cell death (Bokulich and Bamforth, 2013; Vrsekoop et al., 2012). Haakensen and Ziola (2008) isolated *B. cereus* MH1 and *B. licheniformis* MH2 strains from beer produced by the homebrewers and demonstrated the presence of the *horA* gene in these bacterial strains. The *horA* gene encodes the synthesis of ATP-dependent transport protein *HorA* which is located on the cytoplasmic membrane and provides the transport of bitter hop substances from the cells of resistant bacteria (Bokulich and Bamforth, 2013). The authors confirmed the ability of *B. cereus* MH1 and *B. licheniformis* MH2 to grow even after inoculation into industrially produced beer incubated at 30 °C. This beer

ný až cylindrický tvar, je umístěna centrálně či subterminálně a nezvětšuje průměr buňky. Teplotní optimum *B. cereus* je 28–35 °C. Růst vykazuje při širokém rozmezí pH 4,4–9,3 (Drobniewski, 1993; Kramer a Gilbert 1989). *B. cereus* je schopen utilisovat glukosu, fruktosu a trehalosu, ale není schopen metabolizovat pentosy a manitol. Dále hydrolysuje škrob a kasein, je lecitinasa-positivní a je schopen degradovat tyrosin (Kramer a Gilbert, 1989; Priest, 2013).

#### *Bacillus licheniformis*

Fakultativně anaerobní tyčinky se zaoblenými konci, vyskytující se jednotlivě či v kratších řetězcích, viz obr. 2. Buňky *Bacillus licheniformis* mají průměrnou velikost <1 μm, endospory mají oválný až cylindrický tvar, jsou umístěny centrálně či subterminálně a nezvětšují průměr buňky. *B. licheniformis* je termofilní bakterie s optimální teplotou růstu okolo 50 °C, ale jsou schopny růst i při 30 °C. *B. licheniformis* využívá glukosu, fruktosu a trehalosu, xylosu, arabinosu i manitol. Dále hydrolysuje škrob a kasein, je lecitinasa-negativní a není schopen degradovat tyrosin (Logan a de Vos, 2015a; Priest, 2013).

#### *Bacillus subtilis*

Aerobní tyčinky uspořádané jednotlivě, po dvou, či výjimečně v řetězcích, viz obr. 3. Velikost buněk 0,7–0,8 x 2,0–3,0 μm. Endospory mají oválný až cylindrický tvar, jsou umístěny centrálně, paracentrálně nebo subterminálně a nezvětšují průměr buňky. Teplotní optimum *B. subtilis* je 28–30 °C. Růst při rozmezí pH 5,5–8,5. *B. subtilis* je schopen utilisovat fruktosu, manitol a citrát a hydrolysovat škrob a kasein. Je lecitinasa-negativní a není schopen degradovat propionát. *B. subtilis* je schopen redukovat dusičnany na dusitany (Logan a de Vos, 2015a; Priest, 2013). Druh *B. subtilis* se při tvorbě kolonií vyznačuje mimořádnou variabilitou, na úrovni kmene ale i v rámci kmene. I čistá kultura může na základě morfologie kolonií vypadat jako smíšená kultura. Kolonie jsou kruhové, nebo nepravidelně tvarované, s hladkým nebo zvrásněným povrchem, s velikostí 2–4 mm v průměru, s nepravidelnými až „rozřtřenými“ okraji. Zbarvení kolonií je bělavé, krémové až hnědé, konzistence kolonií může být mukoidní až máslovitá. Spory *B. subtilis* jsou všeobecně přítomny v rozmanitých typech prostředí. Vegetativní buňky se účastní raných fází rozkladu organického materiálu. *B. subtilis* je původce slizovatění chleba (Logan a De Vos, 2015a; Priest, 2013).

### 3.3 Bakterie rodů *Brevibacillus* a *Paenibacillus* (dříve řazeny do rodu *Bacillus*)

#### Rod *Brevibacillus*

Rod *Brevibacillus* byl vyčleněn z rodu *Bacillus* na základě fyziologických a biochemických vlastností a sekvence genu pro 16S rRNA. Bakterie *Brevibacillus* jsou krátké rovné pohyblivé tyčky, gram-positivní nebo gram-variabilní, katalasa-positivní, oxidasa-variabilní, některé redukují nitráty. Většina druhů je striktně aerobní. Buňky *Brevibacillus* se vyskytují samostatně, v párech či v kratších řetězcích. Šířka a délka buněk se pohybuje v rozmezí 0,7–1,0 μm a 3,0–6,0 μm (Logan a De Vos, 2015b). Endospory jsou oválné a ztlušují mateřskou buňku. Optimální teplota růstu většiny zástupců je 30 °C, optimální pH 5,7 (Sedláček, 2007). Název rodu je odvozen od latinského „*brevis*“ – krátká – a „*bacillus*“ – malá tyčka, tyčinka (Logan a De Vos, 2015b).

Většina druhů roste na běžných kultivačních půdách, jako je masopeptonový agar nebo tryptikasa-sojový agar. Kolonie *Brevibacillus* jsou většinou ploché, hladké, se žlutavě-šedým zbarvením. Rod *Brevibacillus* zahrnuje 14 druhů, většina byla izolována z půdy, vody a potravin, ojediněle dochází k izolacím z humánního klinického materiálu (Logan a De Vos, 2015b). V pivovarském provozu bývá izolován druh *Brevibacillus brevis* v souvislosti s kontaminací vstupních surovin (slad, chmel) (Back, 2005).

*Brevibacillus brevis* – striktně aerobní, gram-positivní nebo gram-variabilní krátké tyčinky, vyskytující se samostatně nebo po dvou. Katalasa- a oxidasa-positivní. Většina kmenů redukuje nitráty. Endospory jsou oválné, uloženy subterminálně a ztlušují mateřskou buňku. Kolonie rostou na běžných kultivačních půdách, kde vytvářejí lesklé, krémově zbarvené kolonie (Logan a De Vos, 2015b).

#### Rod *Paenibacillus*

Rod *Paenibacillus* byl vyčleněn z rodu *Bacillus* na základě sekvence genu pro 16S rRNA. Bakterie *Paenibacillus* jsou rovné pohyblivé tyčky různé délky, gram-positivní, gram-negativní nebo gram-variabilní, katalasa-positivní (s výjimkou *P. larvae*), oxidasa-variabilní, některé

showed visible turbidity within 18 days (*B. cereus* MH1) and 14 days (*B. licheniformis* MH2) after inoculation. However, the influence of bacilli on the aroma and taste of contaminated beer has not yet been described (Haakensen and Ziola, 2008).

### 3.2 Significant brewery species of genus *Bacillus*

#### *Bacillus cereus*

Facultative anaerobic rods with rounded ends, which occur individually or in long chains, see Fig. 1. *B. cereus* cells have an average size  $\geq 1 \mu\text{m}$  and always form one endospore, which has an oval to cylindrical shape. The endospore is located centrally or subterminally and does not increase the cell diameter. The temperature optimum of *B. cereus* is in the range of 28–35 °C. The growth occurs over a wide pH range of 4.4–9.3 (Drobniewski, 1993; Kramer and Gilbert 1989). *B. cereus* is able to utilize glucose, fructose and trehalose but is unable to metabolize pentoses and mannitol. Further, it hydrolyzes starch and casein, is lecithinase-positive and is able to degrade tyrosine (Kramer and Gilbert, 1989; Priest, 2013).

#### *Bacillus licheniformis*

Facultative anaerobic rods with rounded ends, which occur individually or in shorter chains, see Fig. 2. *Bacillus licheniformis* cells have an average size  $< 1 \mu\text{m}$ . Their endospores have an oval to cylindrical shape, they are located centrally or subterminally and do not increase the cell diameter. *B. licheniformis* is a thermophilic bacterium with an optimal growth temperature around 50 °C, but it is able to grow even at 30 °C. *B. licheniformis* is able to utilize glucose, fructose and trehalose, xylose, arabinose, and even mannitol. Further, it hydrolyzes starch and casein, is lecithinase-positive and is not able to degrade tyrosine (Logan and de Vos, 2015a; Priest, 2013).

#### *Bacillus subtilis*

Aerobic rods which occur individually, in pairs, or exceptionally in chains, see Fig. 3. The cell size is in range of 0.7–0.8 x 2.0–3.0  $\mu\text{m}$ . Endospores have an oval to cylindrical shape, they are located centrally, paracentrally or subterminally and do not increase the cell diameter. The temperature optimum of *B. subtilis* is in the range of 28–30 °C. The growth occurs over a pH range of 5.5–8.5. *B. subtilis* is able to utilize fructose, mannitol and citrate and hydrolyze starch and casein. It is lecithinase-negative and is not able to degrade propionate. *B. subtilis* is able to reduce nitrate to nitrite (Logan and de Vos, 2015a; Priest, 2013). The *B. subtilis* species is characterized by extraordinary variability during colony forming, its variability is at the strain level, but even within the strain. Even a pure culture can appear to be a mixed culture based on colony morphology. Colonies are circular or irregularly shaped, with a smooth or wrinkled surface, 2–4 mm in diameter, with irregular to “frayed” edges. The coloring of the colonies is whitish, creamy to brown. The consistency of the colonies may be mucoid to buttery. *B. subtilis* spores are generally present in a variety of environments. The vegetative cells participate in the early stages of decomposition of organic material. *B. subtilis* causes the covering of bread with slime (Logan and De Vos, 2015a; Priest, 2013).

### 3.3 Bacteria of genera *Brevibacillus* and *Paenibacillus* (previously included in the genus *Bacillus*)

#### The genus *Brevibacillus*

The *Brevibacillus* genus was separated from the *Bacillus* genus based on the physiological and biochemical properties and sequence of the 16S rRNA gene. *Brevibacillus* bacteria are short straight and motile rods, Gram-positive or Gram-variable, catalase-positive, oxidase-variable, some of them reduce nitrate. Most species are strictly aerobic. Cells of brevibacilli occur individually, in pairs or in shorter chains. The width and length of cells are in the range of 0.7–1.0  $\mu\text{m}$  and 3.0–6.0  $\mu\text{m}$  respectively (Logan and De Vos, 2015b). Endospores have an oval shape and increase the maternal cell diameter. The optimal temperature for most representatives is 30 °C, optimal pH is 5.7 (Sedláček, 2007). The genus name is derived from the latin words „*brevis*“ which means short and „*bacillus*“ which means a small rod (Logan and De Vos, 2015b).

Most species grow in common cultivation media such as nutrient or tryptic-soy agar. Colonies of brevibacilli are usually flat, smooth, yellowish-gray in color. The genus *Brevibacillus* includes 14 species. Most species were isolated from soil, water and food, rarely from human clinical material (Logan and De Vos, 2015b). *Brevibacillus brevis* is isolated from raw materials (malt, hops) in the brewing industry (Back, 2005).

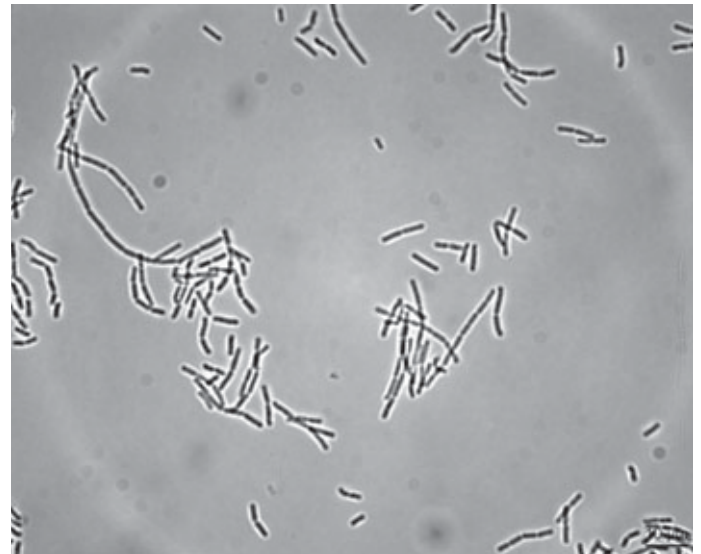


Fig. 1 / Obr. 1 *Bacillus cereus* CCM 2010<sup>T</sup>

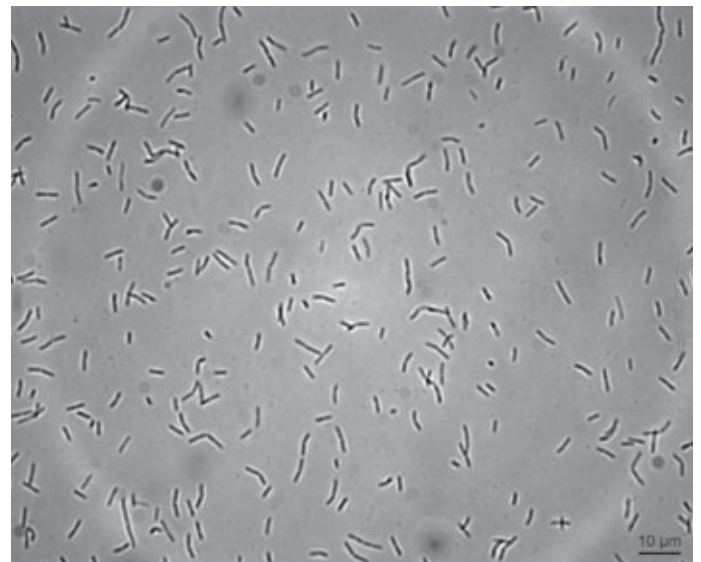


Fig. 2 / Obr. 2 *Bacillus licheniformis* CCM 2145<sup>T</sup>

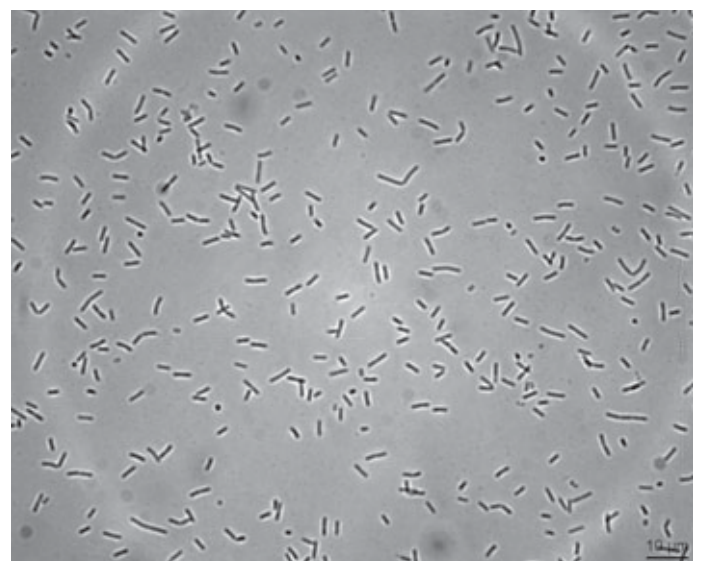


Fig. 3 / Obr. 3 *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* CCM 2216<sup>T</sup>

***Brevibacillus brevis*** – strictly aerobic, Gram-positive or Gram-variable short rods. Cells of *Brevibacillus brevis* occur individually or in pairs. They are catalase- and oxidase-positive. Most species reduce nitrate. Endospores have an oval shape, are located subterminally and increase the maternal cell diameter. Colonies grow in common cultivation media, where they create shiny, creamy-colored colonies (Logan and De Vos, 2015b).

#### The genus *Paenibacillus*

The *Paenibacillus* genus was separated from the *Bacillus* genus based on the sequence of the 16S rRNA gene. *Paenibacillus* bacteria are straight motile and rods of different lengths, Gram-positive, Gram-negative or Gram-variable, catalase-positive (except *P. larvae*), oxidase-variable, some of them reduce nitrate. They are strictly aerobic or facultatively anaerobic. Cells of paenibacilli occur individually, in pairs, or in shorter chains. The width and length of cells are in the range of 0.5–0.8  $\mu\text{m}$  and 2.0–5.0  $\mu\text{m}$ . Endospores have an oval shape and increase the maternal cell diameter. The optimal temperature for most representatives is in the range of 28–40 °C, optimal pH is 7.0. The genus name is derived from the latin words “*paene*” which means almost and “*bacillus*” which means a small rod (Priest, 2015; Sedláček, 2007).

Most species grow in common cultivation media (nutrient agar, tryptic-soy agar). Colonies of paenibacilli are usually flat, smooth, light brown, white, sometimes with pinkish color. During the growth in poor media or in media which contain antibiotics (Ben-Jacob et al., 2000), colonies of different paenibacilli species acquire specific shape and form different so-called morphotypes (the term morphotype expresses strains with morphology different from other strains of the same species). Several morphotypes were described during the growth of the genus *Paenibacillus* in poor media: branched divided colonies (so-called T-morphotype), round chiral colonies (so-called C-morphotype) and colonies which look like a vortex (so-called V-morphotype) (Priest, 2015). The genus *Paenibacillus* includes 73 species. Most species were isolated from soil, especially that rich in humus and plant material. Paenibacilli produce phytohormones, antifungal agents and enzymes. Due to their metabolite production, paenibacilli contribute to the control of plant diseases. Some species are entomopathogenic, i.e. they cause insect diseases (Priest, 2015). *Paenibacillus macerans* is isolated from raw materials (malt, hops, water) in the brewing industry. *P. macerans* produces butyric acid and may cause off-flavors of contaminated substrates (Back, 2005).

***Paenibacillus macerans*** – facultative anaerobic, Gram-positive, Gram-negative or Gram-variable rods. Most species are catalase-positive and they are able to reduce nitrate. They hydrolyze starch, chitin and some species hydrolyze also pectin. During glucose fermentation, they produce a small amount of acetone. Under anaerobic conditions, they fix nitrogen (Priest, 2015). They grow in common cultivation media, where they create small, flat, round, slightly transparent, light-cream-colored colonies (Back, 2005; Priest, 2015).

## 4 CONCLUSIONS

The genus *Bacillus* is considered to be a low-risk contaminant of beer. Although most of the *Bacillus* vegetative cells are inactivated in beer, their ability to create spores must be taken into account. Their spores may survive in distributed beer for a long time. Scientific studies have also demonstrated the ability of *Bacillus cereus* and *Bacillus licheniformis* to grow in beer due to the presence of the *horA* gene. In this case, *B. cereus* could pose an increased risk due to its ability to produce a variety of toxins and enzymes. One should also pay attention to spore-forming *Brevibacillus brevis* and *Paenibacillus macerans*, which are widespread in the environment on the solid plant materials and they can easily get into the breweries with raw materials. Therefore, to properly predict potential risks, it is necessary first to fully understand the mechanisms of survival of toxigenic bacteria and their spores

## ACKNOWLEDGEMENTS

The results were obtained with the support of the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic – Research Sensory Center in Prague and Research and Development Center - Sustainability and Development (LO1312).

redukuji nitráty. Striktně aerobní nebo fakultativně anaerobní. Buňky paenibacilů se vyskytují samostatně, v párech či v kratších řetzcích. Šířka a délka buněk se pohybuje v rozmezí 0,5–0,8  $\mu\text{m}$  a 2,0–5,0  $\mu\text{m}$ . Endospory jsou oválné a ztlušují mateřskou buňku. Optimální teplota růstu většiny zástupců se pohybuje v rozmezí 28–40 °C, optimální pH 7,0. Název rodu je odvozen od latinského „*paene*” – téměř – a „*bacillus*” – tyčinka (Priest, 2015; Sedláček, 2007).

Většina druhů roste na běžných kultivačních půdách (masoseptonový agar, tryptikasa-sojový agar). Kolonie paenibacilů jsou většinou ploché, hladké, světle hnědé, bílé, někdy s narůžovělým zbarvením. Při růstu na chudých médiích nebo na médiích obsahujících antibiotika (Ben-Jacob et al., 2000) získávají kolonie různých kmenů paenibacilů specifický tvar a tvoří tzv. odlišné morfotypy (termín morfotyp označuje kmeny vykazující morfologickou odlišnost od jiných kmenů téhož druhu). U rodu *Paenibacillus* bylo při růstu na chudých médiích popsáno několik morfotypů: rozvětvené dělené kolonie (tzv. T-morfotyp), kulaté chirální kolonie (tzv. C-morfotyp) a y kolonie připomínající svým tvarem vír (tzv. V-morfotyp) (Priest, 2015). Rod *Paenibacillus* zahrnuje 73 druhů, většina byla izolována z půdy, zejména bohaté na humus a rostlinný materiál. Produkují fytohormony, antifungální látky, enzymy, čímž přispívají k potlačování chorob rostlin. Některé druhy jsou entomopatogenní, tj. jsou původci onemocnění hmyzu (Priest, 2015). V pivovarském provozu bývá izolován druh *Paenibacillus macerans*, v souvislosti s kontaminací vstupních surovin (slad, chmel, voda). *P. macerans* je producentem kyseliny máselné a u kontaminovaných substrátů může způsobovat vznik nežádoucí vůně (Back, 2005).

***Paenibacillus macerans*** – fakultativně anaerobní, gram pozitivní, gram negativní nebo gram variabilní tyčinky. Většina kmenů je katalasa-positivní a schopná redukovat dusičnany. Hydrolyzují škrob, chitin a některé kmeny pektin. Během fermentace glukosy produkují malé množství acetonu. Při anaerobních podmínkách fixují dusík (Priest, 2015). Rostou na běžných kultivačních půdách, kde vytvářejí malé, nízké, kulaté, mírně prosvítající, světle-krémově zbarvené kolonie (Back, 2005; Priest, 2015).

## 4 ZÁVĚR

Rod *Bacillus* je považován za málo rizikovou kontaminantu piva. Přestože je většina vegetativních buněk *Bacillus* v pivu inaktivována, je nutné brát v potaz jejich schopnost tvořit spory, které mohou v distribuovaném pivu přežít i po dlouhou dobu. Vědecké studie prokázaly schopnost *Bacillus cereus* a *Bacillus licheniformis* růst v pivu díky přítomnosti genu *horA*. V takovém případě by mohl *B. cereus* představovat zvýšené riziko díky své schopnosti produkovat celou řadu toxinů a enzymů. Je vhodné věnovat pozornost také sporotvorným *Brevibacillus brevis* a *Paenibacillus macerans*, které jsou hojně rozšířeny v životním prostředí na pevných rostlinných materiálech, a mohou se tak snadno dostávat do pivovarských provozů se vstupními surovinami. Pro správnou predikci potenciálních rizik je tedy nutné nejdříve dokonale porozumět mechanismům přežití toxigenických bakterií a jejich spor.

## Poděkování

Výsledky byly získány s využitím podpory Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy ČR – Výzkumné senzorické centrum v Praze a Výzkumná a vývojová varna – udržitelnost a rozvoj (LO1312).

## REFERENCES / LITERATURA

- Back, W., 2005: Brewery. In: Back W. (Ed.), Colour atlas and handbook of beverage biology. Verlag Hans Carl, Nürnberg, Germany.
- Bamforth, C.W., Russell, I., Stewart, G., 2009: Beer. A quality perspective. A volume in Handbook of Alcoholic Beverages. ISBN: 978-0-12-669201-3
- Basařová, G., Šavel, J., Basař, P., Lejsek, T., 2010: Pivovarství – Teorie a praxe výroby piva. Vydavatelství VŠCHT: Praha.
- Ben-Jacob, E., Cohen, I., Golding, I., Gutnick, I. D. L., Tcherpakov, M., Helbing, D., Ron, I. G., 2000: Bacterial cooperative organization under antibiotic stress. *Phys. A*, 282: 247–282.
- Betz, F.S., Hammond, B.G., Fuchs, R.L., 2000: Safety and advantages of *Bacillus thuringiensis*-protected plants to control insect pests. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, 32: 156–173.
- Bokulich, N.A., Bamforth, C.W., 2013: The microbiology of malting and brewing. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 77: 157–172.
- Briggs, D.E., Boulton, C.A., Brookes, P.A., Stevens, R., 2004: Brewing science and practice. Woodhead Publishing Limited and CRC Press LLC. ISBN 1 85573 490 7.
- Caldebrank, J., Hammond, J.R.M., 1989: Influence of nitrate and bacterial contamination on the formation of apparent total N-nitroso compounds (ATNC) during fermentation. *J. Inst. Brew.*, 95: 277–281.
- Clarke, J.H., Hill, S.T., 1981: Transactions of the British Mycological Society, 77: 557.
- Djordjevic, S.P., Forbes, W.A., Smith, L.A., Hornitzky, M.A., 2000: Genetic and biochemical diversity among isolates of *Paenibacillus alvei* cultured from Australian honeybee (*Apis mellifera*) colonies. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66(3): 1098–1106.
- Dohnal, L., 1956: Mikroflóra ječmene a sladu. *Kvasny Prum.*, 11: 243–248.
- Douglas, P.E., Flannigen, B., 1988: A microbiological evaluation of barley malt production. *J. Inst. Brew.*, 94: 85–88.
- Drobniewski, F.A., 1993: *Bacillus cereus* and related species. *Clin. Microbiol. Rev.*, 6: 324–338.
- Haakensen, M., Ziola, B., 2008: Identification of novel *horA*-harbouring bacteria capable of spoiling beer. *Can. J. Microbiol.*, 54: 321–325.
- Hill, A.E., 2015: Traditional methods of detection and identification of brewery spoilage organisms. In: Hill, A. E., editor, Brewing microbiology. Managing microbes, ensuring quality and valorising waste. Woodhead Publishing. ISBN 978-1-78242-331-7
- Kellner, V., 1998: Cizorodé látky v pivovarství České republiky a Slovenska současnými očima. *Kvasny Prum.*, 44: 278–279.
- Kim, S.A., Kim, N.H., Lee, S.H., Hwang, I.G., Rhee, M.S., 2014: Survival of foodborne pathogenic bacteria (*Bacillus cereus*, *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium, *Staphylococcus aureus*, and *Listeria monocytogenes*) and *Bacillus cereus* spores in fermented alcoholic beverages (beer and refined rice wine). *J. Food Prot.*, 77: 419–426.
- Kosař, K., 1979: Problematika mikroorganismů ve sladařském průmyslu. *Kvasny Prum.*, 25: 222–223.
- Kosař, K., Procházka, S., 2000: Technologie výroby sladu a piva. Praha: Výzkumný ústav pivovarský a sladařský.
- Kosař, K., Šavel, J., 2015: Mikroflóra ječmene a sladu. In: Basařová, G. (Ed.): Sladařství. HBT, Praha, str. 455–486. ISBN 978-80-87109-47-2.
- Kramer, J.M., Gilbert, R.J., 1989: Foodborne bacterial pathogens. Michael Doyle. CRC Press. ISBN 0824778669.
- Krofta, K., Mikyška, A., 2014: Hop beta acids: Properties, significance and utilization. *Kvasny Prum.*, 60(4): 96–105.
- Logan, N.A., De Vos, P., 2015a: *Bacillus*. In: Whitman, W.B., editor, Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. John Wiley & Sons, Inc., in association with Bergey's Manual Trust.
- Logan, N.A., De Vos, P., 2015b: *Brevibacillus*. In: Whitman, W.B., editor, Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. John Wiley & Sons, Inc., in association with Bergey's Manual Trust.
- Marshall, R., Beers, R.J., 1967: Growth of *Bacillus coagulans* in chemically defined media. *J. Bacteriol.*, 94(3): 517–521.
- Nakamura, L.K., 1993: DNA relatedness of *Bacillus brevis* Migula 1900 strains and proposal of *Bacillus agri* sp. nov., nom. rev., and *Bacillus centrosporus* sp. nov., nom. rev. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 43(1): 20–25.
- Olšovská, J., Matoušková, D., Čejka, P., Jurková, M., 2014: Beer and health. *Kvasny Prum.*, 60(7–8): 174–181.
- Preedy, V.R., 2009: Beer in health and disease prevention. Academic Press is an imprint of Elsevier. ISBN 978-0-12-373891-2.
- Priest, F.G., 2013: *Bacillus*. Colin R. Harwood. Springer Science & Business Media. ISBN 1489935029.
- Priest, F.G., 2015: *Paenibacillus*. In: Whitman, W.B., editor, Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. John Wiley & Sons, Inc., in association with Bergey's Manual Trust.
- Priest, F.G., Campbell, I., 2003: Brewing Microbiology 3rd ed., Kluwer Academic/ Plenum Publishers: New York.
- Sedláček, I., 2007: Taxonomie prokaryot. 1. vydání, Masarykova univerzita, Brno. ISBN 80-210-4207-9
- Smith, N.A., 1992: Nitrate reduction and ATNC formation by brewery wild yeasts. *J. Inst. Brew.*, 98: 415–420.
- Smith, N.A., Smith, P., Woodruff, C.A., 1992: The role of *Bacillus* spp. in N-nitrosamine formation during wort production. *J. Inst. Brew.*, 98: 409–414.
- Sundarram, A., Murthy, T.P.K., 2014:  $\alpha$ -Amylase production and applications: A review. *J. Appl. Environ. Microbiol.*, 2(4): 166–175.
- Šilhánková, L., 2002: Mikrobiologie pro potravináře a biotechnologii. Academia. ISBN 8-85605-71-6 (2.vydání).
- Škach, J., Mikyška, A., Zimová I., 1987: Význam acidifikace vstírky pro extraktivou skladbu mladiny. *Kvasny Prum.*, 33: 244–247.
- Turnbull, P.C.B., 1996: Medical microbiology. 4th edition. Chapter 15 *Bacillus*. Baron S, Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston.
- 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.
- Vriesekoop, F., Krahl, M., Hucker, B., Menz, G., 2012: 125th Anniversary review: Bacteria in brewing: The good, the bad and the ugly. *J. Inst. Brew.*, 118: 335–345.