

DOI: 10.18832/kp201830

## Brewing microbiology – bacteria of the genus *Clostridium* Mikrobiologie pivovarské výroby – bakterie rodu *Clostridium*

Martina BROŽOVÁ, Petra KUBIZNIAKOVÁ, Dagmar MATOULKOVÁ  
Department of Microbiology, Research Institute of Brewing and Malting, Lípová 15, CZ-120 44 Prague  
Mikrobiologické oddělení, Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, a.s., Lípová 15, 120 44 Praha

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

Reviewed paper / Recenzovaný článek

Brožová, M., Kubizniaková, P., Matoulková, D., 2018: Brewing microbiology – bacteria of the genus *Clostridium*. Kvasny Prum. 64(5): 242–247

In most cases, the *Clostridium* species rank among the sporogenic obligate anaerobes, which are sensitive to bitter hop substances and acidic pH. Thus they rank among the less dangerous contaminants in brewing operations. Their increased incidence in breweries can be linked to the modernization of technologies, which reduces access to oxygen in individual production phases. The endospores of *Clostridium* bacteria were isolated, e.g., from the storage vessels for liquid malt substitutes (glucose, starch syrups). They are able to survive the conditions of mashing and wort boiling, but they can not germinate in the following phases of beer production. However, their ability to be present in the vegetative form until the wort preparation presents a risk of damage to finished beer – vegetative cells form a number of undesirable organic acids, which may pass into the finished product. We provide here an overview of basic morphological and physiological properties of these bacteria and describe their importance in the brewing process. Particular attention is given to species *Clostridium acetobutylicum*, *C. butyricum*, *C. cellulovorans*, *C. pasteurianum*, *C. thermocellum*, „*C. thermosaccharolyticum*“ (*Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*) and *C. tyrobutyricum*, which were detected in brewing operations.

Brožová, M., Kubizniaková, P., Matoulková, D., 2018: Mikrobiologie pivovarské výroby – bakterie rodu *Clostridium*. Kvasny Prum. 64(5): 242–247

Druhy rodu *Clostridium* se ve většině případů řadí mezi sporulující obligátní anaeroby citlivé na hořké chmelové látky a kyselé pH a nepředstavují tak v pivovarských provozech závažné riziko. Jejich zvýšený výskyt v pivovarech může být spojen s modernizací technologií, které snižují přístup kyslíku v jednotlivých výrobních fázích. Endospory bakterií *Clostridium* byly izolovány např. ze skladovacích nádob (tanků) pro tekuté sladové náhražky (glukosové, škrobnaté sirupy). Jsou schopné přežít podmínky rmutování i chmelovaru, ale v navazujících fázích výroby piva nemohou vyklíčit. Jejich schopnost vyskytovat se ve vegetativní formě až do fáze přípravy mladiny však přináší riziko poškození hotového piva - vegetativní buňky tvoří celou řadu nežádoucích organických kyselin, které mohou přejít až do hotového výrobku. 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 *Clostridium acetobutylicum*, *C. butyricum*, *C. cellulovorans*, *C. pasteurianum*, *C. thermocellum*, „*C. thermosaccharolyticum*“ (*Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*) a *C. tyrobutyricum*, které byly detekovány v pivovarských provozech.

**Keywords:** anaerobic bacteria, *Clostridium*, *C. acetobutylicum*, *C. butyricum*, *C. cellulovorans*, *C. pasteurianum*, *C. thermocellum*, „*C. thermosaccharolyticum*“ (*Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*), *C. tyrobutyricum*, contamination of beer, endospores

**Klíčová slova:** anaerobní bakterie, *Clostridium*, *C. acetobutylicum*, *C. butyricum*, *C. cellulovorans*, *C. pasteurianum*, *C. thermocellum*, „*C. thermosaccharolyticum*“ (*Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*), *C. tyrobutyricum*, endospory, kontaminace piva

### 1 INTRODUCTION

Bacteria of the genus *Clostridium* rank among the sporogenic bacteria. Due to the high resistance of endospores, these bacteria are able to survive mashing and wort boiling, and can therefore be also found in finished beer (Suzuki, 2015). However, their following growth in beer is inhibited by bitter hop substances and acidic pH (Basařová et al., 2010; Menz et al., 2009). Bacteria of the genus *Clostridium* usually enter the brewing operations with raw materials and their occurrence was also confirmed in the vegetative form in intermediate brewing products (wort, boiled wort). In these substrates or intermediates, a number of undesirable substances can be produced due to the metabolic activity of *Clostridium* bacteria, which may be responsible for changing the sensory profile of the finished beer (Hawthorne et al., 1991; Storgårds, 2000). Thanks to the strong resistance of their endospores *Clostridium* bacteria are very difficult to remove from the brewing operations (Suzuki, 2015).

### 2 GENERAL CHARACTERISTICS OF GENUS *CLOSTRIDIUM*

The genus *Clostridium* is characterized by its wide range and variability. Generally, bacteria of this genus are obligately anaerobic, catalase-negative, oxidase-negative, sporogenic (Dürre, 2014; Rainey et al., 2015). The cells are in the form of pleomorphic rods (i.e. straight or slightly curved with different lengths and diameters) with rounded or pointed (less common) ends. *Clostridium* cells occur in pairs, or in short chains. Only some species create long chains.

### 1 ÚVOD

Bakterie rodu *Clostridium* se řadí mezi sporulující bakterie. Vysoká odolnost endospor umožňuje těmto bakteriím přežít i nepříznivé podmínky rmutování či chmelovaru a někteří zástupci tak mohou být detekováni i v hotovém pivu (Suzuki, 2015). Jejich další rozvoj je však potlačen díky přítomnosti hořkých chmelových látek a kyselému pH (Basařová et al., 2010; Menz et al., 2009). Do pivovarských provozů vstupují tyto bakterie většinou se surovinami a jejich výskyt byl také potvrzen ve vegetativní formě v pivovarských meziproductech (sladina, mladina). V těchto substrátech či meziproductech dochází díky metabolické aktivitě bakterií *Clostridium* k tvorbě celé řady nežádoucích látek, které mohou být odpovědné za změnu senzorkého profilu hotového piva (Hawthorne et al., 1991; Storgårds, 2000). Díky značné odolnosti endospor jsou klostridie velmi těžko odstranitelné z pivovarských provozů (Suzuki, 2015).

### 2 OBECNÁ CHARAKTERISTIKA RODU *CLOSTRIDIUM*

Rod *Clostridium* je charakteristický svou obsáhlostí a rozmanitostí. Zpravidla jsou bakterie tohoto rodu obligátně anaerobní, katalasa-negativní, oxidasa-negativní, sporulující (Dürre, 2014; Rainey et al., 2015). Buňky mají tvar pleomorfních tyčinek (tj. rovné či mírně zakřivené s různou délkou i průměrem) se zakulacenými nebo zašpičatělými konci (méně časté), které jsou uspořádané po dvou nebo v krátkých řetzcích. Některé druhy tvoří dlouhá vlákna. Ojedinele mohou být buňky uspořádané do spirál (Sedláček, 2007). Buňky klostridií

Occasionally, the cells can be spiral-shaped (Sedláček, 2007). Clostridia cells may be nonmotile or motile by means of peritrichous flagella (i.e. spread over the cell surface) and are usually gram-positive in early stages of growth (Dürre, 2014; Rainey et al., 2015; Sedláček 2007). Spores are formed inside cells (endospores) and are very resistant to a number of adverse environmental factors (e.g. oxygen or high temperatures). Endospores usually distend vegetative cells and have an oval or round shape. It has been shown that some species tolerate oxygen at atmospheric pressure. These species then showed slow growth but were not able to sporulate (Rainey et al., 2015; Šilhánková, 2002).

Representatives of the genus *Clostridium* can be psychrophilic, mesophilic, thermophilic (2.5–70 °C), acidophilic, alkaliphilic (pH 3.6–11), the width and the length of cells are in the range of 0.3–5 x 0.5–50 µm. Optimal growth conditions are usually 30–37 °C and pH 6.5–7. Some representatives are halophilic and *C. thiosulfatireducens* is able to survive even in environments containing up to 60 g/l NaCl (Rainey et al., 2015; Wiegel, 2015).

From a metabolic point of view it is a very diverse group, where some species of this genus are chemoautotrophic or chemolithotrophic (Sedláček, 2007). But most of the representatives rank among microorganisms with chemoheterotrophic metabolism and they are able to utilize a wide spectrum of carbon substances (monosaccharides, oligosaccharides, starch, cellulose) and nitrogen substances (proteins, peptones, purines, pyrimidines) to produce a wide range of organic acids and alcohols (Dürre, 2014). Some species are able to fix atmospheric nitrogen (*C. pasteurianum*) (Dürre, 2014; Rainey et al., 2015; Sedláček, 2007). The genus *Clostridium* does not include representatives which are able to reduce sulphates and sulphites. They were reassigned to the genus *Desulfotomaculum* (Dürre, 2014; Rainey et al., 2015; Šilhánková, 2002). The *Clostridium* genus is very rich in species (it includes more than 160 species); based on different metabolic activities, clostridia can be divided into three groups: 1) species with saccharolytic and proteolytic metabolic pathways, which form acid from glucose and hydrolyze gelatin (e.g. *C. botulinum*); 2) saccharolytic non-proteolytic species which form acid from glucose but do not hydrolyze gelatin (e.g. *C. butyricum*); 3) proteolytic species which hydrolyze gelatin but do not form acid from glucose (e.g. *C. tetani*) (Sedláček, 2007; Wiegel, 2015).

Clostridia are isolated from a variety of environments, such as food, river and marine sediments, digestive tract of animals, wooden mass, soil, dust, sewage sludge, decomposing plant material and human or veterinary clinical material. Some of them even inhabit thermal springs and volcanic systems (Rainey et al., 2015; Sedláček, 2007; Šilhánková, 2002). Thanks to their rich enzyme apparatus, this genus is used in a wide range of biotechnological industries (production of enzymes, biofuels and chemicals such as acetone, butanol, butyric acid, etc.) (Dürre, 2014; Šilhánková, 2002). A small percent of species (e.g. *C. botulinum*, *C. perfringens*, *C. tetani*) are able to produce very dangerous toxins and are pathogenic for humans and animals (Dürre, 2014). However, it has been reported that pathogenic species from the genus *Clostridium* are not able to survive in finished beer and have not been isolated from finished beer (van Vuuren and Priest, 2003).

### 3 CLOSTRIDIUM BACTERIA IN BREWING

Bacteria of the genus *Clostridium* are generally considered to be less hazardous brewing contaminants, which are rarely found in beer and do not grow in it (so-called latent germs) (Back, 1991; Kosař and Procházka, 2000). However, representatives of the genus *Clostridium* which produce butyric acid may also be included among bacteria causing indirect spoilage of beer. That means that although clostridia are not able to grow in beer, they are able to grow during the preparation of wort and boiled wort or on various substrates, which enter the technological process. Their metabolic activity may then cause an undesirable taste and smell of beer (Storgårds, 2000). Clostridia growth in beer is inhibited by the presence of bitter hop substances, which act on gram-positive bacteria and inhibit cell membrane functions, and acidic pH that affects the enzyme activity of cells and enhances the inhibitory effect of hop substances (Vrisekoop et al., 2012). However, the authors point out that some species of the genus *Clostridium* (e.g. *C. butyricum*, *C. acetobutylicum*, *C. botulinum*) are able to grow at pH 3.7–4.8. Thus, they grow even at pH values which are common for beer (the pH of the beer is in the range of 3.4–4.8) (Rainey et al., 2015; Suzuki, 2015; Vrisekoop et al., 2012; Wong et al., 1988). However, these bacteria pose a potential risk to less-

mohou být nepohyblivé i pohyblivé, s bičíky uspořádanými peritrichálně (po celém povrchu buňky) a v rané fázi růstu se obvykle barví gram pozitivně (Dürre, 2014; Rainey et al., 2015; Sedláček, 2007). Endospory jsou vytvářeny uvnitř buněk a jsou velmi odolné vůči řadě nepříznivých faktorů vnějšího prostředí (např. kyslíku či vysokým teplotám). Endospory jsou ve většině případů širší než vegetativní buňky a mají oválný či kulatý tvar. U některých druhů byla prokázána jejich tolerance vůči kyslíku za atmosférického tlaku. Tyto druhy pak vykazovaly pomalý růst, ale nebyly schopny sporulovat (Rainey et al., 2015; Šilhánková, 2002).

Zástupci rodu *Clostridium* mohou být psychrofilní, mesofilní, termofilní (2,5–70 °C), acidofilní, alkalifilní (pH 3,6–11), šířka a délka buněk se pohybuje v rozmezí 0,3–5 x 0,5–50 µm. Optimální růst vykazují většinou při teplotě 30–37 °C a pH 6,5–7. Někteří zástupci jsou halofilní a *C. thiosulfatireducens* je schopno přežít i v prostředí obsahujícím až 60 g/l NaCl (Rainey et al., 2015; Wiegel, 2015).

Metabolicky se jedná o velmi rozmanitou skupinu, kdy některé druhy tohoto rodu jsou chemoautotrofní či chemolitotrofní (Sedláček, 2007). Většina zástupců se však řadí mezi mikroorganismy s chemoheterotrofním metabolismem a je schopna využít široké spektrum uhlikatých (monosacharidy, oligosacharidy, škrob, celulóza) i dusíkatých látek (bílkoviny, peptony, puriny, pyrimidiny) za vzniku celé řady organických kyselin a alkoholů (Dürre, 2014). Některé druhy jsou schopny fixovat vzdušný dusík (*C. pasteurianum*) (Dürre, 2014; Rainey et al., 2015; Sedláček, 2007). Do rodu *Clostridium* nespádají zástupci, kteří jsou schopni redukovat sírany a siřičitany. Ti byli přejazeni do rodu *Desulfotomaculum* (Dürre, 2014; Rainey et al., 2015; Šilhánková, 2002). Rod *Clostridium* je druhově velmi bohatý (zahrnuje více než 160 druhů); na základě různé metabolické aktivity lze klostridia rozdělit do tří skupin: 1) druhy se sacharolytickými i proteolytickými metabolickými drahami, které tvoří kyselinu z glukosy a hydrolyzují želatinu (např. *C. botulinum*); 2) sacharolytické neproteolytické druhy, které tvoří kyselinu z glukosy, ale nehydrolyzují želatinu (např. *C. butyricum*); 3) proteolytické druhy, které hydrolyzují želatinu, ale netvoří kyselinu z glukosy (např. *C. tetani*) (Sedláček, 2007; Wiegel, 2015).

Klostridia jsou izolována z různých prostředí, jako jsou např. potraviny, říční a mořské usazeniny, zažívací trakt živočichů, dřevní hmota, půda, prach, stoční kal, rozkládající se rostlinný materiál a humánní či veterinární klinický materiál. Některé dokonce osidlují termální prameny a vulkanické systémy (Rainey et al., 2015; Sedláček, 2007; Šilhánková, 2002). Díky své bohaté enzymové vybavenosti je tento rod využíván v celé řadě biotechnologických odvětví (produkce enzymů, biopaliv a chemikálií jako: aceton, butanol, kys. máselná, atd.) (Dürre, 2014; Šilhánková, 2002). Malé procento druhů (např. *C. botulinum*, *C. perfringens*, *C. tetani*) je schopné produkovat i velmi nebezpečné toxiny a jsou patogenní pro člověka a zvířata (Dürre, 2014). Tyto patogenní druhy klostridií nejsou schopny přežít v hotovém pivu a z hotového piva nebyly izolovány (van Vuuren a Priest, 2003).

### 3 BAKTERIE CLOSTRIDIUM V PIVOVARSTVÍ

Obecně je rod *Clostridium* řazen mezi méně rizikové pivovarské kontaminanty, které se v pivu vyskytují vzácně a nepomnožují se v něm (tzv. latentní zárodky) (Back, 1991; Kosař a Procházka, 2000). Zástupci rodu *Clostridium* produkující kyselinu máselnou se mohou řadit též mezi bakterie způsobující nepřímé kažení piva. To znamená, že klostridie sice nejsou schopny růst v pivu, ale jsou schopny růst během přípravy sladiny i mladiny nebo na různých substrátech vstupujících do technologického procesu, a svou metabolickou aktivitou zapříčiní vznik nežádoucí chuti a vůně piva (Storgårds, 2000). Jejich růst v pivu je inhibován zejména přítomností hořkých chmelových látek (působí na gram pozitivní bakterie a inhibují funkce buněčné membrány) a kyselým pH (ovlivňuje enzymovou aktivitu buněk a posiluje inhibiční vliv chmelových látek) (Vrisekoop et al., 2012). Nicméně autoři odborných publikací poukazují na to, že některé druhy rodu *Clostridium* (např. *C. butyricum*, *C. acetobutylicum*, *C. botulinum*) jsou schopny růst i při pH 3,7–4,8. Tedy i při hodnotách pH, které jsou pro pivo běžné (pH piva se pohybuje v rozmezí 3,4–4,8) (Rainey et al., 2015; Suzuki, 2015; Vrisekoop et al., 2012; Wong et al., 1988). Potenciální riziko však představují tyto bakterie zejména pro méně chmelená piva s vyššími hodnotami pH, ve kterých by mohlo dojít k jejich pomnožení (Suzuki, 2015).

Bylo prokázáno, že zástupci rodu *Clostridium* mohou do pivovarského provozu vstupovat s chmelem, sladem (našrotovaný vlhký slad skladovaný po delší dobu) nebo ze sladových náhražek (nesla-

hopped beers with higher pH values, in which they may grow (Suzuki, 2015).

It has been shown that the representatives of genus *Clostridium* may enter the brewery with hops, malt (milled moist malt stored for a longer period of time), or malt substitutes (unmalted barley, starch extracts, syrups and concentrates; malt extracts; glucose syrups; etc.) (Back, 2005; Bokulich and Bamforth, 2013; Hawthorne et al., 1991; Storgårds, 2000). In connection with the contamination of feedstocks, the publications mention species *C. acetobutylicum*, *C. cellulovorans* and *C. thermocellum*, which were detected in malt (Leschine, 2005); *C. tertium*, which was detected in a glucose syrup storage tank (Hawthorne et al., 1991). According to Bennett (1996), clostridia also represent a risk for the production of ciders, to which these bacteria may get from contaminated apple juices. It can thus be concluded that the brewing operation could be contaminated with fruit juices and syrups, which are used as additives for the preparation of Radler-type beverages.

The genus *Clostridium* is most commonly associated with the contamination of brewing intermediates (wort, boiled wort) (Back, 2005; Hawthorne et al., 1991). In this connection the studies mention the species *C. acetobutylicum*, *C. butyricum*, *C. pasteurianum*, „*C. thermosaccharolyticum*“ (now classified as *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*) and *C. tyrobutyricum* (Back, 2005). The comparison of species detected in brewing operations is shown in Table 1. Due to their ability to produce substances such as butyric, propionic, valeric, caproic acid, sulfur compounds, and others, clostridia may cause irreversible degradation of these substrates and finished beer, which then shows a cheesy, buttery, putrid and rancid aroma, or aroma that evokes the smell of children's vomit (Back, 2005; Bamforth et al., 2009; Bokulich and Bamforth 2013; Hawthorne et al., 1991; Stewart, 2012; Storgårds, 2000). An increase of viscosity has not been proven for such a spoiled beer (Storgårds, 2000). *T. thermosaccharolyticum* was also isolated from yeast samples, but the production of unpleasant taste and odor of the finished beer has not been confirmed (Back, 2005).

During fermentation, a small amount of butyric acid is produced in beer by the metabolic pathways of the cultural yeast (e.g. in Australian beers the concentration of butyric acid is in the range of 0.5-1.4 mg/l) (Hawthorne et al., 1991). However, due to the activity of clostridia (e.g. *Clostridium butyricum*), the limit of 2 mg/l of butyric acid may be exceeded and it leads to the spoiling of the beer, which then exhibits a strong buttery taste and odor (Stewart, 2012).

dovaný ječmen, škrobnaté výluhy, sirupy a koncentráty; sladové výtažky; glukosové sirupy; atd.) (Back, 2005; Bokulich a Bamforth, 2013; Hawthorne et al., 1991; Storgårds, 2000). V souvislosti s kontaminací vstupních surovin jsou v publikacích uváděny druhy *C. acetobutylicum*, *C. cellulovorans* a *C. thermocellum*, které byly detekovány ve sladu (Leschine, 2005); *C. tertium*, které bylo detekováno v zásobním tanku na glukosový sirup (Hawthorne et al., 1991). Podle Bennetta (1996) představují klostridie riziko také při výrobě ciderů, do kterých se mohou tyto bakterie dostat z kontaminovaných jablečných šťáv. Z tohoto poznatku lze usuzovat, že v pivovarském odvětví by mohlo dojít ke kontaminaci ovocných šťáv a sirupů používaných jako přídavné látky pro přípravu nápoje typu radler.

Nejčastěji bývá rod *Clostridium* spojován s kontaminací pivovarských meziproductů (sladina, mladina) (Back, 2005; Hawthorne et al., 1991), v této souvislosti jsou v publikacích popsány druhy *C. acetobutylicum*, *C. butyricum*, *C. pasteurianum*, „*C. thermosaccharolyticum*“ (nyní klasifikováno jako *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*) a *C. tyrobutyricum* (Back, 2005). Srovnání druhů detekovaných v pivovarských provozech je uvedeno v tab. 1. Díky své schopnosti produkovat látky jako kyseliny máselnou, propionovou, valerovou, kapronovou, siričné sloučeniny a další, mohou klostridie způsobit nevratné znehodnocení takovýchto substrátů a hotového piva, které poté vykazuje sýrové, máslové, zatuchlé a žluklé aroma či aroma evokující pach dětských zvratků (Back, 2005; Bamforth et al., 2009; Bokulich a Bamforth 2013; Hawthorne et al., 1991; Stewart, 2012; Storgårds, 2000). U takto poškozeného piva nebyl prokázán nárůst jeho viskozity (Storgårds, 2000). *T. thermosaccharolyticum* bylo izolováno ze vzorků násadních kvasnic, avšak nebyl potvrzen vznik nežádoucí chuti a vůně hotového piva (Back, 2005).

V průběhu kvašení vzniká metabolickými drahami kulturních kvasinek v pivu i malé množství máselné kyseliny, která v tomto případě dotváří chuťový charakter některých druhů pív (např. u australských pív se koncentrace máselné kyseliny pohybuje v rozmezí 0,5-1,4 mg/l) (Hawthorne et al., 1991). Ovšem v důsledku působení klostridií (např. *Clostridium butyricum*) může být překročena hranice kyseliny máselné 2 mg/l a dochází ke kažení piva, které poté vykazuje silnou máselnou chuť a vůni (Stewart, 2012).

### 3.1 Druhy rodu *Clostridium* izolované z pivovarského prostředí *Clostridium acetobutylicum*

Obligátně anaerobní rovné tyčinky se zakulacenými konci vyskytující se jednotlivě či v krátkých řetězcích. Buňky *C. acetobutylicum* jsou pohyblivé pomocí peritrichálně lokalizovaných bičků a jejich

Table 1 The characteristics of significant brewery species of genera *Clostridium*  
Tab. 1 Vlastnosti pivovarsky významných druhů rodu *Clostridium*

	<i>C. acetobutylicum</i>	<i>C. butyricum</i>	<i>C. cellulovorans</i>	<i>C. pasteurianum</i>	<i>C. thermocellum</i>	„ <i>C. thermosaccharolyticum</i> “	<i>C. tyrobutyricum</i>
Gram staining / Gramovo barvení	+	+	-	+	-	-	+
Cellobiose utilization / <i>Utilisace celobiosy</i>	+	+	+	-	+	+	-
Glucose utilization / <i>Utilisace glukosy</i>	+	+	+	+	-	+	+
Fructose utilization / <i>Utilisace fruktosy</i>	+	+	+	+	-	+	+
Maltose utilization / <i>Utilisace maltosy</i>	+	+	+	+	-	+	-
Arabinose utilization / <i>Utilisace arabinosy</i>	+	+/-	-	+/-	-	+	-
Starch hydrolysis / <i>Hydrolysa škrobu</i>	+	+	-	-	-	+	-
Optimal growth temperature (°C) / <i>Optimální teplota růstu (°C)</i>	37	37	37	37	64	55	37

+\* young cells gram-positive, older cells – switch to gram-negative / *mladé buňky gram pozitivní, starší buňky - přechod na gramnegativní*;  
+ positive / *pozitivní*; negative / *negativní*;  
+/- variable within species / *variabilní v rámci druhu*

### 3.1 Species of the genus *Clostridium* isolated from the brewing environment *Clostridium acetobutylicum*

Obligate anaerobic straight rods with rounded ends, which occur individually or in short chains. *C. acetobutylicum* cells are motile by means of peritrichous flagella and their size is in the range of 0.5-1.5 x 1.5-6 µm (Janssen et al., 2014; Wood, 1995). Younger cells are gram-positive, but older cells switch to gram-negative. Endospores have an oval shape, they are located subterminally and slightly increase the cell diameter. The temperature optimum of *C. acetobutylicum* is 37 °C, the optimal pH for growth is between pH 6.5-7 (Khamaiseh et al., 2013; Rainey et al., 2015). *C. acetobutylicum* grows in common cultivation media such as PYG agar (peptone-yeast-glucose agar) or blood agar. Colonies are then flat or slightly raised, translucent to opalescent with irregular edges (Rainey et al., 2015). In the brewing operations, *C. acetobutylicum* was isolated from malt (Leschine, 2005) and brewing intermediates (wort, boiled wort) (Back, 2005). *C. acetobutylicum* poses a risk mainly due to the fact that its metabolites include acetate, butyrate (formed mainly during the exponential growth phase), acetone and butanol (formed mainly during the stationary growth phase), which may irreversibly degrade the sensory character of the finished beer (Rainey et al., 2015).

#### *Clostridium butyricum*

Obligate anaerobic gram-positive straight rods with rounded ends, which occur individually, in pairs or in short chains (the formation of long chains is occasional). *C. butyricum* cells are motile by means of peritrichous flagella and their width and length are in the range of 0.5-1.7 x 2.4-7.6 µm. Endospores have an oval shape, they are located centrally or subterminally and usually do not increase the cell diameter. The temperature optimum of *C. butyricum* is between 30-37 °C, but they are able to grow even at 10 °C (Rainey et al., 2015). Growth can occur in the range of pH 5.5-8.5 and in the presence of 0-3% NaCl (Tanasupawat et al., 2014).

*C. butyricum* grows in common cultivation media such as GYP agar (glucose-yeast-peptone agar) with addition of CaCO<sub>3</sub> or blood agar. Colonies are then circular and opaque with slightly irregular edges (Rainey et al., 2015; Tanasupawat et al., 2014; Zigová et al., 1999). In the brewing operations, *C. butyricum* was isolated from brewing intermediates (wort, boiled wort) (Back, 2005). The main metabolites of *C. butyricum* are butyric, acetic and formic acids, which can undesirably affect the finished beer. During the hydrolysis of pectin, a large amount of methanol, H<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub>, and a small amount of ethanol are produced (Rainey et al., 2015).

#### *Clostridium cellulovorans*

Anaerobic gram-negative nonmotile rods sized 0.7-0.9 x 2.5-3.5 µm, which occur individually or in pairs. Endospores are located centrally or subterminally within a sporangium. They have oval to oblong shape and measure 1-1.5 x 2-4 µm. Sporangia then reach size 1.5-2.0 x 4-7 µm. Optimal conditions for growth of *C. cellulovorans* are around 37 °C and pH 7 (Rainey et al., 2015). *C. cellulovorans* ranks among cellulolytic bacteria with a cellulosomal system, which allows them to degrade crystalline cellulose (Foong et al., 1991; Tamaru et al., 2010). *C. cellulovorans* grows in common cultivation media, e.g. in yeast extract, where it forms colonies with opaque irregular edges and an empty center (Rainey et al., 2015). In the brewing operations, *C. cellulovorans* was isolated from malt (Leschine, 2005).

#### *Clostridium pasteurianum*

Obligate anaerobic straight to slightly curved rods 0.5-1.3 x 2.7-13.2 µm in size, which occur individually or in pairs. Cells may be motile by means of peritrichous flagella. Motility may be lost on subculture. Younger cells are gram-positive, but older cells switch to gram-negative. Endospores have an oval shape, they are located subterminally and increase the cell diameter. The temperature optimum of *C. pasteurianum* is around 37 °C, but some strains also grow well at 25 °C. The optimal pH for growth is around pH 7. However, during growth, the pH decreases to circa 5 (Rainey et al., 2015; Riebeling et al., 1975).

*C. pasteurianum* grows in common cultivation media such as PYG or blood agar, where it forms circular, slightly irregular, flat to slightly convex colonies, which are transparent or semi-transparent with a gray color and a mosaic structure (Rainey et al., 2015). In the brewing operations, *C. pasteurianum* was isolated from brewing intermediates (wort, boiled wort) (Back, 2005). The main metabolites of *C. pasteurianum*, which can undesirably affect the finished beer, include butyric and acetic acids and CO<sub>2</sub> (Rainey et al., 2015).

velikost se pohybuje v rozmezí 0,5-1,5 x 1,5-6 µm (Janssen et al., 2014; Wood, 1995). Mladší buňky se barví gram pozitivně, ale u starších buněk dochází k přechodu a buňky se barví gram negativně. Endospory mají oválný tvar, jsou umístěny subterminálně a mírně ztlušují buňku. Teplotní optimum *C. acetobutylicum* je 37 °C. Optimální pH pro růst se pohybuje okolo pH 6,5-7 (Khamaiseh et al., 2013; Rainey et al., 2015). *C. acetobutylicum* roste na běžných kultivačních půdách, jako je PYG agar (peptone-yeast-glucose agar) či krevní agar. Kolonie jsou ploché či mírně vyklenuté, průsvitné až opalescentní s nepravidelnými okraji (Rainey et al., 2015). V pivovarských provozech bylo *C. acetobutylicum* izolováno ze sladu (Leschine, 2005) a pivovarských meziproductů (sladina, mladina) (Back, 2005). V pivovarovství představuje *C. acetobutylicum* riziko převážně díky svým metabolitům - acetátu, butyrátu (vznikají převážně během exponenciální fáze růstu), acetonu a butanolu (vznikají převážně během stacionární fáze růstu), které mohou nevratně znehodnotit senzoričkový charakter hotového piva (Rainey et al., 2015).

#### *Clostridium butyricum*

Obligátne anaerobní gram pozitivní rovné tyčinky se zaoblenými konci vyskytující se jednotlivě, v párech či krátkých řetězcích (tvorba dlouhých řetězků je ojedinělá). Buňky *C. butyricum* jsou pohyblivé pomocí peritrichálně umístěných bičků a jejich šířka a délka se pohybuje v rozmezí 0,5-1,7 x 2,4-7,6 µm. Endospory mají oválný tvar, jsou umístěny centrálně či subterminálně a obvykle neztvrdí průměr buňky. Teplotní optimum pro růst *C. butyricum* se pohybuje okolo 30-37 °C, ale jsou schopny růst i při 10 °C (Rainey et al., 2015). Růst vykazuje v rozmezí pH 5,5-8,5 a v přítomnosti 0-3% NaCl (Tanasupawat et al., 2014). *C. butyricum* roste na běžných kultivačních půdách, jako je GYP agar (glucose-yeast-peptone agar) s přidavkem CaCO<sub>3</sub> či krevní agar. Kolonie jsou pak kruhové a neprůhledné s mírně nepravidelnými okraji (Rainey et al., 2015; Tanasupawat et al., 2014; Zigová et al., 1999). V pivovarských provozech bylo *C. butyricum* izolováno z pivovarských meziproductů (sladina, mladina) (Back, 2005). Mezi hlavní metabolity *C. butyricum*, které mohou negativně ovlivnit hotové pivo, se řadí kyselina máselná, octová a mravenčí. Během hydrolysy pektinu vzniká ještě velké množství methanolu, H<sub>2</sub> a CO<sub>2</sub> a malé množství ethanolu (Rainey et al., 2015).

#### *Clostridium cellulovorans*

Anaerobní gram negativní nepohyblivé tyčinky o velikosti 0,7-0,9 x 2,5-3,5 µm vyskytující se jednotlivě či v párech. Endospory jsou umístěny centrálně či subterminálně ve sporangiu, mají oválný až podlouhlý tvar a jsou 1-1,5 x 2-4 µm velké. Sporangia pak dosahují velikosti 1,5-2,0 x 4-7 µm. Optimální podmínky pro růst *C. cellulovorans* se pohybuje okolo 37 °C a pH 7 (Rainey et al., 2015). *C. cellulovorans* se řadí mezi celulolytické bakterie disponující celulosomálním systémem, který jim umožňuje degradovat krystalickou celulosu (Foong et al., 1991; Tamaru et al., 2010). *C. cellulovorans* roste na běžných kultivačních půdách, např. na kvasničném extraktu, kde tvoří kolonie s neprůhlednými nepravidelnými okraji a prázdným středem (Rainey et al., 2015). V pivovarských provozech bylo *C. cellulovorans* izolováno ze sladu (Leschine, 2005).

#### *Clostridium pasteurianum*

Obligátne anaerobní rovné až mírně zakřivené tyčinky o velikosti 0,5-1,3 x 2,7-13,2 µm vyskytující se jednotlivě či v párech. Buňky mohou být pohyblivé pomocí peritrichálně umístěných bičků, v rámci subkultury však může dojít ke ztrátě pohyblivosti buněk. Mladší buňky se barví gram pozitivně, ale u starších buněk dochází ke změně a barví se gram negativně. Endospory mají oválný tvar, jsou umístěny subterminálně a zvětšují průměr buňky. Teplotní optimum *C. pasteurianum* se pohybuje okolo 37 °C, ale kmeny vykazuje relativně dobrý růst také při 25 °C. Optimální pH pro růst se pohybuje okolo pH 7, během růstu však dochází k poklesu pH na hodnoty okolo 5 (Rainey et al., 2015; Riebeling et al., 1975).

*C. pasteurianum* roste na běžných kultivačních půdách, jako PYG či krevní agar, kde tvoří kruhové, mírně nepravidelné, ploché až mírně vypouklé kolonie, které jsou transparentní či semitransparentní se šedavou barvou a mozaikovou strukturou (Rainey et al., 2015).

V pivovarských provozech bylo *C. pasteurianum* izolováno z pivovarských meziproductů (sladina, mladina) (Back, 2005). Mezi hlavní metabolity *C. pasteurianum*, které mohou negativně ovlivnit hotové pivo, se řadí kyselina máselná, octová a CO<sub>2</sub> (Rainey et al., 2015).

***Clostridium thermocellum***

Obligate anaerobic straight or slightly curved rods sized 0.6-0.7 x 2.5-3.5 µm, which occur mostly singly. They can also form long chains in liquid media. Representatives of this genus are gram-negative, spore-forming bacteria, which are nonmotile or motile by means of lateral flagella (i.e. located only on one side of the cell). Endospores have an oval shape, they are located terminally and increase the cell diameter (McBee, 1954; Rainey et al., 2015). They are thermophilic, with optimal growth temperature between 60-64 °C. Their growth is inhibited at 37 °C (Rainey et al., 2015). The optimal pH for growth is in the range of pH 6.7-7 (Freier et al., 1988).

Representatives of this genus are able to grow in common culture media, such as e.g.: cellulose agar. They then form watery, slightly convex translucent colonies, which frequently produce an insoluble yellow pigment. Deep colonies in cellulose agar have a round shape, a white or yellow-orange color, and a filamentous character (McBee, 1954; Rainey et al., 2015). In the brewing operations, *C. thermocellum* was isolated from malt (Leschine, 2005). The main metabolites of *C. thermocellum*, which can undesirably affect the finished beer, include acetic and lactic acids, ethanol and CO<sub>2</sub> (Rainey et al., 2015).

**“*Clostridium thermosaccharolyticum*”****(*Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*)**

Species formerly classified (and in some literature sources still named) as “*Clostridium thermosaccharolyticum*”, now classified as *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* (Collins et al., 1994). Obligate anaerobic gram-negative, slim and long rods. Endospores are circular, terminally located and increase the cell diameter. The optimal growth temperature is around 55 °C. Optimal pH for growth is in the range of 6.2-7.2 and optimal pH for sporulation is in the range of 5-5.5 (Hsu and Ordal, 1969).

Commercially available media are commonly used for the detection of this genus, such as PE-2 media or liver broth (Ashton, 1981). In the brewing operations, *C. thermosaccharolyticum* was isolated from brewing intermediates (wort, boiled wort) and yeast samples (Back, 2005).

***Clostridium tyrobutyricum***

Obligate anaerobic gram-positive rods 1.1–1.6 x 1.9–13.3 µm in size, which occur individually or in pairs and are usually motile by means of peritrichous flagella. Endospores have an oval shape, they are located subterminally and increase the cell diameter. The optimal growth temperature is in the range of 30-37 °C (Rainey et al., 2015). Optimal pH for growth is 6.2-7.2, but Zhu and Yang (2004) have shown, that *C. tyrobutyricum* is able to survive even at pH 4.5. Some strains are able to reduce nitrate to nitrite and can thus participate in the production of harmful N-nitrosamines (Fu et al., 2017; Rainey et al., 2015; Zhu and Yang, 2004).

Rainey et al. (2015) mention as a suitable culture medium PYG agar or blood agar. On it, bounded, slightly convex, round colonies with a glossy surface and a gray pigment are formed.

In the brewing operations, *C. tyrobutyricum* was isolated from brewing intermediates (wort, boiled wort) (Back, 2005). Due to the metabolic activity of each strain, a large amount of acetic and butyric acid is produced. Both these metabolites may undesirably affect the sensory profile of the finished beer (Rainey et al., 2015).

**4 CONCLUSIONS**

Endospores of clostridia are able to survive the conditions of mashing and wort boiling, but they cannot germinate in the following phases of beer production – their growth is inhibited by bitter hop substances and acidic pH. However, the presence of clostridia in the early stages of boiled wort preparation also represents the risk of damage of the finished beer – vegetative cells form a whole range of undesirable organic acids, which may get to the finished product. Pathogenic species of clostridia are unable to survive in finished beer and were not isolated from the finished beer.

**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).

***Clostridium thermocellum***

Obligátne anaerobní rovné či mírně zakřivené tyčinky o velikosti 0,6-0,7 x 2,5-3,5 µm vyskytující se většinou jednotlivě. V kapalných médiích mohou tvořit i dlouhé řetízky. Zástupci tohoto druhu jsou gramnegativní sporulující bakterie, které jsou nepohyblivé nebo pohyblivé pomocí laterálně umístěných bičíků (tj. pouze na jedné straně buňky). Endospory mají oválný tvar, jsou umístěny terminálně a zvětšují průměr buňky (McBee, 1954; Rainey et al., 2015). Jedná se o termofilní bakterie vykazující optimální růst při teplotě okolo 60-64 °C, při 37 °C dochází k inhibici růstu (Rainey et al., 2015). Optimální pH pro růst se pohybuje v rozmezí pH 6,7-7 (Freier et al., 1988).

Zástupci tohoto druhu jsou schopni růst na kultivačních médiích, jako je např. celulosový agar, na jehož povrchu se tvoří slizovitě, mírně vypouklé průsvitné kolonie, které často produkují nerozpustné žluto-oranžové pigmenty. Kolonie prorůstající hlouběji do celulosového agaru mají kulatý tvar, bílou či žluto-oranžovou barvu a vláknitý charakter (McBee, 1954; Rainey et al., 2015).

V pivovarských provozech bylo *C. thermocellum* izolováno ze sladu (Leschine, 2005). Mezi hlavní metabolity *C. thermocellum*, které mohou negativně ovlivnit hotové pivo, se řadí kyselina octová, mléčná, ethanol a CO<sub>2</sub> (Rainey et al., 2015).

**„*Clostridium thermosaccharolyticum*“****(*Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*)**

Druh původně klasifikovaný (a v některé literatuře stále uváděný) jako „*Clostridium thermosaccharolyticum*“, nyní klasifikovaný jako *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* (Collins et al., 1994). Obligátne anaerobní gramnegativní, štíhlé a dlouhé tyčinky. Endospory jsou cirkulární, terminálně umístěné a ztlušují buňku. Optimální teplota růstu se pohybuje okolo 55 °C. Optimální pH pro růst se pohybuje v rozmezí 6,2-7,2 a optimální pH pro sporulaci v rozmezí 5-5,5 (Hsu a Ordal, 1969).

Pro detekci tohoto rodu bývají používána komerčně dostupná média, jako PE-2 médium či játrový bujón (Ashton, 1981). V pivovarských provozech bylo *T. thermosaccharolyticum* izolováno z pivovarských meziproductů (sladina, mladina) a ze vzorků násadních kvasnic (Back, 2005).

***Clostridium tyrobutyricum***

Obligátne anaerobní gram pozitivní tyčinky o velikosti 1,1–1,6 x 1,9–13,3 µm vyskytující se jednotlivě či v párech, které jsou obvykle pohyblivé pomocí peritrichálně umístěných bičíků. Endospory jsou oválné, subterminálně umístěné a ztlušují buňky. Optimální teplota růstu se pohybuje v rozmezí 30-37 °C (Rainey et al., 2015). Optimální pH růstu 6,2-7,2, ale Zhu a Yang (2004) prokázali, že je *C. tyrobutyricum* schopen přežít i při pH 4,5. Některé kmeny jsou schopny redukovat dusičnany na dusitany a mohou se tak podílet na tvorbě zdraví škodlivých N-nitrosaminů (Fu et al., 2017; Rainey et al., 2015; Zhu a Yang, 2004).

Rainey et al. (2015) uvádí jako vhodná kultivační média např. PYG agar či krevní agar, na kterém *C. tyrobutyricum* tvoří ohraničené, mírně vypouklé kruhové kolonie s lesklým povrchem a šedavou barvou.

V pivovarských provozech bylo *C. tyrobutyricum* izolováno z pivovarských meziproductů (sladina, mladina) (Back, 2005). V důsledku metabolické činnosti jednotlivých kmenů dochází k produkci velkého množství kyselin octové a máselné, což může negativně ovlivnit senzorycký profil hotového piva (Rainey et al., 2015).

**4 ZÁVĚR**

Endospory klostridií jsou schopné přežít podmínky rmutování i chmelovaru, ale v navazujících fázích výroby piva nemohou vyklíčit – jejich další rozvoj je potlačen působením hořkých chmelových látek a kyselého pH. Výskyt klostridií v prvotních fázích přípravy mladiny však i tak přináší riziko poškození hotového piva – vegetativní buňky tvoří celou řadu nežádoucích organických kyselin, které mohou přejít až do hotového výrobku. Patogenní druhy klostridií nejsou schopny přežít v hotovém pivu a z hotového piva nebyly izolovány.

**PODĚKOVÁNÍ**

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

## REFERENCES / LITERATURA

- Ashton, D. H., 1981: Thermophilic organisms involved in food spoilage: Thermophilic anaerobes not producing hydrogen sulfide. *J. Food. Prot.*, 44(2): 146–148.
- Back, W., 1991: Mikrobiologie in der Brauerei. In: *Brau-Rundschr.*, 102: 80–85.
- Back, W., 2005: Brewery. In: Back W. (Ed.), *Colour atlas and handbook of beverage biology*. Verlag Hans Carl, Nürnberg, Germany.
- Basařová, G., Šavel, J., Basař, P., Lejsek, T., 2010: *Pivovarství – Teorie a praxe výroby piva*. Vydavatelství VŠCHT Praha.
- Bennett, S. J. E., 1996: Off-flavours in alcoholic beverages. In: Saxby, M. J. (Ed.), *Food taints and off-flavours*. Springer Science + Business Media Dordrecht. ISBN 978-1-4615-2151-8.
- Bokulich, N. A., Bamforth, C. W., 2013: The microbiology of malting and brewing. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 77: 157–172.
- Chaine, A., Levy, C., Lacour, B., Riedel, C., Carlin, F., 2012: Decontamination of sugar syrup by pulsed light. *J. Food. Prot.*, 75(5): 913–917.
- Collins, M. D., Lawson, P. A., Willems, A., Cordoba, J. J., Fernandez-Garayzabal, J., Garcia, P., Cai, J., Hippe, H., Farrow, J. A. E., 1994: The phylogeny of the genus *Clostridium*: proposal of five new genera and eleven new species combinations. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 44: 812–826.
- Dürre, P., 2014: Physiology and sporulation in *Clostridium*. *Microbiol. Spectrum*, 2(4): 315–329.
- Foong, F., Hamamoto, T., Shoseyov, O., Doi, R. H., 1991: Nucleotide sequence and characteristics of endoglucanase gene *engB* from *Clostridium cellulovorans*. *J. Gen. Microbiol.*, 137: 1729–1736.
- Freier, D., Mothershed, C. P., Wiegel, J., 1988: Characterization of *Clostridium thermocellum* JW20. *Appl. Environ. Microbiol.*, 54(1): 204–211.
- Fu, H., Yu, L., Lin, M., Wang, J., Xiu, Z., Yang, S.T., 2017: Metabolic engineering of *Clostridium tyrobutyricum* for enhanced butyric acid production from glucose and xylose. *Metab. Eng.*, 40: 50–58.
- Hawthorne, D. B., Shaw, R. D., Davine, D. F., Kavanagh, T. E., 1991: Butyric acid off-flavors in beer: Origins and control. *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, 49: 0004.
- Hsu, E. J., Ordal, Z. J., 1969: Sporulation of *Clostridium thermosaccharolyticum* under conditions of restricted growth. *J. Bacteriol.*, 97(3): 1511–1512.
- Janssen, H., Wang, Y., Blaschek, H.P. (2014): *Clostridium acetobutylicum*. In Batt, C. A., Tortorello, M. L. (Ed.), *Encyclopedia of food microbiology*. Academic Press is an imprint of a Elsevier. ISBN 978-0-12-384730-0.
- Khamaiseh, E. I. S., Hamid, A. A., Yusoff, W. M. W., Kalil, M. S., 2013: Effect of some environmental parameters on biobutanol production by *Clostridium acetobutylicum* NCIMB 13357 in date fruit medium. *Pak. J. Biol. Sci.*, 16(20): 1145–1151.
- Kosař, K., Procházka, S., 2000: *Technologie výroby sladu a piva*. Praha: Výzkumný ústav pivovarský a sladařský. ISBN 80-902658-6-3.
- Leschine, S., 2005: Degradation of polymers: cellulose, xylan, pectin, starch. In: Dürre, P., editor, *Handbook on Clostridia*. Taylor & Francis Group. ISBN: 0-8493-1618-9.
- McBee, R. H., 1954: The characteristics of *Clostridium thermoceillum*. *J. Bacteriol.*, 67(4): 505–506.
- Menz, G., Aldred, P., Vriesekoop, F., 2009: Pathogens in beer. In: Preedy, W. R., editor, *Beer in Health and Disease Prevention*. Academic Press is an imprint of Elsevier. ISBN 978-0-12-373891-2.
- Rainey, F. A., Hollen, B. J., Small A. M., 2015: *Clostridium*. 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.
- Riebeling, V., Thauer, R.K., Jungermann, K., 1975: The internal-alkaline pH gradient, sensitive to uncoupler and ATPase inhibitor, in growing *Clostridium pasteurianum*. *Eur. J. Biochem.*, 55: 445–453.
- Sedláček, I., 2007: *Taxonomie prokaryot*. 1. vydání, Masarykova univerzita, Brno. ISBN 80-210-4207-9.
- Stewart, G. G., 2012: Butyric acid. In: Garrett Oliver, editor, *The Oxford companion to beer*. Published by Oxford University Press, Inc. ISBN 978-0-19-536713-3.
- Storgårds, E., 2000: Prosecc hygiene control in beer production and dispensing. *Valtion teknillinen tutkimuskeskus (VTT)*. ISBN 951–38–5560–0.
- Suzuki, K., 2015: Gram-positive spoilage bacteria in brewing. In: Hill, A. E. (Ed.), *Brewing microbiology. Managing microbes, ensuring quality and valorising waste*. Woodhead Publishing is an imprint of Elsevier Cambridge, Woodhead Publishing, ISBN 978-1-78242-331-7.
- Šilhánková, L., 2002: *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnologii*. Academia nakladatelství Akademie věd České republiky. ISBN 8-85605-71-6 (2.vydání).
- Tamaru, Y., Miyake, H., Kuroda, K., Ueda, M., Doi, R. H., 2010: Comparative genomics of the mesophilic cellulose-producing *Clostridium cellulovorans* and its application to biofuel production via consolidated bioprocessing. *Environ. Technol.*, 31(8-9): 889–903.
- Tanasupawat, S., Prasirtsak, B., Pakdeeto, A., Thongchul, N., 2014: Characterization and fermentation products of *Clostridium butyricum* strains isolated from Thai soils. *J. Appl. Pharm. Sci.*, 4 (04): 020–023.
- van Vuuren, H. J. J., Priest, F. G., 2003: Gram-negative brewery bacteria. In: Priest, F. G., Campbell, I., editors, *Brewing Microbiology 3rd ed.*, Kluwer Academic/Plenum Publishers: New York.
- 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.
- Wiegel, J., 2015: *Clostridiaceae*. 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, DOI: 10.1002/9781118960608.
- Wong, D. M., Young-Perkins, K. E., Merson, R. L., 1988: Factors influencing *Clostridium botulinum* spore germination, outgrowth, and toxin formation in acidified media. *Appl. Environ. Microbiol.*, 54: 1446–1450.
- Wood, D.R., 1995: The genetic engineering of microbial solvent production. *Trends Biotechnol.*; 13: 259–264.
- Zhu, Y., Yang, S. T., 2004: Effect of pH on metabolic pathway shift in fermentation of xylose by *Clostridium tyrobutyricum*. *J. Biotechnol.*, 110: 143–157.
- Zigová, J., Šturdík, E., Vandak, D., Schlosser, S., 1999: Butyric acid production by *Clostridium butyricum* with integrated extraction and pertraction. *Proc. Biochem.*, 34: 835–843.