

DOI: 10.18832/kp201730

Mikrobiologie pivovarské výroby – Bakterie mléčného kvašení a kultivační metody jejich detekce – III. Část

Brewing microbiology – Lactic Acid Bacteria and Cultivation Methods of Their Detection – Part III

Petra KUBIZNIAKOVÁ, Eva VONTROBOVÁ, Tomáš VRZAL, Dagmar MATOULKOVÁ
Oddělení mikrobiologie, Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, a. s., Lípová 15, 120 44 Praha 2
Department of Microbiology, Research Institute of Brewing and Malting, PLC, Lípová 15, 120 44 Prague
e-mail: kubizniakova@beerresearch.cz

Recenzovaný článek / Reviewed Paper

Kubizniaková, P., Vontrovová, E., Vrzal, T., Matoulková, D., 2017: Mikrobiologie pivovarské výroby – Bakterie mléčného kvašení a kultivační metody jejich detekce – III. Část. Kvasny Prum. 63(6): 307–313

Ve studii byl sledován růst souboru 10 kmenů bakterií rodu *Lactobacillus* a *Pediococcus* na ztužených kultivačních půdách, např. MRS agaru a jeho různých modifikacích, na půdě Raka-Ray, NBB, UBA atd. Sledována byla rychlost tvorby bakteriálních kolonií a jejich velikost. Kmeny byly na kultivační média naočkovány přímo z piva, a to ve dvou variantách – s předchozí postupnou adaptací na pivo a bez fáze adaptace. Postupné převádění bakterií do půdy se stoupající koncentrací piva (fáze adaptace) u některých kmenů zvýšilo jejich schopnost dlouhodobého přežívání v pivu. Při následném testování kultivačních médií byla jako nejúčinnější vyhodnocena půda MRS a její modifikace. Půda Raka-Ray byla vyhodnocena jako nejméně vhodná pro detekci bakterií mléčného kvašení.

Kubizniaková, P., Vontrovová, E., Vrzal, T., Matoulková, D., 2017: Brewing microbiology – Lactic acid bacteria and cultivation methods of their detection – part III. Kvasny Prum. 63(6): 307–313

Here we present data on the growth of 10 strains of *Lactobacillus* and *Pediococcus* species on solidified culture media, e.g. MRS agar and its various modifications, the media RakaRay, NBB, UBA, etc. The rate of formation of bacterial colonies and their size were monitored. Strains were inoculated into culture media directly from beer, in two varieties – with previous gradual adaptation to beer and without the adaptation phase. Some strains showed increased long-term survival ability in beer if the bacteria were gradually transferred to a medium with increasing concentration of beer (adaptation phase). In subsequent testing of cultivation media, MRS and its modification were evaluated as the most effective. Raka-Ray was evaluated as the least suitable for the detection of lactic acid bacteria.

Kubizniaková, P., Vontrovová, E., Vrzal, T., Matoulková, D., 2017: Mikrobiologie der Brauproduktion Milchsäurebakterien und Kultivationsmethoden ihrer Detektion– III.Teil. Kvasny Prum. 63(6): 307–313

Im Artikel wird ein Wachstum von 10 Stämmen Bakterien der Gattung *Lactobacillus* und *Pediococcus* auf den verhärteten Böden, z.B. MRS Agar und seinen verschiedenen Modifikationen, Raka-Ray Boden, NBB, UBA u.s.w. beschrieben. Es wurde die Bildungsgeschwindigkeit und Größe von Bakterienkolonien verfolgt. Die Stämme aus dem Bier wurden in zwei Varianten – mit einer vorherigen Anpassung an das Bier, und ohne das Stadium der Anpassung direkt auf das Kulturmedium geimpft. Die allmähliche Übertragung von Bakterien auf den Boden mit einer zunehmenden Bierkonzentration (Anpassungsphase), bei einigen Stämmen ist ihre Fähigkeit des Langzeitüberlebens im Bier erhöht worden. Aus den folgenden Testen der Kulturmedien ist der MRS Boden und seine Modifikation als die beste ausgewertet. Raka-Ray Boden wies als der am wenigsten geeignet für die Detektion von Milchsäuren auf.

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

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

1 ÚVOD

Tato studie navazuje na články týkající se problematiky kultivačních metod detekce bakterií mléčného kvašení: literární rešerši zahrnující jednak základní charakteristiku této skupiny bakterií z hlediska rizika pro výrobu piva a jednak stručný přehled vývoje kultivačních médií (Matoulková a Kubizniaková, 2015) a článek shrnující výsledky laboratorního testování vybraných půd určených pro detekci mléčných bakterií (Kubizniaková a Matoulková, 2016). Z úvodního článku vyplynulo, že nejčastěji používanými půdami pro detekci bakterií mléčného kvašení jsou různě modifikované půdy MRS a NBB. V navazující studii byla jako nejlepší vyhodnocena půda MRS a její modifikace, K-MRS (s aplikací enzymu katalasy) a B-MRS (s přidáváním piva), na nichž narostly všechny bakteriální kmeny nejrychleji a poskytovaly největší kolonie (Kubizniaková a Matoulková, 2016). Ve studii byly použity čisté laboratorní kmeny, které sice byly izolovány z piva nebo z pivovarského prostředí, ale již dlouhou dobu byly uchovávány v laboratorních podmínkách, tj. bez hořkých chmelových látek, alkoholu, v médiu s optimálním složením. Takové kmeny pak nemusí růst např. na půdách obsahujících pivo, neboť během dlouhodobého skladování v laboratorních podmínkách ztratily schopnost růst v přítomnosti hořkých chmelových látek a alkoholu (Suzuki et al., 2006). V literatuře byl u některých mléčných bakterií popsán stav „obtížné kultivovatelnosti“, který souvisí s jejich adaptací na specifické prostředí, v tomto případě na pivo. Tento stav, nazývaný také stavem „životaschopnosti ale nekultivovatelnosti“ (tzv.

1 INTRODUCTION

This study is a sequel of a series of articles on the issue of cultivation methods for detection of lactic acid bacteria: a literature review including the basic characteristics of this group of bacteria in terms of their risk for beer production and a brief overview of the development of culture media (Matoulková and Kubizniaková, 2015) and an article summarizing the results of laboratory testing of selected culture media for detection of lactic bacteria (Kubizniaková and Matoulková, 2016). The introductory article showed that the most commonly used media for detection of lactic acid bacteria are variously modified MRS and NBB media. In the following study, MRS and its modification were evaluated as the best, all bacterial strains grew fastest and had the largest colonies in media of K-MRS (with the enzyme catalase) and B-MRS (with beer addition) (Kubizniaková and Matoulková, 2016). Here we used pure laboratory strains that were isolated from beer or from brewing environment. These strains have been stored for a long time under laboratory conditions, i.e. without bitter hop substances, alcohol, on a medium with optimal composition. Such strains need not grow e.g. on media containing beer, because they lost their ability to grow in the presence of bitter hops substances and alcohol during long-term storage under laboratory conditions (Suzuki et al., 2006). In the literature, the characteristic “difficult cultivation” described for some lactic bacteria is related to the adaptation of bacteria to a specific environment, in this case to beer. This condition

VBNC; viable but nonculturable), je indukován při naočkování bakterií ze specifického prostředí (např. piva) na běžné kultivační médium. Tzv. VBNC fenotyp, který je charakterizován neschopností buněk vytvářet kolonie na růstovém médiu, přestože jsou živé a udržují si metabolickou aktivitu, se vyskytuje u bakterií, které jsou vysoce adaptované na podmínky prostředí, v němž se vyskytují před přenesením na standardní živnou půdu (Oliver, 2005). Existence fenoménu VBNC je známa již přes 30 let, mechanismy tohoto způsobu existence mikroorganismů však zdaleka nejsou objasněny (Pinto et al., 2015). Mezi druhy bakterií schopnými kazit pivo byl fenomén VBNC popsán u *Lactobacillus acetotolerans*, *L. lindneri*, *L. paracollinoides* a *L. plantarum* (Deng et al., 2014; Li et al., 2017; Liu et al., 2016; 2017; Suzuki et al., 2004).

Ve studiích, které se zabývají mléčnými bakteriemi adaptovanými na podmínky v pivu, se k indukci stavu VBNC využívá např. jejich inkubace v odplyněném pivu s upraveným pH a opakované přeočkování v pravidelných intervalech do čerstvého odplyněného piva; metody mohou být různě modifikované (Deng et al., 2015; Suzuki et al., 2006). Cílem těchto prací je zavedení metody, která by umožnila v podmínkách provozní pivovarské laboratoře detekovat bakterie vyškycující se ve stavu VBNC.

Abychom se přiblížili podmínkám v pivovarské laboratoři, použili jsme v této studii 10 vybraných kmenů mléčných bakterií, které byly na testované půdy naočkovány z piva. Pro testování byly zvoleny dva odlišné přístupy: 1) naočkování bakterií do piv a jejich následné naočkování v určitých intervalech na testované kultivační média a 2) postupné převádění bakterií do médií se stoupající koncentrací piva (tzv. fáze adaptace) a jejich následné naočkování do piva a navazující testování kultivačních půd.

2 MATERIÁL A METODY

2.1 Složení a příprava kultivačních médií

Základním médiem pro kultivaci mléčných bakterií před naočkováním na testované půdy byl de Mann Rogosa Sharp (MRS) agar, který byl připraven z dehydratované půdy dodávané komerčně (Merck). Pro adaptaci kmenů na hořké chmelové látky a alkohol byl použit komerčně dodávaný dehydratovaný MRS bujón (Merck) s přísádkem piva. Při jeho přípravě byla část destilované vody nahrazena pivem, a to v koncentraci 25, 50 a 75 obj. %. Pro přípravu kultivačních půd obsahujících pivo a MRS bujónu s pivem pro fázi adaptace bylo použito světlé výčepní pivo jedné značky a šarže. Stejně pivo bylo použito i pro inkubaci bakterií (kap. 2.4.).

Použitá média:

- MRS bujón:** byl připraven z dehydratované půdy dle návodu výrobce (Merck): rozpuštěním 52,2 g dehydratovaného MRS bujónu v 1000 ml destilované vody a sterilizací 20 minut při 121 °C.
- MRS bujón (MRS) s přísádkem piva:** byl připraven z dehydratované půdy dle návodu výrobce (Merck): rozpuštěním 52,2 g dehydratovaného MRS bujónu, 250 (500, 750) ml světlého výčepního piva a 750 (500, 250) ml destilované vody a sterilizací 20 minut při 121 °C.
- MRS agar (MRS):** byl připraven z dehydratované půdy dle návodu výrobce (Merck): rozpuštěním 68,2 g dehydratované půdy v 1000 ml destilované vody a sterilizací 20 minut při 121 °C. Hotová půda má žlutohnědou barvu.
- VLB-S7 agar (VLB):** byl připraven rozehrátím komerčně dodané agarové půdy (VLB Berlin, Döehler) ve vodní lázni. Půda má tmavě zelené zbarvení.
- UBA (Universální pivní agar; Universal Beer Agar) agar (UBA):** byl připraven z dehydratované půdy dle návodu výrobce (Oxoid): rozpuštěním 62 g dehydratované půdy v 750 ml destilované vody a přidáním 250 ml světlého výčepního piva. Půda se sterilizuje 10 minut při 121 °C a hotová má žlutohnědou barvu.
- Raka-Ray agar (R-R):** byl připraven z komerčně dostupné dehydratované půdy dle návodu výrobce (Oxoid): rozpuštěním 77,1 g dehydratované půdy v 1000 ml destilované vody a sterilizací 15 minut při 121 °C. Hotová půda má hnědé zbarvení.
- NBB (Nachweismedium für Bierschädliche Bakterien) agar (NBB):** byl připraven z komerčně dodávané dehydratované půdy (NBB-P) dle návodu výrobce (Döhler): rozpuštěním 120 g dehydratované půdy a 15 g bakteriologického agaru (Oxoid) v 1000 ml destilované vody a sterilizací 10 minut při 115 °C. Hotová půda má červené zbarvení.
- B-MRS agar (B-MRS):** byl připraven rozpuštěním a smícháním 55 g dehydratovaného MRS bujónu (Merck), 15 g bakteriologic-

is also known as “viable but nonculturable” (VBNC) and is indicated by inoculating of bacteria from a specific environment (e.g. beer) to a common culture media. VBNC phenotype is characterized by the inability of cells to form colonies on growth media, although the bacteria are alive with metabolic activity. The VBNC phenotype occurs in bacteria that are highly adapted to environmental conditions in which they were prior to transfer to standard media (Oliver, 2005). The existence of VBNC phenomenon has been known for 30 years, but the life mechanisms of microorganisms in this state are not clarified (Pinto et al., 2015). In a group of bacteria that degrade beer, VBNC phenomenon was described in *Lactobacillus acetotolerans*, *L. lindneri*, *L. paracollinoides* and *L. plantarum* (Deng et al., 2014; Li et al., 2017; Liu et al., 2016; 2017; Suzuki et al., 2004).

In studies that deal with lactic bacteria adapted to conditions in beer, VBNC is induced by e.g. incubation in degassed beer with adjusted pH and repeated inoculation at regular intervals into fresh degassed beer; the methods may be variously modified (Deng et al., 2015; Suzuki et al., 2006). The aim of all these studies is to introduce a method that would allow detecting bacteria that exhibit the VBNC trait, under conditions of operational brewing laboratory.

To get closer to the conditions of brewery laboratory, we used 10 selected strains of lactic bacteria that were inoculated from beer to tested media. Two different approaches were chosen for testing: 1) inoculation of bacteria into beers and their subsequent inoculation at specified intervals to tested culture media and 2) gradual transfer of bacteria to media with increasing concentration of beer (phase of adaptation) and subsequent inoculation into beer and sequential testing of culture media.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 Composition and preparation of culture media

The basic medium for the cultivation of lactic bacteria prior to inoculation of the test medium was de Mann Rogosa Sharp (MRS) agar, which was prepared from a commercially supplied dehydrated medium (Merck). Commercially supplied dehydrated MRS broth (Merck) with beer addition was used to the adaptation of strains to bitter hops products and alcohol. In the preparation of MRS, part of distilled water was replaced with beer at a concentration of 25, 50 and 70 vol. %. Draft beer of one brand and batch was used for the preparation of beer-containing culture media and MRS broth with beer for adaptation phase. The same beer was used for incubation of bacteria (chapter 2.4.).

Media:

- MRS broth (MRS)** was prepared from dehydrated medium as prescribed by the manufacturer (Merck) by dissolving 52.2g of dehydrated MRS broth in 1000 ml of distilled water and sterilizing it for 20 minutes at 121 °C.
- MRS broth (MRS) with addition of beer** was prepared from dehydrated medium as prescribed by the manufacturer (Merck) by dissolving 52.2g of dehydrated MRS broth, 250 (500, 750) ml of draft beer and 750 (500, 250) ml distilled water and sterilizing it for 20 minutes at 121 °C.
- MRS agar (MRS)** was prepared from dehydrated medium according to manufacturer's (Merck) instructions by dissolving 68.2g of dehydrated medium in 1000ml of distilled water and sterilizing it for 20 minutes at 121 °C. Ready medium has a tan color.
- VLB-S7 agar (VLB)** was prepared by warming up commercially supplied agar (VLB Berlin, Döehler) in a water bath. The medium has a dark green color.
- UBA (Universal Beer Agar) agar (UBA)** was prepared from dehydrated medium according to the manufacturer's instructions (Oxoid) by dissolving 62g of dehydrated medium in 750ml of distilled water and 250ml of draft beer. The medium was sterilized for 10 minutes at 121 °C and finished medium has a tan color.
- Raka-Ray agar (R-R)** was prepared from commercially available dehydrated medium according to the manufacturer's instructions (Oxoid) by dissolving 77.1 g of dehydrated medium in 1000ml of distilled water and sterilizing it for 15 minutes at 121 °C. Ready medium is brown.
- NBB (Nachweismedium für Bierschädliche Bakterien) agar (NBB-A)** was prepared from commercially available dehydrated medium (NBB-P) according to the manufacturer's instructions

kého agaru (Oxoid), 250 ml světlého výčepního piva a 750 ml destilované vody. Půda se sterilizuje 20 minut při 121 °C a hotová má žlutohnědou barvu.

- i) **PDM** (*Pediococcus damnosus* medium) **agar (PDM)**: půda byla připravena rozpuštěním a smícháním 40 g dehydratovaného MRS bujónu (Merck), 0,3 g L-cystein-hydrochloridu (Sigma), 250 ml světlého výčepního piva, 15 g bakteriologického agaru (Oxoid) a 750 ml destilované vody. Půda se sterilizuje 20 minut při 121 °C a hotová má světle žlutou barvu.
- j) **BMB** (Barney-Miller Brewery) **agar (BMB)**: byl připraven rozpuštěním a smícháním 15 g dehydratovaného tomatového džusu (Fluka), 15 g maltosy (Merck), 10 g glukosy (Merck), 5 g polypeptonu (Oxoid), 2 g masového výtazku (Bio-Rad), 0,2 g L-cystein-hydrochloridu (Sigma), 3 g octanu draselného (Penta), 0,5 g kyseliny jablečné (Fluka), 0,5 g Tween 80 (Sigma), 15 g bakteriologického agaru (Oxoid), 250 ml piva a 750 ml destilované vody. Půda se sterilizuje 15 minut při 121 °C a hotová má žlutou barvu.
- k) **ABD** (Advanced Beer-spoiler Detection) **agar (ABD)**: byl připraven rozpuštěním a smícháním 2,6 g dehydratovaného MRS bujónu (Merck), 15 g bakteriologického agaru (Oxoid), 0,5 g octanu sodného (Sigma), 1000 ml světlého výčepního piva. Půda se sterilizuje 20 minut při 121 °C a hotová má žlutohnědou barvu.
- l) **MRS agar s katalasou (K-MRS)**: byl připraven MRS agar standardním způsobem (bod c). Před vlastním naočkováním vzorku byl na povrch půdy v Petriho miskách asepticky aplikován 0,1 ml sterilního roztoku katalasy (Sigma) v destilované vodě o takové koncentraci, aby koncentrace enzymu byla 800 U/misku.

2.2 Mikroorganismy a kultivační podmínky

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

2.3 Fáze adaptace bakterií na hořké chmelové kyseliny

Bakterie byly naočkovány do 10 ml MRS bujónu a kultivovány 4 dny při 28 °C. Poté bylo od každého kmene naočkováno 0,1 ml suspenze buněk do 10 ml MRS bujónu, který obsahoval 25 obj. % piva. Inkubace probíhala 4 dny při teplotě 28 °C. Stejným způsobem byly kmeny postupně převáděny do MRS bujónu se stoupajícím obsahem piva (50 a 75 obj. %).

2.4 Inkubace bakterií v pivu

Suspenze bakterií byly připraveny rozmícháním kolonií ve sterilním fyziologickém roztoku na konečnou koncentraci buněk 3x10⁹/ml. U adaptovaných kmenů byl použit sediment buněk pomnožených ve MRS bujónu se 75 obj. % piva. Pomocí desítkového ředění byla naočkována 3 pasterovaná výčepní piva pro každý kmen tak, aby výsledná koncentrace mléčných bakterií v pivu byla 5x10³/ml. Vzorky byly následně deponovány při pokojové teplotě po dobu až 7 týdnů.

2.5 Testování kultivačních půd

V intervalech 3 dny, a 5 a 7 týdnů byla piva naočkována na všech testované půdy. Pro kultivaci na pevných půdách byla použita

(Döhler) by dissolving 120g of dehydrated medium and 15 g bacteriological agar (Oxoid) in 1000ml distilled water and sterilizing it for 10 minutes at 115 °C. Ready medium is red in color.

- h) **B-MRS agar (B-MRS)** was prepared by dissolving and mixing 55g MRS broth (Merck), 15g bacteriological agar (Oxoid), 250ml of draft beer and 750ml of distilled water. The medium was sterilized for 20 minutes at 121 °C and finished medium has a tan color.
- i) **PDM** (*Pediococcus damnosus* medium) **agar (PDM)** medium was prepared by dissolving and mixing 40g MRS broth (Merck), 0,3g L-cysteine hydrochloride (Sigma), 250ml of draft beer, 15g bacteriological agar (Oxoid) and 750ml of distilled water. The medium was sterilized for 20 minutes at 121 °C and finished medium has a pale yellow color.
- j) **BMB** (Barney Miller Brewery) **agar (BMB)** was prepared by dissolving and mixing 15g tomato broth (Fluka), 15g maltose (Merck), 10g glucose (Merck), 5g polypeptone (Oxoid), 2g meat extract (Bio-Rad), 0,2g L-cysteine hydrochloride (Sigma), 3g potassium acetate (Penta), 0,5g malic acid (Fluka), 0,5g Tween 80 (Sigma), 15g bacteriological agar (Oxoid), 250ml of beer and 750ml of distilled water. The medium was sterilized for 15 minutes at 121 °C and finished medium has a yellow color.
- k) **ABD** (Advanced Detection of Beer-spoiler) **agar (ABDa)** was prepared by dissolving and mixing 2.6g MRS broth (Merck), 15g bacteriological agar (Oxoid), 0.5g sodium acetate (Sigma) and 1000ml draft beer. The medium was sterilized for 20 minutes at 121 °C and finished medium has a tan color.
- l) **MRS agar with catalase (K-MRS)** was prepared in a standard manner (see point d)). Prior to inoculation the cultures/sample the surface medium in a Petri dish was aseptically supplied with 0.1ml sterile solution of catalase (Sigma) in distilled water so that the concentration of the enzyme was 800 U/dish.

2.2 Microorganisms and culture conditions

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

2.3 Phases of bacteria adaptation to bitter hops acids

Bacteria were inoculated to 10ml of MRS broth and incubated for 4 days at 28 °C. Subsequently, 0.1ml of cultured culture from each strain was aseptically transferred into 10ml of MRS broth containing 25 vol. % of beer. Incubation was conducted for 4 days at 28 °C. In the same way, strains of bacteria were gradually converted to MRS broth with an increasing concentration of beer (50 and 75 vol. %).

2.4 Incubation of bacteria in beer

Bacterial suspensions were prepared by stirring of colonies in sterile saline, with a final concentration of 3x10⁹ cells/ml. The sediment of cells in MRS broth with 75 vol. % of beer was used for adapted strains. The draft beer for each strain was inoculated by the decimal dilution, with a final concentration of 5x10³ cells/ml of lactic bacteria. Samples were stored at room temperature for 7 weeks.

Tab.1 Seznam kmenů / Table 1 List of strains

Druh / Species	Kmen* / Strain *	Původ / Origin
<i>L. backii</i>	DSM 18080 ^T	Zkažené pivo / spoilt beer
<i>L. brevis</i>	RIBM 2-16	Zkažené pivo / spoilt beer
	RIBM 2-56	Pivo / beer
<i>L. buchneri</i>	RIBM 2-9	Pivovarský provoz / brewery plant
<i>L. lindneri</i>	DSM 20690 ^T	Zkažené pivo / spoilt beer
<i>L. paracollinoides</i>	DSM 15502 ^T	Pivovarské prostředí / brewery environment
<i>L. plantarum</i>	RIBM 2-90	Pivovarské prostředí / brewery environment
<i>P. damnosus</i>	CCM 3453 ^T	Pivovarské kvasnice / brewing yeast
<i>P. inopinatus</i>	CCM 3451 ^T	Pivovarské kvasnice / brewing yeast
<i>P. pentosaceus</i>	CCM 3447	Pivovarské kvasnice / brewing yeast

* CCM – Česká sbírka mikroorganismů / Czech Collection of Microorganisms, Brno, Czech Republic

DSM – Německá sbírka mikroorganismů a buněčných kultur / German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Braunschweig, Germany

RIBM – Sbírký pivovarských mikroorganismů / Collection of The Research Institute of Brewing and Malting, Prague, Czech Republic

membránová filtrace, při níž bylo filtrováno 10 ml piva (standardně filtrovaný objem při provozní kontrole hotového piva). Piva byla před membránovou filtrací promíchána a k filtraci byly použity černé membránové filtry o velikosti pórů 0,45 µm (Whatman). Vzorky byly kultivovány při teplotě 28 °C po dobu 7 dní. Poté byl vyhodnocen nárůst kolonií na jednotlivých půdách.

2.6 Statistické zpracování dat

Vstupní data v podobě počtů kolonií v jednotkách KTJ/10 ml byly podrobeny analýze hlavních komponent (Principal Component Analysis, PCA). Pro účely analýzy byla data uvedena jako nepočítatelný počet kolonií (NP) nahrazena konstantou 300 a data byla standardizována souborem všech kmenů na jednotlivých médiích prostřednictvím z-skóre. Výsledná PCA na prvních dvou hlavních komponentách popisuje 97,69 % z celkové variability dat.

3 VÝSLEDKY A DISKUZE

Pro testování kultivačních médií byly zvoleny dva odlišné přístupy: 1) inkubace bakterií v pivu a jejich naočkování na kultivační média v intervalech 3 dny, 5 týdnů a 7 týdnů, 2) inkubace bakterií v pivu s jejich předchozí postupnou adaptací na pivo, následně s postupem

Tab. 2 Růst neadaptovaných/adaptovaných kmenů po 3 dnech inkubace v pivu (KTJ/10 ml)
Table 2 Growth of non-adapted/adapted strains after 3 days of incubation in beer (CFU/10 ml)

Kmen / Strain	Kultivační médium / Culture media																	
	MRS		VLB		UBA		R-R		NBB		B-MRS		PDM		BMB		K-MRS	
<i>L. backii</i> DSM 18080 ^T	103	100	85	90	30	35	20	10	95	100	93	100	100	90	90	97	108	115
<i>L. brevis</i> RIBM 2-16	38	10	12	25	26	12	8	3	7	25	16	27	22	25	12	7	30	14
<i>L. brevis</i> RIBM 2-56	2	40	1	30	0	27	0	7	1	10	10	34	0	28	5	30	1	20
<i>L. buchneri</i> RIBM 2-9	2	31	6	20	0	5	0	0	1	17	1	34	1	30	1	36	9	23
<i>L. lindneri</i> DSM 20690 ^T	NP	NP	NP	NP	40	NP	15	17	NP	NP	NP	NP	150	NP	NP	NP	NP	NP
<i>L. paracollinoides</i> DSM 15502 ^T	40	45	42	39	4	6	2	5	30	40	50	47	65	63	20	30	60	61
<i>L. plantarum</i> RIBM 2-90	0	0	1	0	0	2	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0
<i>P. damnosus</i> CCM 3453 ^T	45	75	60	28	1	0	0	0	0	0	50	50	40	30	30	60	10	4
<i>P. inopinatus</i> CCM 3451 ^T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0
<i>P. pentosaceus</i> CCM 3447	0	28	1	12	0	0	0	0	0	12	0	27	0	14	0	40	50	4

Tab. 3 Růst neadaptovaných/adaptovaných kmenů po 5 týdnech inkubace v pivu (KTJ/10 ml)
Table 3 Growth of non-adapted/adapted strains after 5 weeks of incubation in beer (CFU/10 ml)

Kmen / Strain	Kultivační médium / Culture media																	
	MRS		VLB		UBA		R-R		NBB		B-MRS		PDM		BMB		K-MRS	
<i>L. backii</i> DSM 18080 ^T	150	160	150	140	40	60	10	15	110	130	120	145	130	140	150	130	130	155
<i>L. brevis</i> RIBM 2-16	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1
<i>L. brevis</i> RIBM 2-56	80	NP	50	NP	30	NP	40	200	45	NP	90	NP	60	NP	65	NP	60	NP
<i>L. buchneri</i> RIBM 2-9	10	40	15	26	0	25	0	0	11	35	8	38	13	40	15	45	9	33
<i>L. lindneri</i> DSM 20690 ^T	NP	NP	NP	NP	NP	NP	30	17	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP
<i>L. paracollinoides</i> DSM 15502 ^T	0	39	0	28	0	0	0	0	0	35	0	40	0	53	0	20	0	50
<i>L. plantarum</i> RIBM 2-90	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>P. damnosus</i> CCM 3453 ^T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>P. inopinatus</i> CCM 3451 ^T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>P. pentosaceus</i> CCM 3447	0	130	0	120	0	80	0	3	0	90	0	120	0	140	0	150	0	150

Tab. 4 Růst neadaptovaných/adaptovaných kmenů po 7 týdnech inkubace v pivu (KTJ/10 ml)
Table 4 Growth of non-adapted/adapted strains after 7 weeks of incubation in beer (CFU/10 ml)

Kmen / Strain	Kultivační médium / Culture media																	
	MRS		VLB		UBA		R-R		NBB		B-MRS		PDM		BMB		KMRS	
<i>L. backii</i> DSM 18080 ^T	0	NP	0	NP	0	40	0	30	0	200	0	NP	1	NP	0	NP	0	NP
<i>L. brevis</i> RIBM 2-16	0	NP	0	NP	0	NP	0	20	0	NP	0	NP	0	NP	0	NP	0	NP
<i>L. brevis</i> RIBM 2-56	0	10	0	9	0	8	0	3	0	5	0	6	0	5	0	13	0	12
<i>L. buchneri</i> RIBM 2-9	0	NP	0	NP	0	200	0	4	0	NP	0	NP	0	NP	0	NP	0	NP
<i>L. lindneri</i> DSM 20690 ^T	NP	NP	NP	NP	NP	NP	10	50	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP
<i>L. paracollinoides</i> DSM 15502 ^T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>L. plantarum</i> RIBM 2-90	0	NP	0	NP	0	NP	0	45	0	NP	0	NP	0	NP	0	NP	0	NP
<i>P. damnosus</i> CCM 3453 ^T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>P. inopinatus</i> CCM 3451 ^T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>P. pentosaceus</i> CCM 3447	0	NP	0	NP	0	NP	0	60	0	NP	0	NP	0	NP	0	NP	0	NP

2.5 Testing of culture media

Beer was inoculated on all tested media at intervals of 3 days, 5 and 7 weeks. Membrane filtration was used for cultivation on solid media and 10 ml of beer was filtered (standard filtration volume for operational control of finished beer). The beer was stirred prior to the membrane filtration and 0.45 µm black membrane filters (Whatman) were used. Samples were incubated at 28 °C for 7 days. The growth of colonies on individual media was evaluated.

2.6 Statistical data processing

Input data included the number of colonies in KTJ/10 ml and were analyzed by the principal component analysis (PCA). For the analysis, data listed as an uncountable number of colonies (NP) were replaced by a constant of 300 and were standardized by a set of all strains on individual media by z-score. The resulting PCA on the first two major components describes 97.69% of total data variability.

3 RESULTS AND DISCUSSION

Two different approaches were used for testing culture media: 1) an incubation of bacteria in beer and their inoculation to culture media at intervals of 3 days, 5 and 7 weeks, and 2) an incubation

jako v případě 1). Tzv. adaptované kmeny byly získány postupným přeočkováváním do tekuté MRS média, které bylo obohaceno pivem v koncentracích 25, 50 a 75 obj. %. Cílem naší studie bylo vyhodnocení kultivačních médií pro detekci bakterií mléčného kvašení v podmínkách provozní pivovarské laboratoře. Na základě výsledků předchozí studie (Kubizniaková a Matoulková, 2016) bylo vybráno 10 kultivačních půd, které jsou snadno dostupné pro běžnou pivovarskou mikrobiologickou laboratoř, a to jak půdy dodávané komerčně (MRS, Raka-Ray, UBA, NBB, VLB-S7), tak půdy, které lze snadno připravit (PDM, BMB, ABD, B-MRS, K-MRS). K testování bylo vybráno 7 kmenů rodu *Lactobacillus* a 3 kmeny rodu *Pediococcus* (tab. 1).

Během postupné kultivace bakterií v MRS bujónu se vzrůstajícím obsahem piva nebyly pozorovány žádné rozdíly v rychlosti růstu. Všechny bakteriální kmeny rostly stejně rychle a ani stoupající koncentrace piva v kultivačním médiu jejich množení nezpomalila. V průběhu fáze adaptace nedošlo k morfologickým změnám u žádného z kmenů.

Výsledky růstu bakterií na kultivačních půdách po naočkování z piva jsou shrnuty v tab. 2–4. Srovnávány byly vždy počty kolonií na různých kultivačních půdách a zohledňován byl, jak počet kolonií kmenů očkovaných přímo do piva (tzv. neadaptované variety kmenů), tak současně i počet kolonií variet, které před inokulací do piva prošly fází adaptace na hořké chmelové kyseliny. Z výsledků byla vyřazena půda ABD, na které nenarostly žádné kolonie. V rámci vybraného souboru kmenů byly pozorovány velké rozdíly ve schopnosti přežít a množit se v pivu. Porovnávány tedy nejsou jednotlivé bakteriální kmeny mezi sebou, ale vždy u každého kmene jeho individuální záchyt na různých kultivačních půdách a komentován je i rozdíl mezi tzv. neadaptovanou a adaptovanou varietou daného kmene.

V tab. 2 jsou uvedeny počty kolonií neadaptovaných a adaptovaných variet kmenů po 3 dnech inkubace v pivu. I přes vysokou koncentraci buněk očkovaných do piva ($5 \times 10^3/\text{ml}$) byl u většiny kmenů po třech dnech inkubace v pivu zachycen pouze zlomek původního počtu životaschopných buněk. Výjimkou byl kmen *L. lindneri* DSM 20690^T, který po 3 dnech (tab. 2) i po 5 a 7 týdnech (tab. 3 a 4) vykazoval na většině půd růst nepočítatelného počtu kolonií. Pro práce zabývající se aspekty rezistence k hořkým chmelovým látkám a schopnosti bakterií kazit pivo je tento kmen vhodným kandidátem. Nicméně cílem této studie je porovnání kultivačních půd mezi sebou z hlediska nejspolehlivějšího záchytu kontaminant piva. Kmen *P. inopinatus* CCM 3451 nerostl na žádné z kultivačních půd ani po 5 a 7 týdnech inkubace (tab. 3 a 4), bez vlivu předchozí adaptace na hořké chmelové látky. Kmen *L. plantarum* RIBM 2-90 po třech dnech inkubace v pivu narostl v jednotkovém množství na čtyřech půdách. Ostatní kmeny byly většinou detekovány v desítkách kolonií na 10 ml piva. Kmen *L. backii* DSM 18080^T nebyl nijak ovlivněn fází adaptace na chmelové kyseliny – jeho záchyt na všech půdách byl srovnatelný v případě obou variet. Půdy UBA a Raka-Ray vykazovaly obecně nejnižší záchyt mléčných bakterií.

Po 5 týdnech inkubace mléčných bakterií v pivu nebyl detekován růst kmene *P. damnosus* CCM 3453^T (tab. 3). Naopak u kmene *P. pentosaceus* CCM 3447 byl u adaptované variety pozorován růst kolonií v řádu desítek/10 ml piva. Ještě výraznější vliv předchozí adaptace na chmelové látky na záchyt bakterií z piva byl pozorován u kmene *L. brevis* RIBM 2-56. U kmene *L. backii* DSM 18080^T nebyl, stejně jako po 3 dnech inkubace v pivu, pozorován rozdíl mezi varietami. Kmen *L. lindneri* DSM 20690^T rostl v nepočítatelných počtech na všech půdách, kromě Raka-Ray, nezávisle na předchozí fází adaptace.

Po 7 týdnech inkubace bakterií v pivu byl opět kmen *L. lindneri* DSM 20690^T zachycen v nepočítatelných počtech nezávisle na předchozí adaptaci, na všech půdách, s výjimkou Raka-Ray (tab. 4). U kmenů *L. backii* DSM 18080^T, *L. brevis* RIBM 2-16, *L. buchneri* RIBM 2-9, *L. plantarum* RIBM 2-90, *P. pentosaceus* CCM 3447 a slabě i u *L. brevis* RIBM 2-56 byl prokazatelný vliv fáze adaptace na chmelové látky na životaschopnost bakterií v pivu a jejich následný záchyt na kultivačních půdách. Jako nejméně vhodná byla vyhodnocena půda Raka-Ray, UBA a NBB.

Statistické vyhodnocení výsledků pomocí Analýzy hlavních komponent (PCA) je dokumentováno na obr. 1. Experimentální body v grafu reprezentují adaptované a neadaptované kmeny po různých dobách inkubace v pivu. Jejich poloha v grafu je dána jejich rozdílnou intenzitou růstu na testovaných médiích. Čím blíže jsou si dva body, tím podobnější v rámci růstu (počtu kolonií) na testovaných médiích si kmeny jsou (a naopak). Úsečky vycházející z počátku grafu popisují jednotlivá testovaná média a jejich směr určuje směr roz-

of bacteria in beer with their prior adaptation to beer, followed by the procedure as in 1). So-called adapted strains were generated by gradual inoculation to liquid MRS medium containing beer at concentrations of 25, 50 and 75 vol. %. The aim of our study was to evaluate culture media for detection of lactic acid bacteria in the conditions of operational brewery laboratory. Based on results of a previous study (Kubizniaková and Matoulková, 2016), 10 easily available culture media for a conventional brewery microbiology laboratory were selected, including both commercially available media (MRS, Raka-Ray, UBA, NBB, VLB-S7), and media easy to prepare (PDM, BMB, ABD, B-MRS, K-MRS). 7 strains of the genus *Lactobacillus* and 3 strains of the genus *Pediococcus* (Table 1) were selected for testing.

No differences were observed in the growth rate of bacteria during gradual cultivation in MRS broth with increasing concentration of beer. All strains of bacteria grew at the same rate and the growth was not slowed down by increasing concentration of beer. Morphological changes were not observed during the adaptation phase.

The results of bacterial growth on culture media after incubation in beer are summarized in tables 2-4. Numbers of colonies on different culture media were compared. A consideration was given to both the number of colonies of strains vaccinated directly into beer (non-adapted strains) and the number of varieties of colonies that were adapted to bitter hop acids prior to inoculation into beer. ABD medium without growing colonies was discarded from the results. There were large differences in the ability to survive and breed in beer by selected strains of bacteria. Different bacterial strains are not compared to each other but the growth of individual strains on different culture media is compared. The difference between non-adapted and adapted variety of individual strain is also commented.

Table 2 shows the number of colonies of non-adapted and adapted varieties of strains after 3 days of incubation in beer. Although high concentration of cells ($5 \times 10^3/\text{ml}$) was inoculated into the beer, only a small number of viable cells were present in most strains after 3 days of incubation. An exception was *L. lindneri* DSM 20690^T that showed an uncountable number of colonies after 3 days (Table 2) and after 5 and 7 weeks (Table 3 and 4) on most culture media. This strain is a suitable candidate for studies dealing with aspects of resistance to bitter hop substances and the ability of bacteria to spoil beer. However, the aim of this study is to compare to cultivation media with each other in terms of the most reliable trapping of beer contaminants. *P. inopinatus* CCM 3451 did not grow on any of culture medium even after 5 and 7 weeks of incubation (Table 3 and 4), without the influence of prior adaptation to bitter hop substances. The counts of *L. plantarum* RIBM 2-90 grew on four media amounted to single colonies. Other strains were mostly detected in tens of colonies per 10 ml of beer. The adaptation phase on bitter hops substances did not affect *L. backii* DSM 18080^T – the number of colonies was comparable for both varieties in all media. Media UBA and Raka-Ray generally showed the lowest number of lactic acid bacteria.

After 5 weeks of incubation of lactic bacteria in beer, the growth of *P. damnosus* CCM 3453^T was not detected (Table 3). On the other hand, the adapted variety of *P. pentosaceus* CCM 3447 showed tens of colonies per 10 ml of beer. An even more significant effect of prior adaptation to bitter hops substances on the capture of bacteria in beer was observed in strain *L. brevis* RIBM 2-56. No difference between varieties was observed in *L. backii* DSM 18080^T even after 3 days incubation in beer. *L. lindneri* DSM 20690^T grew independently of prior adaptation in uncountable numbers on all culture media except Raka-Ray.

After 7 weeks of bacteria incubation in beer, *L. lindneri* DSM 20690^T was again captured in uncountable numbers, independently of prior adaptation on all culture media, except Raka-Ray (Table 4). In strains *L. backii* DSM 18080^T, *L. brevis* RIBM 2-16, *L. buchneri* RIBM 2-9, *L. plantarum* RIBM 2-90, *P. pentosaceus* CCM 3447 and also slightly in *L. brevis* RIBM 2-56, the phase of adaptation to hops substances had a demonstrable effect on the viability of bacteria in beer and their subsequent capture on cultivation media. The least suitable were culture media Raka-Ray, UBA and NBB.

The statistical evaluation of results by the Principal component analysis (PCA) is documented in Fig. 1. Experimental points in the graph represent adapted and non-adapted strains after various incubation periods in beer. Their position in the graph is due to different intensity of growth on tested media. The closer two points

ložení experimentálních bodů (kmenů) dle jejich růstu na jednotlivých médiích. Stejný směr úseček ukazuje na podobnost médií z pohledu jejich schopnosti umožnit růst testovaných kmenů. Zároveň čím větší úhel svírají dvě úsečky, tím méně podobné si média jsou. Oblasti bodů nacházející se mimo definované oblasti A, B a C lze charakterizovat jako průnik sousedících oblastí, např. oblast bodů nacházející se kolem souřadnice [1; -0,5] lze charakterizovat jako oblast se středním růstem na všech půdách s výjimkou Raka-Ray. Experimentální body vyskytující se kolem bodu [0; 0] jsou v rámci daného souboru dat (tzn. experimentu) nejtýpickejší a nevykazují výrazné vlastnosti žádným směrem v grafu (tzn. jedná se o kmeny s průměrným růstem na testovaných půdách). Z výsledků vyplývá, že médium Raka-Ray se výrazně odlišuje od ostatních testovaných médií a poskytuje nejhorší podmínky pro růst kolonií testovaných kmenů (s výjimkou adaptovaného kmene *L. brevis* RIBM 2-56 po 35 dnech (5 týdnů) inkubace v pivu, který se nachází v oblasti A). Ze shluku médií vybočuje i médium UBA, a to ve směru horších podmínek pro růst kolonií s výjimkou adaptovaných kmenů *L. lindneri* DSM 20690^T, *L. plantarum* RIBM 2-90 a *P. pentosaceus* CCM 3447 po 49 dnech (7 týdnů) inkubace v pivu (experimentální body v PCA plotu vyskytující se nad oblastí B). Ostatní média jsou si z pohledu podmínek pro růst kolonií téměř identická a zároveň z provedeného experimentu vycházejí jako nejlepší.

4 ZÁVĚR

Závěry hodnocení růstu bakterií na jednotlivých kultivačních médiích odpovídají výsledkům naší předcházející studie, kde je také diskutováno složení půd a výsledky studií ostatních autorů (Kubizniaková a Matoulková, 2016). Pro testování kultivačních médií určených pro detekci mléčných bakterií přímo z piva je podstatná předchozí fáze adaptace bakterií na podmínky v pivu (tj. postupné převádění kultur do média se stoupající koncentrací piva) – jsou tak simulovány reálné podmínky v provozní pivovarské laboratoři.

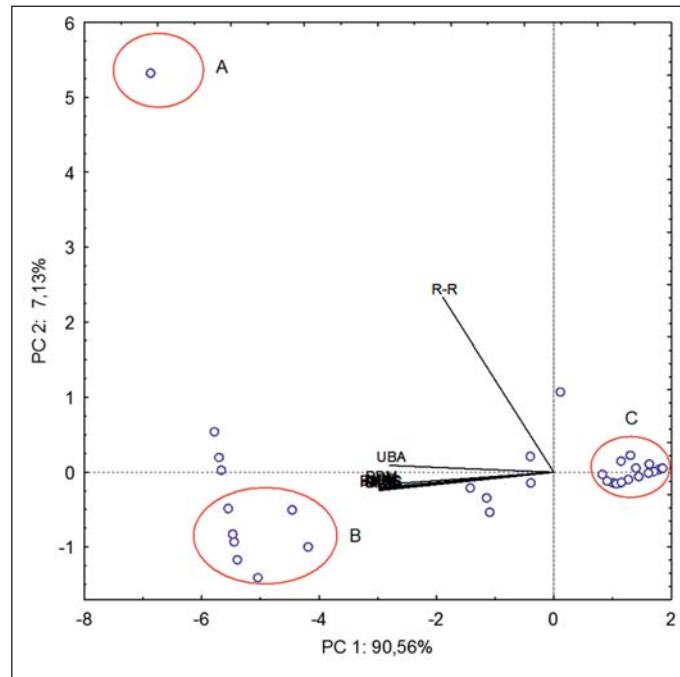
Vliv obsahu piva v některých z médií (B-MRS, PDM, BMB a UBA) na zvýšení detekce mléčných bakterií z piva nebyl prokázán.

Půda MRS a její modifikace (B-MRS, PDM, K-MRS) poskytovaly, spolu s VLB, NBB a BMB nejlepší záchyt mléčných bakterií z piva – na těchto půdách vytvářely bakterie velké a snadno odcitatelné kolonie.

Půdy Raka-Ray a UBA poskytovaly ve všech sledovaných parametrech nejhorší výsledky.

PODĚKOVÁNÍ

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



Obr. 1. Analýza hlavních komponent PCA biplot: oblast A – oblast výrazného růstu na všech testovaných médiích, zejména pak Raka-Ray (zahnuje pouze jeden kmen); oblast B – oblast výrazného růstu na všech médiích s výjimkou Raka-Ray; oblast C – oblast minimálního či žádného růstu na všech médiích / Fig. 1 Principal component analysis (PCA) biplot: area A – area of intensive growth on all media, in particular on Raka-Ray (includes only one strain); area B – area of intensive growth on all media, except Raka-Ray; area C – area of minimal or no growth on any of media

are, the more similar the strains are in growth (number of colonies) on tested media (and vice versa). Lines from the beginning of the graph describe individual tested media and their direction determines the direction of the distribution of experimental points (strains) according to their growth on individual media. The same direction of lines shows a similarity of culture media in terms of their ability to allow the growth of tested strains. And a larger angle between two lines means greater culture media difference. Areas of points located outside of defined areas A, B and C can be characterized as an intersection of adjacent areas; for example, the area of points located around the coordinate [1; -0,5] can be characterized as an area with medium growth on all culture media except Raka-Ray. Experimental points occurring around point [0; 0] are the most typical and do not show significant traits in any direction of the graph (i.e. strains with average growth on tested media) within this dataset (i.e. within the experiment). Results show that Raka-Ray differs significantly from other culture media and provides the worst conditions for the growth of colonies of tested strains (except for adapted *L. brevis* RIBM 2-56 after 35 days (5 weeks) of incubation in beer, in area A). In addition, UBA medium is also positioned away from the media cluster in the worst colony conditions, except for adapted strains *L. lindneri* DSM 20690^T, *L. plantarum* RIBM 2-90 and *P. pentosaceus* CCM 3447 after 46 days (7 weeks) of incubation in beer (experimental points above B area). Other media are almost identical in terms of colony growth conditions and they are the best within the experiment.

4 CONCLUSION

Our conclusions from the evaluation of bacterial growth on individual culture media correspond to the results of our previous study, which also discusses the composition of culture media and results of studies by other authors (Kubizniaková and Matoulková, 2016). For testing culture media for the detection of lactic bacteria directly in beer, the previous phase of bacterial adaptation to beer is essential (i.e. gradual transfer of cultures to media with increasing concentration of beer) since this simulates real conditions in brewery laboratory.

No influence of beer concentration in some culture media (B-MRS, PDM, BMB and UBA) signifying an increased detection of lactic bacteria from beer has been demonstrated.

MRS medium and its modification (B-MRS, PDM, K-MRS) together with VLB, NBB and BMB provided the best capture of lactic bacteria from beer – the bacteria produced large and readily detectable colonies on these media.

Raka-Ray and UBA provided the worst results in all observed parameters.

ACKNOWLEDGMENTS

The results were obtained with the institutional support of the Ministry of Agriculture of the Czech Republic of a long-term conceptual development of RIBM - Quality research and processing of malting and brewing raw materials (RO1916) and were supported by the Ministry of Education, Youth and Sports - Research sensory center in Prague, and Research and development brew house - Sustainability and development (LO1312).

LITERATURA / REFERENCES

- Deng, Y., Liu, J., Li, L., Fang, H., Tu, J., Li, B., Liu, J., Li, H., Xu, Z., 2015: Reduction and restoration of culturability of beer-stressed and low-temperature-stressed *Lactobacillus acetotolerans* strain 2011-8. *Int. J. Food Microbiol.*, 206: 96–101.
- Deng, Y., Liu, J., Li, H., Li, L., Tu, J., Fang, H., Chen, J., Qian, F., 2014: An improved plate culture procedure for the rapid detection of beer-spoilage lactic acid bacteria. *J. Inst. Brew.*, 120: 127–132.
- Kubizniaková, P., Matoulková, D., 2016: Brewing microbiology - lactic acid bacteria and cultivation methods for their detection – Part II. *Kvasny Prum.*, 62: 335–345.
- Liu, J., Deng, Y., Peters, B.M., Li, L., Li, B., Chen, L., Xu, Z., Shirliff, M.E., 2016: Transcriptomic analysis on the formation of the viable putative non-culturable state of beer-spoilage *Lactobacillus acetotolerans*. *Scientific Reports*, 6: 1–11.
- Liu, J., Li, L., Li, B., Peters, B.M., Deng, Y., Xu, Z., Shirliff, M.E., 2017: First study on the formation and resuscitation of viable but nonculturable state and beer spoilage capability of *Lactobacillus lindneri*. *Microbial Pathogenesis*, 107: 219–224.
- Li, L., Li, B., Peters, B.M., Deng, Y., Xu, Z., Shirliff, M.E., 2017: Study on spoilage capability and VBNC state formation and recovery of *Lactobacillus plantarum*. *Microbial Pathogenesis*, 110: 257–261.
- Matoulková, D., Kubizniaková, P., 2015: Brewing microbiology – lactic acid bacteria and cultivation methods for their detection – Part I. *Kvasny Prum.*, 61: 76–88.
- Oliver, J.D., 2005: The viable but nonculturable state in bacteria. *J. Microbiol.*, 43: 93–100.
- Pinto, D., Santos, M.A., Chambel, L., 2015: Thirty years of viable but nonculturable state research: Unsolved molecular mechanisms, *Critical Reviews in Microbiology*, 41: 61.
- Suzuki, K., Funahashi, W., Koyanagi, M., Yamashita, H., 2004: *Lactobacillus paracollinoides* sp. nov., isolated from brewery environments. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 54: 115–117.
- Suzuki, K., Iijima, K., Asano, S., Kuriyama, H., Kitagawa, Y., 2006: Induction of viable but nonculturable state in beer spoilage lactic acid bacteria. *J. Inst. Brew.*, 112: 295–301.

Do redakce došlo / Manuscript received: 01/10/2017
Přijato k publikování / Accepted for publication: 30/10/2017