

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky



**Vliv frekvence pěnování v různých ročních obdobích na
vznik mikrobiálních biofilmů na stáčecí lince pivovaru**

Diplomová práce

Bc. Aneta Poklopová

Kvalita a zpracování zemědělských produktů

Vedoucí práce: prof. Ing. Eva Vlková, Ph.D

Konzultant: Ing. Alena Kosová a Ing. Jan Řezanina

© 2020 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Vliv frekvence pěnování v různých ročních obdobích na vznik mikrobiálních biofilmů na stáček lince pivovaru" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 1.7.2020

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala vedoucí mé bakalářské práce, paní profesorce Ing. Evě Vlkové, Ph.D. za její odborné vedení, trpělivost, ochotu a za rychlé reakce na mé otázky. Dále bych chtěla poděkovat konzultantům Ing. Aleně Kosové a Ing. Janovi Řezaninovi, bez kterých by tato práce nevznikla. Na závěr patří mé poděkování panu Ing. Pavlovi Korčákovi za jeho rady a pomoc v oblasti metrologie.

Vliv frekvence pěnování v různých ročních obdobích na vznik mikrobiálních biofilmů na stáček lince pivovaru

Souhrn

Tato diplomová práce byla realizována *in situ* ve velkoobjemovém pivovarském provozu. Zaměřená byla především na hygienu plnění, která je z hlediska sekundární kontaminace finálního produktu nejrizikovější. Hlavním předmětem práce byla optimalizace pěnování vzhledem k vnějším podmínkám na stáček a k úrovni kontaminace plnicího monobloku se zaměřením na pivo kazící bakterie. Tyto bakterie jsou běžnou součástí biofilmu plniče, který bezprostředně ohrožuje kvalitu výsledného produktu. Úroveň kontaminace byla stanovena kultivačně pomocí NBB-B-am (Döhler) média. Jedná se o tekuté médium určené pro kvalitativní stanovení indikátorových mikroorganismů biofilmu v pivovarech. Vzorky byly získány stěrem z povrchu různých částí výrobního zařízení. Sada 20 vzorků + 1 slepý vzorek byla odebírána z lahvového plnicího zařízení s četností 1x týdně těsně před pěnováním linky. Výsledky ukázaly, že úroveň kontaminace, která je bezpečná ($\leq 20\%$) se vyskytovala v 43 % všech případů. Nad mezním limitem (20–30 %) se vyskytovalo 41 % případů. Pouze 6 případů bylo nad horním mezním limitem a z toho 5 případů bylo v letních měsících. Nejrizikovější částí v průběhu plnění byla zavíračka.

Pomocí doplňkové analýzy RT-PCR lze dobře odhadnout úroveň kontaminace, protože dokáže odhalit i druhy gramnegativních striktně anaerobních pivo kazících bakterií, jako je *Pectinatus* spp. a *Megasphaera* spp., které jsou běžně kultivačně prakticky nestanovitelné. V celkových 16 analyzovaných vzorcích byl rod *Pectinatus* nalezen v 25 % a *Megasphaera* v 6,3 %, což vypovídá o pokročilejší fázi biofilmu a tím i o horší hygieně plnění. V průběhu práce nebyl v pivovaru zaznamenán jediný případ reklamace na zkažené lahvové pivo. Z výše zmíněných výsledků vyplývá, že úroveň hygieny plnění je v pivovaru nastavena dobře. Na čištění a monitoring by měl být kladen důraz především v letních měsících, kdy teplota v hale dosahuje dlouhodobě optimální teploty růstu pivo kazících bakterií. Vztah mezi vnějšími podmínkami (teplota, vlhkost, rosný bod, frekvence pěnování...) a úrovní kontaminace nebyl prokázán, protože na tyto hodnoty mají vliv dynamicky se měnící nepředvídatelné vlivy ve stáček hale. Z těchto hodnot tedy nelze předpovídat vývoj úrovně kontaminace.

Klíčová slova: Pivo kazící bakterie; biofilm; pivovar; pivo; anaerobní bakterie; hygiena provozu; *Lactobacillus*; *Pectinatus*; *Megasphaera*

Effect of foaming at different seasons on microbial biofilm formation on brewery bottling line

Summary

This diploma thesis was realized *in situ* in a large-volume brewery. It focuses mainly on filling hygiene, which is the riskiest in terms of secondary contamination of the final product. The main subject of the research was the optimization of foaming with respect to the external conditions at the bottling plant and the level of contamination of the filling monoblock with a focus on beer spoilage bacteria. These bacteria are a common part of the filler biofilm, which directly threatens the quality of the final product. The level of contamination was determined by culturing with NBB-B-am (Döhler) medium. It is a liquid medium intended for qualitative determination of indicator microorganisms of biofilm in breweries. Samples were obtained by swabbing from the surface of various parts of the production equipment. A set of 20 samples + 1 blank was taken from the bottle filling machine at a frequency of once a week just before foaming the line. The results showed that the level of contamination which is safe ($\leq 20\%$) occurred in 43 % of all cases, the level of contamination above the limit (20-30%) occurred in 41 % of cases. Only 6 cases were above the upper limit, of which 5 cases were in the summer months. The riskiest part during filling was the closing machine. Additional levels of contamination can be well estimated using RT-PCR analysis because it can also detect species of gram-negative strictly anaerobic beer spoilage bacteria such as *Pectinatus* spp. and *Megasphaera* spp., which are practically undeterminable by culture. In the total of 16 analyzed samples, the genus *Pectinatus* was found in 25 % and *Megasphaera* in 6.3 %, which indicates a more advanced phase of the biofilm and thus poorer hygiene of the filling. During the research, not a single case of a complaint about spoiled bottled beer was recorded in the brewery. The above-mentioned results show that the level of filling hygiene is well set in the brewery. Emphasis should be placed on cleaning and monitoring, especially in the summer months when the temperature in the hall has reached the optimum growth temperature of beer spoilage bacteria. The relationship between external conditions (temperature, humidity, dew point, foaming frequency...) and the level of contamination has not been demonstrated, as these values are affected by dynamically changing unpredictable effects in the bottling hall. Therefore, the development of the level of contamination cannot be predicted from these values.

Keywords: Beer spoilage bacteria; biofilm; brewery; beer; anaerobic bacteria; hygiene; *Lactobacillus*; *Pectinatus*; *Megasphaera*

Obsah

1	Úvod.....	9
2	Vědecká hypotéza a cíle práce	10
3	Literární rešerše.....	11
3.1	Výroba piva.....	11
3.2	Příjem sladu a výroba mladiny	11
3.3	Kvašení.....	12
3.3.1	Pivovarské kvasinky	13
3.3.2	Kvašení, filtrace a stabilizace	14
3.4	Stáčecí linka	16
3.4.1	Plnění piva do lahví	16
3.4.2	Rizika mikrobiální kontaminace	16
3.5	Vybrané pivo kazící bakterie	17
3.5.1	Grampozitivní pivo kazící bakterie.....	18
3.5.2	Gramnegativní pivo kazící bakterie	20
3.5.3	Biofilm	23
3.5.4	Detekce pivo kazících bakterií.....	24
3.6	Sanitace	28
3.6.1	Pěnování.....	29
3.6.2	Bakteriální rezistence a perzistence	30
4	Metodika.....	32
4.1	Charakteristika potravinářského provozu	32
4.2	Lahvová plnicí linka K60.....	32
4.2.1	Místa odběru vzorků	33
4.3	Detekce bakteriálního biofilmu pomocí NBB-B-am média.....	33
4.3.1	Pomůcky a materiál	35
4.3.2	Laboratorní příprava	35
4.3.3	Odběr vzorků	36
4.3.4	Zpracování vzorků	37
4.3.5	Vyhodnocení	37
4.4	RT-PCR na analyzátoru GeneDisc	38
4.4.1	Chemikálie	39
4.4.2	Přístroje a pomůcky	39
4.4.3	Příprava vzorků.....	40
4.4.4	Analýza	41
4.5	Záznam dat a vyhodnocení.....	42
5	Výsledky.....	43

6	Diskuze.....	49
7	Závěr.....	55
8	Literatura.....	56
9	Samostatné přílohy.....	I
9.1	Příloha 1 – Vzorkovací místa.....	I

1 Úvod

Pivo je velice oblíbeným a rozmanitým alkoholickým nápojem po celém světě. V naší zemi se výroba a konzumace piva dokonce staly součástí kultury. Tradiční výrobu a oblíbenost této potravinářské komodity v České republice podtrhují i statistická data, která uvádí, že Česká republika je na prvním místě v konzumaci piva na osobu za rok již řadu let po sobě. Za rok 2017 se v České republice vypilo neuvěřitelných 138 l piva na osobu. Druhé místo v Evropě patřilo Rakousku se 105 l a třetí bylo Německo s 101 l (The Brewers of Europe 2018).

Z pohledu mikrobiologa se jedná o médium s mikrobiologickou stabilitou. Existuje nespočet pivních stylů a vyráběných druhů, ale vždy se bude jednat o nápoj, který je typický svým složením. Je to perlivá kapalina s vysokým obsahem oxidu uhličitého, má nízké pH, obsahuje typické hořké kyseliny a je chudá na využitelné nutrienty. Tyto faktory jsou pro většinu patogenních mikroorganismů limitní, ale existují mikroorganismy, které dokážou v pivu přežít, množit se a kazit ho. Nejsou však život ohrožující. Jedná se převážně o bakterie s anaerobním metabolismem, jež jsou tolerantní vůči hořkým kyselinám, nízkému pH a alkoholu (Garcia-Garcia et al. 2017). Mikrobiálně zkažené pivo z hlediska bezpečnosti potravin nepředstavuje pro konzumenta životu nebezpečné riziko. Pro daného velkovýrobce zkažené pivo rizikem je. Stížnosti od zákazníka, reklamace, poškození značky a důvěry ve výrobce poškozují celý potravinářský provoz a představuje tak určitý ekonomický problém. Z těchto, a ještě z mnoha dalších důvodů např. legislativních je kladen velký důraz na hygienu provozu. Klíčovou roli v dodržování hygienických podmínek vhodných pro potravinářský provoz hraje monitoring a kontrola hygieny provozu.

V práci se zabývám kontrolou hygieny plnicí linky a snažím se najít vztah mezi parametry, které ovlivňují výskyt mikroorganismů kazících pivo, a tím umožnit a urychlit kontrolu hygieny lahvové linky pivovaru.

2 Vědecká hypotéza a cíle práce

Vznik mikrobiálních biofilmů na stáčecí lince pivovaru je závislý, mimo jiné, na ročním období z důvodu změny vnějších podmínek, jako je frekvence pěnování, teplota a vlhkost v hale. Monitoring jeho výskytu ve vztahu k naměřeným hodnotám ve stáčecí hale během roku umožní optimalizaci režimu pěnování.

Cílem práce bylo optimalizovat režim pěnování na stáčecí lince pivovaru tak, aby byla zachována bezpečná provozní hygiena linky, ale zároveň, aby nedocházelo k zbytečnému plýtvání chemikáliemi, vodou, energiemi a lidskou pracovní silou.

3 Literární rešerše

Pivo je perlivý alkoholický nápoj, který je řazen mezi nejstarší kvašené nápoje cíleně vyrobené lidmi. Historické údaje uvádí, že pochází již z doby 7 000 př.n.l. Celosvětově je velmi oblíbeným nápojem a v České republice navíc zaujímá určitou část historie a kultury země (Basařová et al. 2010).

Hornsey (2003) dodává, že první psaný záznam obsahující konzumaci piva pochází z roku 2800 př.n.l., avšak dle jeho interpretace některé prameny naznačují, že pivo se zrodilo již 9000 př.n.l. v období neolitické revoluce. Historická obliba a modernizace pivovarnictví rychle rostla i díky českým osobnostem. Především František Ondřej Poupě (1753–1805), nazýván též velmistr českého pivovarnictví, se snažil zlepšovat kvalitu piva různými metodami z oboru chemie a fyziky. Byl prvním sládkem, který začal používat teploměr v různých fázích výroby. Použil také tzv. pivní váhu neboli hustoměr (Frantík & Soukupová 2004). Historicky významným byl i vědec profesor Karel Josef Napoleon Balling, který se zasloužil o používání sacharometru a o vznik attenuačních zákonů kvašení (výpočet prokvašení a vzorec pro výpočet extraktu původní mladiny z obsahu alkoholu a extraktu v pivě) (Frantík & Soukupová 2004; Stewart et al. 2017).

3.1 Výroba piva

Pojem pivo je definován českou vyhláškou č.248 z roku 2018 o požadavcích na nápoje, kvasný ocet a droždí jako nápoj, který byl vyroben zkvašením mladiny připravené ze sladu, vody a chmele (Ministerstvo zemědělství 2018). Výroba ječného sladu je proces, jež by bylo možné rozepsat na několik samostatných kapitol. Nicméně pro účely této diplomové práce by měla stačit informace, že slad je strukturně pozměněného ječné zrna, ve kterém proběhly enzymatické reakce potřebné pro zpřístupnění extraktivních látek v průběhu sladování při máčení, klíčení, sušení a následné úpravy zrna (Stewart et al. 2017).

3.2 Příjem sladu a výroba mladiny

Proces výroby piva začíná v pivovaru příjmem sladu. Jeho kvalita a jakost je přezkoumána v provozní laboratoři dle stanovených interních parametrů a následně je slad uskladněn v silech. Požadované množství sladu je rozemleto (rozluštěno) ve šrotovníku. Před samotným šrotováním je slad veden přes síta, třasadla, aspirátory, odkaménkovávač a magnetický separátor pro zajištění požadované čistoty vstupní suroviny. Následně je sladový

šrot (sypání) smíchán ve vystírací kádi s definovaným množstvím varní vody (nálev), která má nejčastěji mezi 35–38 °C (teplé vystírání – kyselinotvorná teplota). Část látek již přechází do extraktu, ale část stále zůstává nerozpuštěna. Z tohoto důvodu se přidává 80 °C horká voda (zapárka), aby celková teplota vystírky vzrostla na 50–52 °C. Dalším krokem je rmutování dekokčním způsobem, kdy je 1/3 vystírky přečerpána do rmutovacího kotle. Zde se rychlostí 1 °C min⁻¹ min vyhřeje na 62–65 °C (nižší cukrotvorná teplota) a následně se vyhřeje až na 72–74 °C (vyšší cukrotvorná teplota) a pak se povaří. Povařená třetina rmutu se vrací ke zbytku vystírky do vystírací kádě, kde se po vyrovnání teplot hodnota ustálí na 62–65 °C. Znovu se z vystírky odčerpá určité množství do rmutovací pánve, kde se vyhřeje na 72–74 °C (vyšší cukrotvorná teplota). Povaří se a vrátí zpět do vystírky, kde po vyrovnání teplot zůstane 75–78 °C (odrmutovací teplota). Existuje několik druhů a různých variant vystírání a rmutování, záleží vždy na odrůdě, kvalitě, poměru jednotlivých sladů a na požadovaném druhu výsledného produktu (Čejka et al. 2000; Basařová et al. 2010; Kunze 2014).

Dílo je převedeno do scezovací kádě, kde probíhá separace mláta a sladiny. Kád' je konstruovaná tak, aby se na spodní perforované části usadily pluchy a zbytky šrotu (mláto), jež slouží jako filtrační vrstva. Po separaci je mláto šnekovým dopravníkem odváděno jako odpadní produkt, který je využíván v zemědělství jako vysoce ceněné krmivo (Boulton 2013).

Filtrát neboli sladina je převedena do mladinové kádě a fáze výroby chmelovaru. V průběhu varu sladiny s chmelem probíhá řada důležitých fyzikálních, biochemických a chemických reakcí, jako např. odpar vody, inaktivace enzymů, koagulace dusíkatých látek, Maillardovy reakce, extrakce hořkých chmelových látek, a také dochází k usmrcení všech mikroorganismů včetně jejich spor. Dávkování chmele a chmelových výrobků je uzpůsobeno požadovanému druhu a charakteru piva. Horká sladina obohacená o chmelové látky se nazývá mladina. Poslední výrobní fázi probíhající na varně je separace kalů a chlazení mladiny na zákvasnou teplotu (Malowicki & Shellhammer 2005).

3.3 Kvašení

V nadcházející fázi je zchlazená mladina živným médiem pro původce kvašení, tedy pivovarské kvasinky. Cílem kvašení je soustavná metabolizace zkvasitelných složek mladiny na ethanol a oxid uhličitý (Stewart 2015).

3.3.1 Pivovarské kvasinky

Poprvé byly pivovarské kvasinky pojmenovány jako *Zuckerpils* neboli cukerná houba Theodorem Schwannem roku 1837. O rok později byly označeny německým vědcem J.F.Meyenem latinským ekvivalentem jako *Saccharomyces cerevisiae* (Barnett 2004).

Zakladatelem propagace čistých pivovarských kultur je Emil Christian Hansen, který poprvé izoloval dva kmény spodně kvasících kvasinek používaných v pivovaru Carlsberg, dříve označovaných jako *Saccharomyces carlsbergensis* (Priest & Campbell 1996), dnes nazývaných *Sacharomyces pastorianus*. Kvašení je podle typu sedimentace kvasinek děleno na spodní a svrchní kvašení, které zobrazuje **Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.** Původci spodního kvašení jsou pivovarské kvasinky *S. pastorianus* a svrchního kvašení *S. cerevisiae* (Matoulková & Šavel 2007).



Obrázek 1 Porovnání svrchního a spodního kvašení

(<http://www.pivecka.eu/user/documents/upload/pivovar-pivecka-Svrchn%C3%AD-kva%C5%A1en%C3%AD.jpg>)

Druh *S. pastorianus* je přirozeným hybridem mezi druhy *S. cerevisiae* and *S. eubayanus* (Hebly et al. 2015). Hlavní rozdíly mezi kvasinkami svrchního kvašení a spodního kvašení jsou uvedeny v Tabulka 1 (Stewart 2015).

Tabulka 1 Rozdíly mezi kvasinkami svrchního a spodního kvašení (Stewart 2015)

	Svrchní kvašení	Spodní kvašení
Původci:	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. pastorianus</i>
Optimální teplota kvašení:	18–22 °C	8–15 °C
Maximální teplota růstu:	37–39 °C	34 °C
Utilizace melibiosy:	Ne	Ano
Typ piva:	Ale	Ležák

3.3.2 Kvašení, filtrace a stabilizace

Pro vzdušněná sterilní mladina zchlazená na zákvasnou teplotu je nejčastěji ve velkých pivovarech inokulována spodně prokvašejícím kmenem kvasinek v cylindrokónických tancích (CKT), kde následně probíhá hlavní kvašení. Jedná se především o využití sacharidů za anaerobních podmínek (Landaud et al. 2001). Hlavními kvasnými metabolity jsou ethanol a oxid uhličitý. Přeměna probíhá dle rovnice:



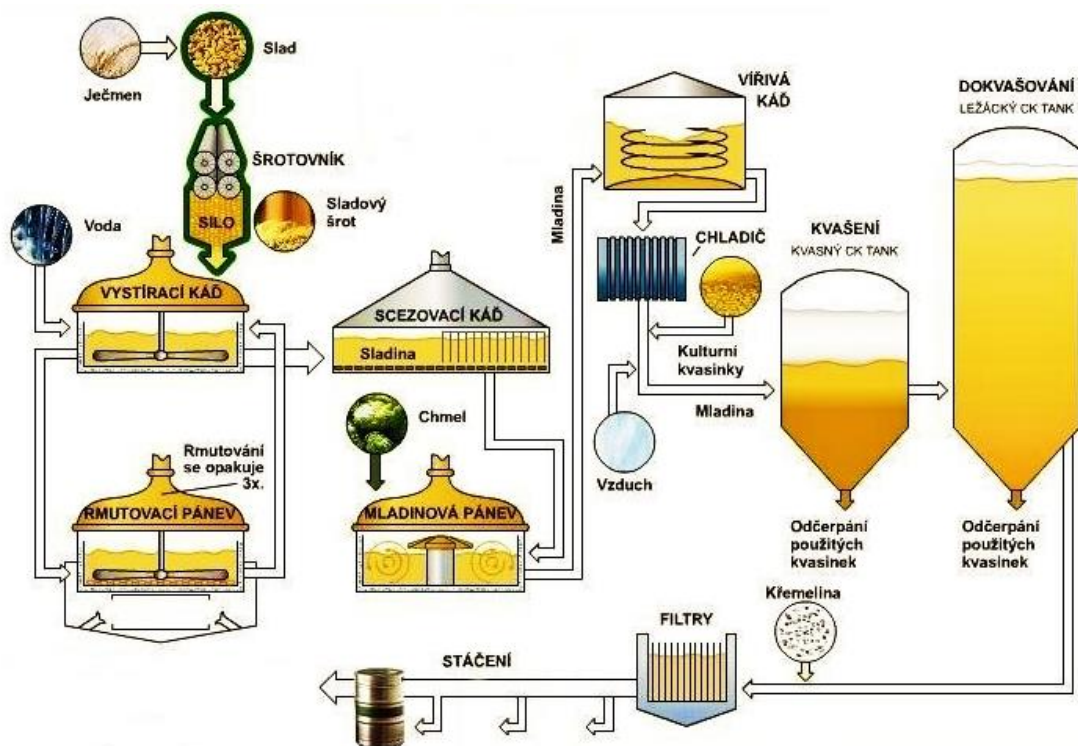
(Kunze 2014).

K závěru hlavního kvašení většina kvasinek flokuluje a sedimentuje na dno CKT tanků, kde se následně tzv. odstřelují (separují). Dokvašování a ležení piva probíhá za specificky řízených podmínek daného druhu piva a použitých kvasinek v ležáckých CKT tancích. Automatizovaná technologie přesně koriguje např. teplotu, tlak, čas, provzdušnění a sleduje průběh zrání (Stewart 2017).

Dle požadované čirosti výsledného produktu je nutné pivo po dokvašení filtrovat přes různé druhy pórovitých přepážek (Braun et al. 2011). Cílem je odfiltrovat většinu koloidů a zbytky kvasinek (Rieger et al. 2005). Po filtraci se kulturní kvasinky použité v průběhu výroby považují za nežádoucí a jsou klasifikovány jako kontaminace (Pinguli et al. 2018).

U piva, která se záměrně nefiltrují a je zde požadavek na určitý obsah kvasnic, musí být výrobek označen v názvu slovem „nefiltrované“. Pokud výrobek toto označení nemá, vyplývá z toho skutečnost, že pivo filtrované bylo (Ministerstvo zemědělství 2018). Zfiltrované a v některých případech i stabilizované hotové pivo je přečerpáno do přetlačných tanků (PT) a je připraveno ke stočení. Pivo lze stáčet do skleněných lahví, plechovek, PET-lahví, KEG sudů nebo cisteren (Kratochvíle 2000).

Posledním technologickým krokem před samotným plněním piva do obalů je mikrobiologická stabilizace piva. Tradičně je využívána tepelná inaktivace mikroorganismů pomocí průtokové nebo tunelové pasterace (Buzrul 2007). Modernější technologie, která je stále na vzestupu, je mikrofiltrace se zkříženým tokem. Jedná se o mechanické odstranění mikroorganismů přes membránu, u kterého nedochází k tepelnému namáhání piva a tím ani ke změně jeho organoleptických vlastností (Varga et al. 2019). Přehled jednoduchého technologického postupu je znázorněn na **Chyba! Nenalezen zdroj odkazů..**



Obrázek 2 Technologie výroby nepasterovaného piva dekokčním třímrtovým způsobem (<https://media0.wgz.cz/images/media0:5100a82346442.jpg/v-roba%20piva.jpg>)

3.4 Stáček linka

Plnění piva do spotřebitelských obalů probíhá ve stáček hale. Dle druhu použitých obalů se zde nacházejí vysoce automatizované a specifické stroje pro daný druh spotřebitelského obalu (Kunze 2014).

3.4.1 Plnění piva do lahví

Nejpoužívanějším a historicky nejstarším spotřebitelským obalem je skleněná láhev. V evropských zemích je nejčastěji používaná tzv. vratná láhev, která je zálohovaná a následně od spotřebitele znovu odebírána. Preference zemí jsou však různé a např. v USA stále převládá láhev nevratná, pravděpodobně je tento jev způsoben historickým vývojem konzumace piva v dané zemi (Briggs et al. 2004).

Lahvárenskou linku je možné rozdělit na suchou a mokrou část. V suché části probíhá depaletizace a vykládka vratných či nových lahví. V mokré části dále probíhají operace jako mytí přepravků a lahví, kontrola, pasterace, plnění, uzavírání a etiketování (Čejka et al. 2000). Umyté a zkontrolované lahve najíždějí do automatizovaného rotačního monobloku plniče, který ve většině případů bývá vybaven i uzavíracím strojem (Basařová et al. 2010; Kunze 2014). Především proto, že organoleptické vlastnosti piva jsou závislé na obsahu rozpuštěného kyslíku, musí proces plnění a uzavírání proběhnout v rychlém sledu. Plnění lahví probíhá za přetlaku, kdy je do lahve tlakován oxid uhličitý, směsný plyn dusíku a oxidu uhličitého nebo směs vzduchu a oxidu uhličitého (Suchý & Chládek 2013).

Následně je láhev naplněna požadovaným objemem piva a uvolněna z plnicího ventilu. Před uzavřením je zbytkový kyslík v hrdle lahve vytlačován buď samovolně směsí plynů, nebo vstříkem vodního paprsku do hrdla. Dojde k tzv. vypěňování, kdy pěna stoupá hrdlem až k okraji a v momentě dosažení okraje hrdla dojde k přetečení a okamžitému uzavření lahve korunkou. Ztráta piva vypěněním by neměla přesáhnout 0,1 ml na lahev (Basařová et al. 2010).

3.4.2 Rizika mikrobiální kontaminace

Řízení rizik mikrobiální kontaminace je nezbytným předpokladem pro všechny provozovatele potravinářského podniku, kteří chtějí vyrábět kvalitní a zdravotně nezávadné potraviny. Navíc, pokud by došlo k rozsáhlé kontaminaci a tím ke snížení kvality výrobku v důsledku mikrobiálního kažení, mohl by tento stav mohl vést při velkoobjemové výrobě k podstatným ekonomickým ztrátám (Storgårds et al. 2006b).

Z tohoto důvodu je důležité monitorovat a kontrolovat možnou primární i sekundární kontaminaci. Primární kontaminace pochází z použitých surovin, výrobních zařízení, CKT tanků či z kontaminované propagace kvasnic (Vaughan et al. 2005).

Primární kontaminaci lze snížit či zcela potlačit v průběhu výroby. Mění se pH, využitelné živiny, střídají se teploty a ke konci výroby je běžným standardem použití mikrofiltrace či pasterace. Tato opatření musí být optimálně seřízena a nastavena tak, aby došlo k usmrcení všech nežádoucích mikroorganismů (Storgårds 2000). Mnohem rizikovější je sekundární kontaminace probíhající na stáček hale, která způsobuje až 50 % případů mikrobiologicky znehodnoceného piva (Back 1997).

Mikroorganismy jsou do stáček haly zanášeny především prostřednictvím špinavých vratných lahví. Pohyb vzduchu pak zajišťuje jejich další šíření. Zdrojem mohou být i dopravníkové pásy či části strojů, které jsou špatně přístupné, a nedochází tedy k jejich dokonalému čištění. Rizikovým faktorem zvyšujícím pravděpodobnost kontaminace je neustálá aerosolace piva a vody v okolí plniče. Dále pak i přetečené pivo při vypěňování lahví v průběhu plnění a zavírání, které zajišťuje dostatek živin v těsné blízkosti plnicích ventilů. Perzistence mikroorganismů ve stáček hale je navíc podpořena zvýšenou teplotou (myčka, pastér a letní období), zároveň příznivě působí i vysoká vlhkost prostředí (Haikara & Helander 2006; Matoulková & Kubizniaková 2014).

Z uvedených důvodů vyplývá, že nejvyšší možnou ochranou je tunelová pasterace. Vyšší riziko představuje průtoková pasterace a mikrofiltrace především kvůli sekundární kontaminaci. Na druhou stranu, čím nižší je tepelná námaha, tím víc si pivo ponechává své kladné a charakteristické organoleptické vlastnosti. Z toho důvodu je nutné zvážit všechny kombinace pro daný produkt a najít vhodné řešení pro daný typ výrobku. Např. náchylnější na mikrobiální kažení bude pivo nealkoholické, z toho důvodu se jeví jako optimální použití tunelové pasterace (Storgårds 2000).

Další faktor, který podporuje výskyt mikroorganismů kazící pivo je zdokonalování plnicích technologií, které zajišťují minimální hodnoty obsahu rozpuštěného kyslíku, což vytváří naprosto dokonalé anaerobní prostředí (Sakamoto & Konings 2003).

3.5 Vybrané pivo kazící bakterie

Pivo je svým složením pro mnoho mikroorganismů nehostinným prostředím, protože obsahuje řadu inhibitorů jako jsou: ethanol (0,5-10 %), chmelové α a β -hořké kyseliny, vysoký obsah CO_2 , nízké pH (3,8 – 4,7), nízký obsah rozpuštěného kyslíku (<0,1 ppm) a pouze

omezené množství živin. Proto většina mikroorganismů i z řad patogenů v pivu nepřežívá (Sakamoto & Konings 2003; Devolli et al. 2016).

Snížený překážkový efekt, především u nepasterizovaného a nízkoalkoholického piva, významně ovlivňuje pravděpodobnost mikrobiálního zkažení (Briggs et al. 2004). Mnoho autorů uvádí, že nežádoucí mikroorganismy v pivě lze rozdělit podle vzoru Backa (1994) do skupin podle škodlivosti, jak je znázorňuje Tabulka 2. Obligátně škodlivé mikroorganismy se v pivu pomnožují, tvoří nechtěné chuťové změny tzv. off-flavours, sedlinu, zákal, zápach, tvoří se diacetyl apod. Potenciálně škodlivé mikroorganismy se v pivu pomnožují pouze za určitých podmínek, které jsou způsobeny poškozením piva např. pH nad 4,7 nebo při vyšším obsahu rozpuštěného kyslíku. Nepřímě škodlivé negativně ovlivňují výrobu meziproductů, ale v hotovém pivu se nepomnožují. Indikátorové mikroorganismy v pivu přežívají, ale nejsou škodlivé, pokud se nejedná o masivní kontaminaci, a indikují nedostatečnou čistotu výroby. Latentní mikroorganismy se v pivu vyskytují vzácně. Nepomnožují se v něm, ale jejich metabolity např. mykotoxiny mohou být pro konzumenta škodlivé. Jedná se především o plísně *Aspergillus* a *Penicillium* vyskytující se na ječmeni a sladu (Back 1994; Back 2005; Basařová et al. 2010; Kunze 2014).

Tabulka 2 Rozdělení nežádoucích mikroorganismů podle škodlivosti (Back 1994), upraveno

Mikroorganismy	Rod, druh
I. Obligátně škodlivé	<i>Lactobacillus</i> , <i>Pediococcus</i> , <i>Pectinatus</i> , <i>Megasphaera</i> , <i>Saccharomyces</i>
II. Potenciálně škodlivé	<i>Lactobacillus</i> , <i>Micrococcus</i> , <i>Zymomonas</i> , divoké kvasinky
III. Nepřímě škodlivé	<i>Enterobacter</i> , <i>Obesumbacterium</i> , <i>Candida</i> , <i>Pichia</i>
IV. Indikátorové	<i>Acetobacter</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Enterobacteriaceae</i>
V. Latentní	<i>Bacillus</i> , <i>Clostridium</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Micrococcus</i> , <i>Aspergillus</i> , <i>Penicillium</i>

3.5.1 Grampozitivní pivo kazící bakterie

Mezi grampozitivní pivo kazící bakterie patří především rody *Lactobacillus* a *Pediococcus*. Jsou zodpovědné za zhruba 70–80 % všech mikrobiálních vad piv v Evropě v letech 1980–2002 (Paradh et al. 2011). V Německu mezi lety 1980–1990 byly tyto bakterie zodpovědné za 58–88 % zkažených piv (Sakamoto & Konings 2003).

3.5.1.1 *Lactobacillus* spp.

Bakterie rodu *Lactobacillus* jsou fakultativně anaerobní s charakteristicky dlouhými, štíhlými, někdy zahnutými buňkami, které často tvoří dlouhé řetízky. Jsou to grampozitivní, nesporulující, mléčné bakterie, které se vyznačují fermentací sacharidů na kyselinu mléčnou. Metabolismus může být homofermentativní i heterofermentativní. Pivo kazící druhy jsou převážně heterofermentativní. Tento typ metabolismu je specifický fermentací sacharidů na alespoň 50 % mléčné kyseliny. Dalšími metabolity jsou např. oxid uhličitý, ethanol a acetát. Indol a sirovodík nevytváří, jsou kataláza a cytochrom negativní, některé druhy dokážou rozkládat peroxid (Boone et al. 2009).

Optimální teplota růstu se pohybuje od 30–40 °C. V některých případech dokáží růst i při 2–53 °C. Pro většinu druhů bývá optimální pH mezi 5,5–6,2, některé druhy mohou růst i pod pH 5. Běžně se vyskytují v mléčných, masných a rybích výrobcích. Dále v pivě, víně, silážích, ovocných a zeleninových džusech. Jsou součástí běžné flóry v ústech, dokonce se nacházejí i v zažívacím a střevním traktu (Boone et al. 2009).

Celý rod obsahuje kmeny pivo kazící i nekazící (Matoulková & Kubizniaková 2014). Kontaminace rodem *Lactobacillus* spp. je v pivu charakteristická zvýšeným zákalem a nepříjemnou chutí s vysokým obsahem diacetylu. Nejčastěji se v pivu vyskytuje *L. brevis*, který je obligátně heterofermentativní (Sakamoto & Konings 2003), což znamená, že zkvašuje jednoduché sacharidy (převážně hexosy) a produkuje nejen mléčnou kyselinu, ale i octovou kyselinu, ethanol a oxid uhličitý (Byung Hong & Gadd 2008).

Fakt, že je *L. brevis* nejčastějším kontaminantem, potvrzuje i rozsáhlá studie provedena výzkumným centrem v Mnichově, který pomocí real-time PCR analyzoval celkem 13 802 vzorků mezi lety 2010–2018. *L. brevis* se v pozitivních vzorkách vyskytoval v 41–53 %. Dalšími druhy jsou *L. lindneri*, *L. backii*, *L. para-collinoides*, *L. group* (*L. (para-)plantarum*, *L. coryniformis*) (Suzuki et al. 2006; Schneiderbanger et al. 2018).

3.5.1.2 *Pediococcus* spp.

Z rodu *Pediococcus* je známo celkem devět druhů. Konkrétně se jedná o *P. acidilactici*, *P. claussenii*, *P. cellicola*, *P. damnosus*, *P. dextrinicus*, *P. inopinatus*, *P. parvulus*, *P. pentosaceus* a *P. stilesii* (Boone et al. 2009). Buňky tohoto rodu jsou nepohyblivé koky sférického a výjimečně i vejčitého tvaru. Vyskytující se v párech a tetradách. Uspořádání buněk je pro pediokoky charakteristickým znakem ve srovnání s ostatními pivo kazícími bakteriemi

(Priest 2013). Velikost buněk se pohybuje mezi 0,5–1 μm . Jsou grampozitivní, kataláza a oxidáza negativní. Nikdy netvoří řetězky a oproti ostatním kokálním bakteriím mléčného kvašení se vyznačují velice pravidelným a souměrným tvarem buněk (Boone et al. 2009).

Pediocooccus spp. se též jako *Lactobacillus* spp. řadí mezi fakultativně anaerobní či mikroaerofilní bakterie mléčného kvašení (Geissler et al. 2016). Mají homofermentativní typ metabolismu. Utilizují jednoduché sacharidy a pomocí glykolýzy je redukují přes pyruvát až na mléčnou kyselinu (Briggs et al. 2004). Rostou při pH 5 a inhibičně na ně působí pH 9 a vyšší. Neprodukují oxid uhličitý a optimální teplota růstu je mezi 25–35 °C, záleží však na konkrétním druhu. Běžně se vyskytují na rostlinách a ovoci. Spolu s dalšími bakteriemi mléčného kvašení se podílejí na konzervaci siláže, kukuřice, nakládaných okurek, oliv a jako nestarterové kultury se podílejí na zrání některých sýrů (Boone et al. 2009).

Typickým pivo kazícím druhem je *P. damnosus* (Paradh et al. 2011). V pivu vytváří sediment i zákal a produkuje diacetyl, který v pivě způsobuje nežádoucí máslové aroma. Pro optimální růst na kultivačním médiu se doporučuje inkubace při 22 °C minimálně 2–3 dny anaerobně nebo aerobně za současného přidavku cysteinu při pH 5,5 (Boone et al. 2009).

Dalšími druhy kazícími pivo jsou např. např. *P. inopinatus* a *P. claussenii*. (Ziola et al. 2000; Dobson et al. 2002; Suzuki et al. 2006). Tyto druhy tvoří taktéž mírný zákal a výrazný sediment. V pokročilém stádiu kažení tvoří slizovité struktury. V pivovarech jsou nalézány především jako součást primární kontaminace na kulturních kvasinkách v propagaci kvasnic, kde svou přítomností konkurují kulturním kvasinkám při utilizaci živin a zhoršují tak prokvášení mladiny (Eßlinger 2009).

3.5.2 Gramnegativní pivo kazící bakterie

Mezi gramnegativní pivo kazící bakterie se řadí především rody *Pectinatus* spp. a *Meegasphaera* spp. Jedná se o striktně anaerobní bakterie, které kontaminují pivo skrze sekundární kontaminaci. Díky anaerobnímu metabolismu jsou v pivovarech velice obtížně detekovatelné a na běžných anaerobních médiích většinou nerostou, protože při běžné deskové kultivaci se vzorek piva či meziprojektu přefiltruje a následně kultivuje na selektivních půdách. Striktní anaerobové přítomnost kyslíku během filtrace nepřežívají. Z tohoto důvodu nejsou tyto bakterie nalézány tak často jako např. laktobacily a pediokoky (Janagama et al. 2018; Zheng et al. 2018). V pivovarech přežívají především ve formě biofilmů na strojích ve stáček hale (Řezanka et al. 2015).

3.5.2.1 *Pectinatus* spp.

Jedná se o striktně anaerobní, kataláza negativní bakterie. Jsou to nesporulující a mírně zahnuté tyčinky (Schleifer et al. 1990a). Pohyb zajišťují bičíky. Mají pouze jeden nebo celý svazek, který je umístěn laterálně (Haikara & Helander 2006). Čím je bakterie starší, tím je zakřivení větší. Někdy může tvořit charakteristické helikální útvary připomínající hada. Mladé buňky tvoří útvary připomínající písmeno „X“ (Schleifer et al. 1990a).

Zkvašuje především ribosu, rhamnosu, glukosu, fruktosu, maltosu, laktát i pyruvát, a dokonce využívá i N-acetylglukosamin (Schleifer et al. 1990b; Matoulková 2008). Toleruje vyšší množství ethanolu 3,7–4,4 %, ale u piva s obsahem nad 5,2 % již neroste (Haikara & Helander 2006; Eßlinger 2009). Optimální teplotní rozmezí je mezi 15–40 °C, ideální teplotní rozmezí pro množení je 28–32 °C. Teplota nad 50 °C je pro ně fatální (Matoulková & Kubizniaková 2014). Limitním faktorem růstu je i teplota v hale. Pokud teplota klesne pod 15 °C, *Pectinatus* spp. zastavuje svůj metabolismus a nemnoží se (Back 2005). V pivovarech přežívá ve formě narostlého biofilmu. Typickým znakem zkaženého piva touto bakterií je vysoký mléčný zákal s výrazným zápachem po sirovodíku (Juvonen & Suihko 2006). V pivu tvoří i další senzorycky nežádoucí látky jako: methyl, merkaptan, propionovou, mléčnou, octovou a jantarovou kyselinu (Storgårds et al. 2006a).

Nejčastějším pivo kazícím druhem je *P. cerevisiophilus*, který se od ostatních liší svou neschopností využít inositol. Dále druh *P. frisingensis*, který se liší od ostatních využitím N-acetylglukosaminu a celobiosy. Posledním druhem je *P. haikarae*, který se liší pozitivní katalázovou reakcí, fermentuje laktosu a neroste při + 37 °C (Chaban et al. 2005; Boone et al. 2009). Odhaduje se, že rod *Pectinatus* je původcem zhruba 20–30 % případů bakteriálního kažení hotového lahvového piva. Většina případů byla zaznamenána u nepasterovaných piv (Matoulková 2008). Kažení je nejčastěji zaznamenáno po 2–3 týdnech (Haikara & Helander 2006).

3.5.2.2 *Megasphaera* spp.

Megasphaera spp. je mesofilní, gramnegativní, nepohyblivá, kataláza negativní, nesporulující a striktně anaerobní bakterie (Matoulková & Kubizniaková 2014). Vyskytuje se ve formě koků či diplokoků o přibližné velikosti 1,2–1,6 µm. Někdy může tvořit i krátké řetízky (Eßlinger 2009).

Obecně je optimální teplota růstu mezi 30–37 °C. Avšak např. druh *M. elsdenii* má optimální teplotu růstu o něco vyšší mezi 37–42 °C. Z tohoto důvodu je její výskyt v pivovaru méně častý oproti *M. cerevisiae*, která má teplotní optimum okolo 28 °C. Navíc dokáže růst i v hale při teplotě 15 °C. Z toho důvodu je *M. cerevisiae* potenciálně nebezpečnější (Haikara & Helander 2006).

Jsou charakteristické fermentací především pentos a hexos, mléčné kyseliny a pyruvátu (Haikara & Helander 2006). *M. cerevisiae* využívá arabinosu, fruktosu, mléčnou kyselinu. *M. elsdenii* využívá fruktosu, glukosu, mannitol, maltosu, sacharosu a mléčnou kyselinu (Boone et al. 2009). Produkují především valerovou, máselnou, kapronovou, octovou kyselinu a velké množství oxidu uhličitého (Storgårds 2000). Zároveň ze sirných aminokyselin produkuje nepříjemně páchnoucí sirovodík. Velikost buněk *M. elsdenii* je od 2,4–2,6 µm. Vyskytuje se v párech či v krátkých řetězcích po 8–20 buňkách. Roste při pH 4,6–7,8 s optimem 6,05 pH. Oproti tomu *M. cerevisiae* je výrazně menší a v průměru mají buňky 1,3–2,1 µm. Toleruje nižší pH, konkrétně roste mezi 4,1–4,7 pH. Důležitým inhibičním faktorem růstu je vyšší obsah alkoholu. Růst zpomaluje obsah okolo 3,9 % obj. a obsah 4,3 % růst zcela zastavuje. Z toho vyplývá, že piva s nižším obsahem alkoholu, konkrétně pod 2,25 % obj., jsou náchylnější ke kažení touto bakterií (Boone et al. 2009).

Oproti ostatním pivo kazícím bakteriím je tedy méně odolná vůči působení ethanolu (Suzuki 2011). To potvrzuje i zjištění, že růst bakterií rodu *Megasphaera* nebyl zaznamenán v pivech s obsahem alkoholu mezi 5,5–6,5 % (Haikara & Helander 2006). U piv s nízkým obsahem ethanolu, konkrétně 2,1 % u druhu *M. cerevisiae*, byl sice růst zaznamenán, ale byl výrazně zpomalen. (Kyselová & Brányik 2015). Tento druh byl dokonce v Evropě mezi roky 1980–2002 původcem 3–7 % případů zkažených nepasterizovaných piv (Paradh et al. 2011). Vlivem větší senzitivity vůči inhibičním faktorům je kažení rodem *Megasphaera* méně časté než kažení rodem *Pectinatus* (Boone et al. 2009).

Je typickým sekundárním kontaminantem (Eßlinger 2009), protože je detekována především již v hotových pivech (Zheng et al. 2018). Tvoří méně viditelný zákal, který je vidět až po několika týdnech (Briggs et al. 2004), protože potřebuje zhruba 3–4 týdny (Haikara & Helander 2006) oproti rodu *Pectinatus*, který dokáže zkažit pivo do 2–3 týdnů. Roste pomaleji, avšak kažení je možné detekovat senzorycky dle nepříjemného zápachu a kyselé chuti (Eßlinger 2009).

3.5.3 Biofilm

Biofilm je pro provozovatele potravinářských podniků z hlediska bezpečnosti potravin nebezpečnější než samostatné planktonické buňky. Jedná se totiž o konsorcium mikroorganismů přilnutých na biotický či abiotický povrch, jež může být tvořen jedním nebo několika druhy mikroorganismů (Singh et al. 2006). Díky jeho struktuře a složení je odolnější vůči různým stresovým faktorům, jako je např. vliv oxidace, sušení, kovových iontů, UV záření, antibiotika, desinfekční prostředky (Flemming & Wingender 2010). Dokonce i biofilmy složené pouze z jednoho druhu bakterií jsou odolnější než jejich planktonické ekvivalenty, např. *L. plantarum* subsp. *plantarum*, který vykazoval výrazně vyšší rezistenci vůči octové kyselině a ethanolu než planktonické buňky (Kubota et al. 2008).

Velkou výhodou biofilmu je krycí slizovité pouzdro, které je tvořeno komplexem extracelulární polymerní látek s vodou. Voda vázána kapsulí bakteriálních buněk tvoří zhruba 97 % biofilmu. Zbytek matrix je tvořen komplexem polymerních látek, produktů lýzy buněk, metabolitů a organických i anorganických zbytků z prostředí. Tento hydrogel slouží především jako ochrana bakteriálních buněk před negativními vlivy prostředí (Singh et al. 2006; Hofmann & Fischer 2015).

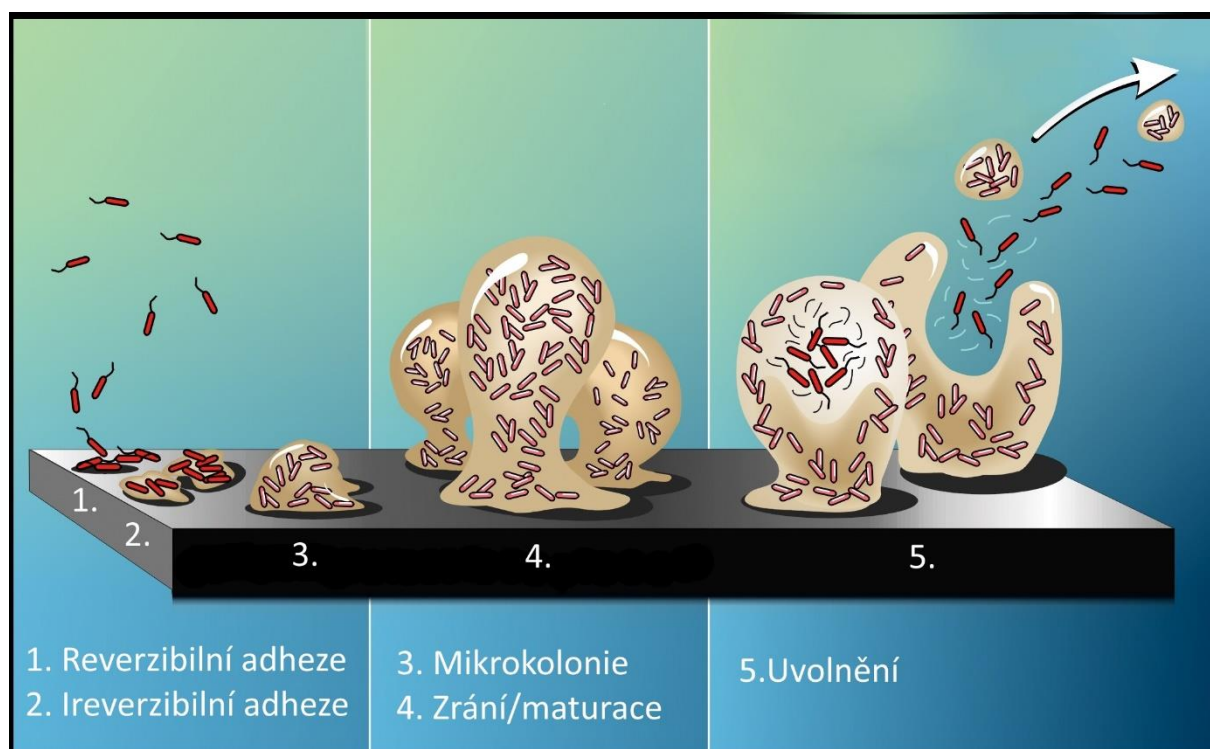
3.5.3.1 Vznik biofilmu v pivovarském provozu

Výrobní zařízení v potravinářských provozech by měla být hladká a dobře omyvatelná, konstruovaná jednoduše a celistvě bez složitých záhybů a spojů. Jsou to především záhyby, spoje, těsnění, zmineralizované anorganické látky, oděrem či rýhami narušené povrchy, které umožňují ulpívání organických látek a adhezi mikroorganismů. Narušené či špatně omyté povrchy jsou spolu s vlhkým prostředím prekurzorem vzniku biofilmů (Arampatzi et al. 2011; Horsáková 2017).

Tvorbu biofilmu lze rozdělit do několika fází. Obecně se rozděluje na reverzibilní adhezi (1), ireverzibilní adhezi (2), mikrokolonie (3), zrání/maturace (4) a uvolnění (5) viz Obrázek 3 (Quain 2015).

V pivovarském provozu začíná tvorba biofilmu kolonizací povrchů octovými bakteriemi (Matoulková & Kubizniaková 2014). Tyto primární adherující mikroorganismy umožní přilnutí dalších mikroorganismů, především pak nechtěných bakterií mléčného kvašení (Hill 2015). Octové bakterie, konkrétně *Gluconobacter oxydans* a *Acetobacter* spp. spotřebovávají kyslík a tím postupně vytvářejí anaerobní prostředí ve středu biofilmu (Mamvura et al. 2011).

Následuje kolonizace mléčnými bakteriemi, které jsou schopny díky svému fakultativně anaerobnímu metabolismu přežít určitou hladinu kyslíku. Ve vznikajícím biofilmu se začínají pomnožovat, vytvářet mléčnou kyselinu a dále snižují množství kyslíku. Nově vzniklé anaerobní prostředí ve středu biofilmu umožňuje přežití striktních anaerobů *Pectinata* spp. a *Megasphaera* spp. Růst těchto obligátně pivo kazících bakterií je navíc podpořen metabolity bakterií mléčného kvašení a zároveň i jejich odumírajícími buňkami. Produkty lýzy buněk zvyšují pH prostředí, což vytváří ideální podmínky pro jejich růst (Back 2005).



Obrázek 3 Fáze vzniku biofilmu - upraveno

(http://www.biofilm.montana.edu/images/2003_PSto_BFin3steps14b.jpg)

3.5.4 Detekce pivo kazících bakterií

Obecně se bakterie v potravinářství a nápojovém průmyslu standardně stanovují nepřímou kultivační deskovou metodou na selektivních polotuhých pěstebních prostředích. Tyto metody jsou poměrně levné, ale časově náročné. Modernějšími metodami jsou testy založené na fyzikálních, chemických, genetických či imunologických principech. Jedná se např. o imunologický test ELISA–imunoanalýza na pevné fázi (enzyme-linked immunosorbent assay), testy nukleových kyselin jako FISH–fluoresceční hybridizace (fluorescent *in situ* hybridization), PCR–polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction),

PFGE–gelová elektroforéza v pulzním poli (pulsed-field gel electrophoresis) a ještě mnoho dalších (Demnerová 2012; Vlková et al. 2009).

Kultivační půda, která by byla univerzální a dokázala rychle a spolehlivě detekovat všechny pivo škodící mléčné bakterie, neexistuje (Back 2005). Jsou uváděny různé druhy a způsoby kultivace, které jsou převážně kompromisem mezi rychlostí růstu, selektivitou a citlivostí daných bakterií (Gillet et al. 2003). Nejvíce se využívá membránová filtrace, při které je 100–500 ml zkoumané kapaliny podtlakově filtrováno přes speciální membrány a následně kultivováno na vhodném médiu (Matoulková & Kubizniaková 2014). Mezi nejpoužívanější média se řadí např. MRS (de Man, Rogorosa Sharpe určené především pro izolaci laktobacilů), UBA (Universal Beer Agar určený pro pivo kazící bakterie), Raka-Ray (selektivní médium pro laktobacily a další nežádoucí bakterie v pivovarských a vinařských provozech) a NBB (speciálně vyvinutá hotová média k detekci nežádoucích bakterií v pivovarských a vinařských provozech) (Gillet et al. 2003).

3.5.4.1 Detekce bakteriálního biofilmu

Detekce biofilmů je v praxi důležitá především ve zdravotnictví a v potravinářském průmyslu. V potravinářském průmyslu se řeší především tvorba biofilmu na povrchu technologických zařízení (Kunová et al. 2011). Pro detekci se využívá několik metod, např. TEM–transmisní elektronová mikroskopie (transmission electron), AFM – mikroskopie atomových sil (atomic force microscopy), CSLM – konfokální skenovací laserová mikroskopie (cccc), fluoresceční mikroskopie, ATP bioluminiscence a již zmíněná PCR. Z hlediska využitelnosti v provozu se nejčastěji využívají kultivační metody, ATP bioluminiscence a PCR (Chmielewski & Frank 2003; Van Houdt & Michiels 2010; Simões et al. 2010).

Hojně využívaná ATP bioluminiscence slouží jako rychlá provozní metoda pro kontrolu efektivity sanitace. Pomocí luminometru se měří množství zdroje energie všech živých buněk neboli množství ATP (adenosintrifosfát). Slouží k detekci celkového znečištění (ne pouze mikrobiálního), protože ATP se nachází i v organické hmotě. Z tohoto důvodu se využívá po sanitaci, kdy má být provozní linka zcela bez přítomnosti jakýkoliv organických zbytků a zároveň bez přítomnosti bakterií. V průběhu provozu však není zcela schopna rozlišit, zda se jedná o organické zbytky vyráběné potraviny nebo o mikrobiální kontaminaci (Boulton 2013).

Z tohoto důvodu budou dále podrobněji popsány dvě metody, které byly prakticky prováděny pro detekci bakteriálního biofilmu. Jedná se o kultivační metodu pomocí selektivního média (podrobněji popsáno v metodice) a o kvantitativní PCR.

3.5.4.2 Polymerázová řetězová reakce

Polymerázová řetězová reakce (PCR - polymerase chain reaction) je rychlá metoda, která je založena na amplifikaci specifického úseku sledované nukleové kyseliny (Juvonen et al. 2008). Za vývoj této metody byl roku 1993 oceněn Nobelovou cenou americký biochemik Kary Mullis (NobelPrize.org 2019). Tuto metodu lze využít mnoha způsoby, především pak k identifikaci a fylogenetické klasifikaci mikroorganismů (Juvonen et al. 2008). Jedná se o enzymovou reakci *in vitro*, při které dochází k syntéze definovaného úseku nukleové kyseliny, konkrétně deoxyribonukleové (DNA). Syntéza je zahájena přítomností specifických oligonukleotidových primerů, jež jsou komplementární k 3' a 5' koncovým sekvencím specifického úseku DNA, který má být amplifikován. Tento úsek DNA slouží jako občanský průkaz mikroorganismů, proto musí být specifický pro zjišťovaný druh či kmen (Ruml 2002).

Identifikace probíhá u bakteriálních genů převážně na 16S rDNA genu (Juvonen et al. 2008). Metoda je velice citlivá, teoreticky stačí jedna molekula pro získání dostatečného množství PCR produktu (Alberts 1998). Nevýhoda této skutečnosti je kontaminace jedinou molekulou, která může způsobit falešně pozitivní výsledek (Rosypal et al. 2001)

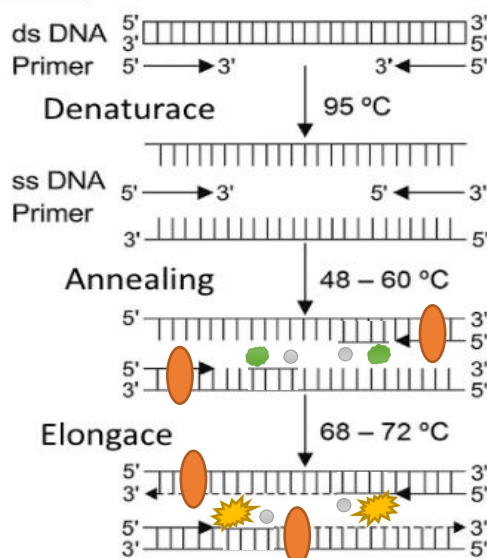
3.5.4.3 Polymerázová řetězová reakce v reálném čase

Pro kvantitativní polymerázová řetězová reakce v reálném čase se používá zkratka RT-PCR, která pochází z anglického názvu Quantitative Real-time polymerase chain reaction (Juvonen et al. 2008). Princip PCR v reálném čase spočívá v přesném a rychlém stanovení amplifikovaného úseku DNA bezprostředně po jeho vzniku v každém cyklu PCR. Toto měření je zprostředkováno přístrojem zvaným termocykler. Ten umožňuje detekci fluorescence a opakovanou změnu teplot v každém cyklu potřebnou pro amplifikaci DNA (Siegrist et al. 2015).

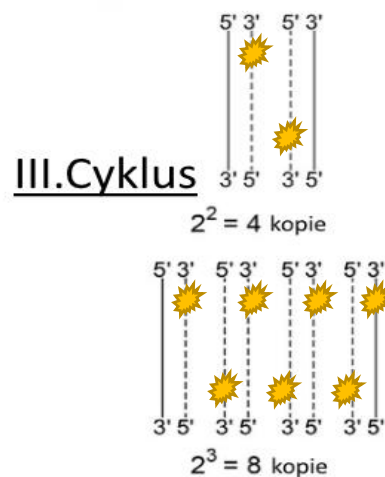
K zahájení replikace je nutná přítomnost některých komponent. Konkrétně jsou to dva specifické primery, sondy (proby) s fluoresceční sondou, termostabilní DNA polymeráza, deoxyribonukleotidy a reakční ředící roztok. Všechny komponenty kromě specifických primerů lze zakoupit v již předpřipravených komerčních směsí zvaných master mix (Saik et al. 1988).

Opakující se PCR reakci probíhající v termocykleru lze rozdělit na tři části. Reakci zahajuje denaturace templátové dsDNA (z angl. double stranded DNA neboli dvouvláknová DNA), která je iniciována zvýšenou teplotou okolo 95 °C. Vlivem teploty dochází k rozpadu vodíkových můstků a takto denaturovaná DNA již netvoří komplementární dvoušroubovici, ale je rozdělena na dva lineární řetězce ssDNA (z angl. single stranded DNA neboli jednovláknová DNA). V druhé části zvané annealing se teplota sníží na 50–65 °C. Dochází k nasednutí komplementárních primerů ke specifickému úseku ssDNA. Následuje elongace, kdy je nasynthetizován úsek od 3' konce k 5' konci pomocí termostabilní DNA polymerázy. Teplota je kvůli správné funkci DNA polymerázy zvýšena na 68–72 °C. V prvním cyklu se DNA zdvojnásobí. V dalším cyklu se z každého úseku nasynthetizují další dva. S každým dalším cyklem roste množství DNA dvojnásobně viz **Chyba! Nenalezen zdroj odkazů..** Cyklů bývá většinou kolem 20 až 50 (Siegrist et al. 2015). V průběhu cyklů se specificky navázané proby s fluorescenční sondou aktivují a vyzářené fluorescenční světlo je zaznamenáno detektorem. Síla fluorescenčního signálu je přímo úměrná koncentraci DNA ve vzorku. Výsledkem je amplifikační křivka, která vykresluje závislost intenzity fluorescence a počtu PCR cyklů (Říhová Ambrožová et al. 2017).

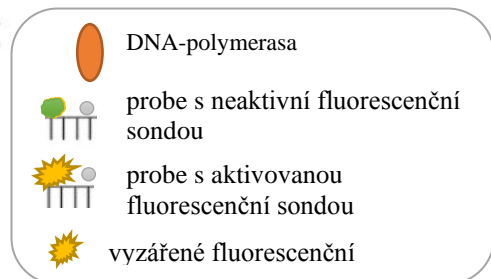
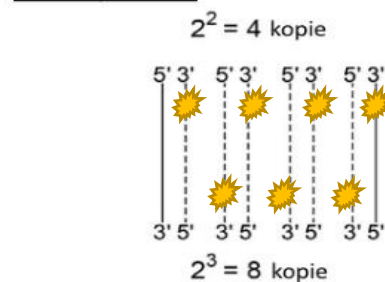
I. Cyklus



II. Cyklus



III. Cyklus



Obrázek 4 Průběh RT-PCR reakce, upraveno dle (Juvonen et al. 2008)

3.6 Sanitace

Dodržování zásad správné hygienické, výrobní praxe a sanitace je nezbytnou součástí každého potravinářského podniku. Jedná se o soubor opatření vedoucí k výrobě zdravotně nezávadných potravin, což je hlavní a nejdůležitější požadavek na potraviny obecně. Sanitace je účinným nástrojem snižování nežádoucí kontaminace a je zásadní operací při zabezpečování hygienických podmínek výroby potravin. V boji proti činnosti nežádoucích mikroorganismů se využívají různé kombinace mechanického čištění s fyzikálními metodami a chemickými prostředky (Holah 2013). Jedná se o soubor operací, které jsou pro všechny provozovatele potravinářských podniků velice nákladné a časově náročné. Jde však o nutnou investici, kde se úspory dosahuje především při snížení ztrát na vyráběných potravinách a na zvýšení životnosti strojů a technologických zařízení (Moerman et al. 2013).

Účinná sanitace by se měla skládat z manuálního čištění, CIP (cleaning in place) a COP (cleaning out of place) (Loeffler 2006). Mechanické čištění zahrnuje např. odstraňování prachu, nečistot a zbytků organického materiálu ze strojů, stěn i podlah. Při tomto druhu čištění je důležitá preciznost čištění především v místech, která jsou méně přístupná (např. ohyb potrubí), aby nedocházelo k tvorbě odolných ložisek biofilmů (Šilhánková 2002).

Zkratka CIP – Cleaning in place v překladu znamená čištění na místě. CIP je proces automatického čištění bez jakékoliv demontáže stroje. Jde o čištění, které není závislé na lidské pracovní síle. CIP programy bývají často součástí strojů navržených a nastavených přímo výrobcem. V pivovaru se CIP systému využívá především při čištění tanků, tepelných výměníků, plniců atd. Naopak COP – cleaning out of place je čištění částí stroje mimo výrobní prostor. Jsou to např. sanitační vany určené pro desinfekci plnicích jehel (Loeffler 2006). Sanitační chemické prostředky používané v potravinářství nesmějí nepříznivě ovlivňovat chuť výrobku, zdraví zaměstnanců nebo konzumentů, výrobní prostor (zápach) a ani by neměly poškozovat výrobní zařízení (Šilhánková 2002). Účinnost sanitace je závislá na kvalitě mechanického očištění, použitých chemikáliích a jejich koncentracích, dále na teplotě a času. Tyto faktory lze různě kombinovat. Obecně je snaha sanitační proces nastavit tak, aby byla dosažena maximální účinnost za minimálních provozních nákladů (Holah 2013).

Používané chemikálie se dělí podle hodnoty pH na kyselé, alkalické a neutrální. Alkalické přípravky jako např. hydroxid sodný, hydroxid draselný, hydrogenuhličitan sodný atd. slouží k odstranění organických nečistot. Kyselé přípravky jako např. kyselina fosforečná, kyselina dusičná atd. slouží k odstranění anorganických nečistot. Mohou se využívat i povrchově aktivní látky, enzymy, oxidační činidla, inhibitory koroze, změkčovadla a ještě

mnoho dalších. Velká sanitace se v pivovarech aplikuje převážně před začátkem stáčení např. po víkendu, kdy byla odstávka linky, nebo pokud se bude stáčet výrobek, který je svým složením velice odlišný od předchozího výrobku. V průběhu výroby lze plnicí linku v pravidelných intervalech čistit tzv. pěnováním. Jedná se o automatické a ekonomické čištění za pomoci pěny (Loeffler 2006).

3.6.1 Pěnování

Pěnové čištění kombinované se středotlakým oplachem (2,0 Mpa) je v dnešní době nejpoužívanější metodou čištění v průběhu výroby (Basařová et al. 2010). Automatizace systému umožňuje snižovat riziko lidského faktoru při čištění. Je efektivnější, šetří čas a chemické prostředky. Podmínkou efektivního pěnování je optimální nastavení teploty, tlaku, výdrže a koncentrace chemikálií (Storgårds & Priha 2009). Čištění pomocí pěny je z ekonomické z pohledu úspornější, protože např. z 1 l chemického přípravku v kombinaci s 49 l vody a 450 l vzduchu se vyrobí až 500 l aktivní pěny, kterou lze v tenké vrstvě pokrýt až 200 m² plnicího zařízení. Před a po aplikaci pěny se povrchy musí opláchnout dostatečným množstvím horké vody (Loeffler 2006).

Pěna je definována jako koloidně-disperzní systém, který se skládá z disperzního prostředí (chemického prostředku a vody) a dispergovanou částí je plyn (vzduch). Dle objemu dispergovaného plynu rozdělujeme pěny na vlhké a suché (Bartovská & Šišková 2005). Vlhké pěny mají bubliny kulovitého tvaru a suché jsou tvořeny plynem, který zaujímá více než 90 % objemu. Velký podíl plynné fáze ovlivňuje tvar bublin, které jsou stlačené na sebe a místo kulovitého tvaru mají tvar mnohostěnnů (Basařová et al. 2010). Suchá pěna se při čištění spíše nepoužívá. Je velmi hutná, zachovává si svůj tvar a nedosahuje požadovaného mycího účinku. Žádanější je pěna mokrá, která má lepší mycí schopnosti. Avšak příliš mokrá pěna stéká z vertikálních ploch příliš rychle, to vede k nedodržení potřebného času kontaktu s povrchem a nedochází k penetraci aktivních složek mycího prostředku vrstvou nečistot. Dokonalá směs pěny je tvořena v takovém poměru, aby z povrchů stékala pomalu a umožnila tak průběh požadovaného čistícího účinku (Loeffler 2006). Na výsledek čištění má vliv i vrstva pěny, která by neměla být moc velká, protože urychluje stékání, a navíc je neekonomická. Ideální vrstva je tenká a kompaktní (Basařová et al. 2010).

Před samotným pěnováním jsou povrchy zvlhčeny teplou vodou (40–50 °C), která přehřívá povrchy a zvyšuje tak účinnost následné pěny. Teplota aplikované pěny je závislá na použité chemikálii i technologii. Pěna by měla být v kontaktu s povrchem cca 10–20 minut.

Následuje oplach teplou vodou, v některých případech následuje ještě aplikace desinfekčního prostředku (Eßlinger 2009).

3.6.2 Bakteriální rezistence a perzistence

Nedokonalá sanitace a nedostatečné odstranění biofilmu na výrobních zařízeních nepředstavuje problém pouze jen z hlediska křížové kontaminace, ale zároveň se zvyšuje i potenciální riziko infekčního přenosu antimikrobiální rezistence či přímé rezistence na používaná média (Šilhánková 2002). Diverzifikace populací je v biofilmech natolik individuální, že umožňuje odlišný bakteriální růst i genovou expresi přímo uvnitř biofilmu. Tento mechanismus jim umožňuje se velice rychle přizpůsobovat na stresové podmínky a na nepříznivé vlivy vnějšího prostředí. Z toho vyplývá, že při nedokonalém čištění hrozí mnohem vyšší riziko vzniku rezistence či perzistence v biofilmech než u samotných planktonických buněk (Gutiérrez et al. 2016).

Rezistence je schopnost bakterie odolávat nepříznivým vlivům a je geneticky zakódovaná. Za nejdéle studovaný druh rezistence lze považovat antibiotickou rezistenci, která se začala rychle rozvíjet s terapeutickou aplikací antibiotik (Abraham & Chain 1940). Postupem let s vyššími nároky na čistotu provozů rostlo i použití čistících a antibakteriálních chemických přípravků. Stejně jako u antibiotické rezistence se postupem času začala vyvíjet i rezistence na sanační média, tzv. antimikrobiální rezistence (Wuijts et al. 2017). Rezistenční schopnost bakterií je zabudovaná v genetické informaci. Jedná se o tzv. genetickou mutaci, která může být přenesena dokonce i z jednoho bakteriálního druhu na druhy příbuzné, popřípadě i rody, což umožňuje vznik velmi odolných mutantů (Šilhánková 2002). Použité teploty při sanitaci, koncentrace médií, znečištění linky i stáří biofilmu tuto mutaci významně ovlivňují (Belessi et al. 2011).

Odolnost bakterií vůči sanitaci a jejich přežití díky biofilmu byla předmětem několika studií, např. vědci z Norska odebírali vzorky ze 3 linek na zpracování lososů. Sanitaci přežily především pseudomonády a inhibovaná byla patogenní bakterie *Listeria monocytogenes* (Langsrud et al. 2016). Ke stejnému závěru došli i vědci z Francie, kteří provedli podobnou studii v podniku na zpracování masa (Fagerlund et al. 2017). Na přežívání bakterií v masném provozu se zaměřili i vědci zkoumající kontaminující bakterii *Escherichia coli*. Došli k závěru, že *Escherichia coli* izolovaná z provozního biofilmu vykazovala větší tendenci tvořit biofilm a navíc významně větší odolnost vůči sanačnímu prostředku (Wang et al. 2014).

Účinek sanitace na narostlý biofilm byl zkoumán i v mléčném průmyslu, kde ze dvou linek vědci odebírali stěry a porovnávali účinnost a potřebný kontaktní čas. Došli k závěru, že narostlý biofilm dokáže přežít sanitaci. Nejvyšší účinnost sanitace byla dosažena při aplikaci 10 ppm jodoforu při době působení 20 minut (Sharma & Anand 2002).

Rezistence určitě patří mezi hlavní důvody, proč dané antibiotikum či sanitační prostředek nedosahují požadované účinnosti. Dalším možným mechanismem přežití stresové situace je perzistence. Perzistence je schopnost bakterií odolávat a přežít účinné dávky, které jsou schopny zabít většinu populace (Amato et al. 2014). Určitá část populace se přeorientuje do stavu tzv. dormance. Jedná se o změnu fyziologického stavu do fáze, ve které mechanismus účinku antibiotik či sanitačních prostředků nefunguje. Nedochází u nich ke změně genetické informace, jako je tomu u rezistentních bakterií. Geneticky jsou shodné se zbytkem nepersistentní populace (Lewis 2010). Perzistentní bakterie se následně za vhodných podmínek reprodukuje a tvoří původní totožnou populaci se shodnou senzitivitou k antibiotikům nebo sanitačním prostředkům (Helaine & Kugelberg 2014).

Z výše uvedených důvodů vyplývá nutnost se ve velké míře věnovat pravidelné mikrobiologické kontrole provozu, dbát na důkladné mechanické čištění a pro jistotu dezinfekční prostředky pravidelně obměňovat (Šilhánková 2002).

4 Metodika

V této kapitole je popsána charakteristika potravinářského podniku, kde byla prováděna praktická část práce. Jsou popsána specifika plnicí linky, použité materiály a metodiky použité v experimentu.

4.1 Charakteristika potravinářského provozu

Práce byla prakticky provedena v pivovaru, který se výrobou piva zabývá už 150 let. Na trhu se řadí mezi významné celosvětové vývozce piv. Předmětem obchodní činnosti je výroba nápojů (pivo i nealkoholické nápoje) a výroba krmiv. Roční výstav se pohybuje okolo 3 miliónů hl piva, které je kvašeno výhradně v cylindrokónických tancích. Pivovar disponuje vlastní úpravnou povrchových vod a pivo stáčí do cisteren, keg sudů, plechovek a do skleněných i plastových lahví.

Experiment byl prováděn v lahvové stáčecí hale, kde se nacházejí dvě plnicí linky. Linka s nižším výkonem je schopna naplnit 36 tisíc lahví za hodinu a rovnoběžně naproti je umístěna linka K60, která je schopna naplnit 60 tisíc lahví za hodinu, zde probíhal pravidelný odběr vzorků.

4.2 Lahvová plnicí linka K60

Linka s vyšší výrobní kapacitou byla pro experiment vybrána z toho důvodu, protože rychlost linky i objem stočeného piva zvyšují pravděpodobnost sekundární kontaminace, a je tudíž potencionálně rizikovější. Součástí monobloku plnicí linky K60 je i korunkovací závěračka. Celý plnicí monoblok K60 je zachycen na Obrázek 5. Hygiena plniče je nastavena tak, že po maximálně 7 směnách musí proběhnout sanitace, která se řídí sanitačním řádem. Po ukončení se kvalita sanitace kontroluje za pomoci luminometru a ATP stěrů z předem definovaných míst.

Maximálně po 2 hodinách musí být zapnutý automatický režim oplachu vodou a maximálně po 6 h v letním období a po 8 h v zimním období musí proběhnout pění plniče za současného pění vstupních i výstupních dopravníků.



Obrázek 5 Lahvová plnicí linka K60

4.2.1 Místa odběru vzorků

Fotografické zobrazení odběrových míst je uvedeno v Příloze I – vzorkovací místa. Celkem bylo vybráno 20 odběrových míst, které byly rozděleny na přímé (12) a nepřímé (8). Přímé mohou nebo přicházejí do přímého kontaktu s pivem. Celkem se jednalo o 2 x 3 plnicí ventily, 2 x 3 plnicí jehly, 2 x 3 zvonky, vypěňovač, 2 x 3 zavírací hlavy (povrch), zavírací hlavy (vnitřek), ústí dráhy korunek do zavíračky a dráha korunek. Nepřímá místa jsou taková, jimiž prochází již uzavřená láhev, konkrétně se jednalo o talířky plniče, talířky zavíračky, hvězda zavíračky, výstupní hvězda.

Vzorky byly odebírány každý týden, pokud to chod linky umožnil. Odběry vzorků probíhaly v období března až listopadu. Odběr začal 10. týdnem roku 2019 a končil 48. týdnem roku 2019 s dvěma výpadky z důvodu odstávky linky a z nedostatku kultivačního média. Během 37 týdnů bylo odebráno a kultivováno celkem 740 vzorků.

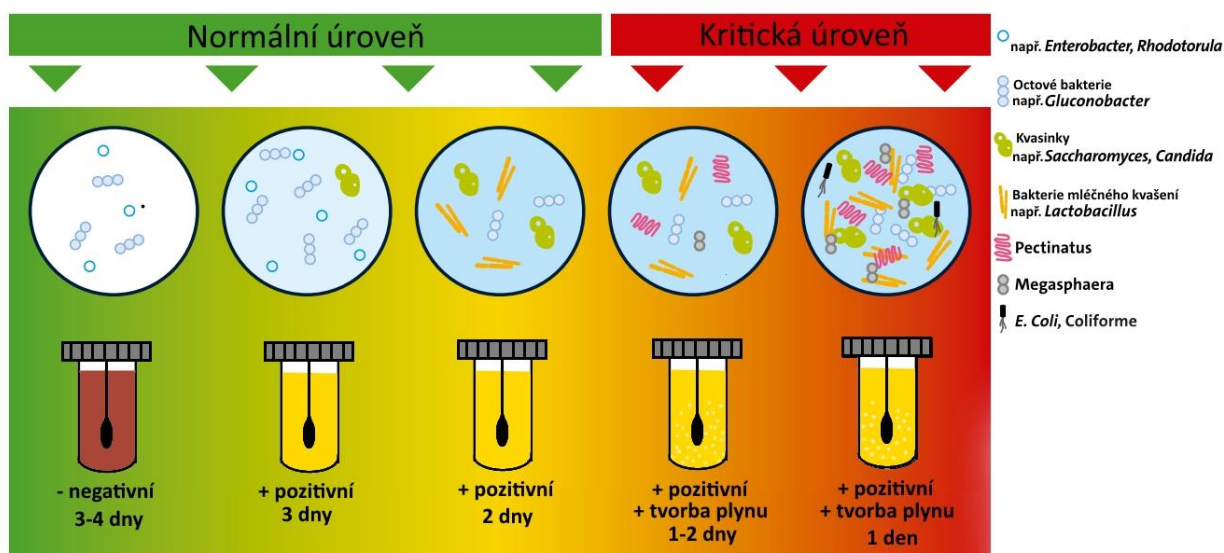
4.3 Detekce bakteriálního biofilmu pomocí NBB-B-am média

Pro experiment bylo použito komerčně prodávané a v provozu běžně zavedené médium, které je vyráběno firmou Döhler, jež je světovým výrobcem a prodejcem se zaměřením

na potravinářskou výrobu a nápojový průmysl. Zkratka NBB-B-am znamená (NBB Broth Enrichment Medium). Označení NBB slouží pro označení výrobní řady určené pro použití v pivovarech. NBB-B-am je tekuté médium určené pro kvalitativní stanovení indikátorových mikroorganismů biofilmu, především pro octové bakterie a bakterie mléčného kvašení.

Tato metoda je v pivovaru rutinně využívána a slouží pro dlouhodobější monitoring hygieny plnění. Jedná se o metodu retrospektivní, která byla vyhodnocována po 3 dnech. Průběh kultivace se řídil návodem od výrobce NBB-B-am média firmou Döhler. Médium je hnědočervené barvy s pH 5,8, při poklesu pH pod 4,8 dochází k barevné změně na žlutou, která indikuje pozitivní nález. Složení média je výrobním tajemstvím firmy Döhler a z tohoto důvodu nebylo v následujících odstavcích podrobně popsáno.

Výrobce doporučuje technikou stěrů z povrchu odebrat vzorky přímo z výrobních zařízení v pivovarském provozu. Doporučené množství je zhruba 20–30 stěrů jedenkrát týdně v zimě a dvakrát týdně v létě. Vatové tyčinky se vzorkem jsou ze stěru následně odlomeny a vloženy do média. Kultivují se v uzavřených zkumavkách 3 dny za aerobních podmínek v termostatu při 27±2 °C. Médium je hnědočervené barvy. Pozitivní nález je indikován změnou barvy na žlutou při poklesu pH pod 4,8. Vzorky by se měly kontrolovat po 24 h. Rychlost zbarvení a někdy i tvorba plynu koreluje s množstvím mikroorganismů ve vzorku, jak je zobrazeno na Obrázek 6 (Eßlinger 2009; Döhler GmbH 2016).



Obrázek 6 Úroveň hygieny v závislosti na barevné změně vzorku, upraveno dle (Back 2005, Döhler GmbH 2016)

Detekce indikátorů bakteriálních biofilmů charakteristických pro výrobu piva byla prováděna s týdenní frekvencí. Odběry probíhaly vždy před pěnáním linky, aby mohla být monitorována a porovnána kvalita hygieny linky i v průběhu stáčení.

4.3.1 Pomůcky a materiál

- Sterilní zkumavky se šroubovacím uzávěrem
- Stojan na zkumavky
- Sterilní stěrové tampóny (odlamovací)
- Termostat 27 ± 2 °C
- Náradí na zdvihání pásů (šroubovák)
- Serologická pipeta (10 ml)
- Pipetovací palónek
- Jednorázové rukavice
- Lihový fix
- Seznam odběrových míst
- 70 % ethanol
- Sterilní fyziologický roztok
- NBB-B-am médium

4.3.2 Laboratorní příprava

V mikrobiologické laboratoři v laminárním boxu se vždy v den analýzy připravily zkumavky s médiem a odběrové stěrové tampóny.

- Pracovní plocha laminárního boxu byla vyčištěna pomocí 70 % ethanolu.
- V jednorázových rukavicích bylo předmáčeno celkem 25 sterilních stěrových tampónů ve sterilním fyziologickém roztoku (cca 0,5 ml) na jeden stěrový tampón. Pro analýzu bylo potřeba 20 kusů + 1 na slepý vzorek a 4 další sloužily jako záložní rezerva pro případnou potřebu.
- Stěrové tampóny se lihovým fixem označily čísly 1–20 v pořadí od nejmenšího po největší dle předem vytisknutého seznamu viz Tabulka 3 odběrových míst a umístily se do stojanu na zkumavky.

- Stejným způsobem se označily i sterilní skleněné 25 ml zkumavky se šroubováním a rovným dnem (1–20 + slepý vzorek).
- Prostřednictvím sterilní jednorázové plastové pipety o objemu 30 ml a balónku bylo napipetováno přesné množství 10 ml NBB-B-am média do každé zkumavky.
- Zkumavky byly uzavřeny a přemístěny do lednice.

Tabulka 3 Seznam vzorkovacích míst

Datum:		Čas:	24 h	48 h	72 h	Výsledek OK/NOK	Mikr. obraz
1.	Plnicí ventily A	P					
2.	Plnicí ventily B	P					
3.	Plnicí jehly A	P					
4.	Plnicí jehly B	P					
5.	Zvonky A	P					
6.	Zvonky B	P					
7.	Vypěňovač	P					
8.	Zavírací hlavy A (povrch)	P					
9.	Zavírací hlavy B (povrch)	P					
10.	Zavírací hlavy (vnitřek)	P					
11.	Ústí dráhy korunek do zavíračky	P					
12.	Dráha korunek	P					
13.	Talířky plniče	N					
14.	Talířky zavíračky	N					
15.	Hvězda zavíračky	N					
16.	Výstupní hvězda zavíračky	N					
17.	Výstupní dopravník	N					
18.	Dopravník před plničem (zvednout)	N					
19.	Dopravník před plničem (povrch)	N					
20.	Válečky dopravníku před plničem	N					

4.3.3 Odběr vzorků

Po telefonické domluvě s operátorem linky byl dohodnut čas odběru, který probíhal zásadně před pěnováním a co nejdéle od sanitace. Následně byla linka zastavena a otevřely se dvířka plnicího monobloku. Zde bylo technikou stěru z povrchu odebráno 20 vzorků dle vzorkovacího plánu.

Pokud to povrch vzorkovacího místa dovolil, setřelo se 10 x 10 cm pod úhlem 30 ° k povrchu (20x zprava doleva a 20x seshora dolů) za současné rotace vatového tamponu. V případě, že bylo odběrové místo menší, technika stěru se upravila tak, aby se ve výsledku

odebrala plocha o velikosti cca 1 dm². U vzorkovacího místa 18 – Dopravník před plnicím byl dopravníkový pás nazdvihnut pomocí šroubováku a sěr se odebral ze spodní strany pásu. Následně byly vzorky odneseny do laboratoře ke zpracování.

4.3.4 Zpracování vzorků

Zpracování probíhalo okamžitě po odběru vzorků v mikrobiologické laboratoři v laminárním boxu viz Obrázek 7. Z lednice byly vyjmuty předpřipravené zkumavky s kulturačním médiem a sěry byly šetrně odlomeny a vloženy do živného média a uzavřeny. Stejným způsobem byl připraven i slepý vzorek s čistým vatovým tamponem. Zpracované vzorky byly umístěny do termostatu a nechaly se zde inkubovat aerobně 3 dny při teplotě $27 \pm 0,5$ °C.



Obrázek 7 Odebraný vzorek a předpřipravené zkumavky

4.3.5 Vyhodnocení

Vzorky se v termostatu kontrolovaly vždy po 24 h od začátku inkubace. Změna barvy na žlutou je znázorněna na Obrázek 8. Tato změna byla zaznamenána do formuláře a celá sada byla vyhodnocena po 3 dnech. Pozitivní vzorky byly překontrolovány pod mikroskopem a mikrobiologický obraz byl zaznamenán do formuláře (bakterie, kvasinky, plísně). Výsledky celé sady byly zaneseny do počítače pro následné statistické vyhodnocení.



Obrázek 8 Pozitivní změna (žlutá barva) negativní změna (hnědočervená), slepý vzorek (vpravo dole)

4.4 RT–PCR na analyzátoru GeneDisc

Některé vzorky byly s náhodnou četností vybrány a analyzovány pomocí RT–PCR na analyzátoru GeneDisc, pomocí sady chemikálií a reagentů určených přímo na detekci pivo kazících bakterií. Tato analýza je vysoce přesná, avšak úměrně s přesností roste i její cena. Z tohoto důvodu byla aplikována pouze jako doplňková analýza za účelem dokreslení celkového obrazu hygieny plnění. RT–PCR je vhodná pro kvantitativní hodnocení, ale v této práci byla využita pro kvalitativní stanovení přítomnosti či nepřítomnosti daného druhu ve vzorku.

Přístroj GeneDisc Rapid Microbiology System byl vyvinut firmou Pall Corporation. Systém funguje na principu RT–PCR a umožňuje analyzovat vzorky zhruba do 2 h. Uplatnit ho lze jak v biofarmaceutickém, tak i v potravinářském průmyslu. GeneDisc analyzátor se skládá z několika přístrojů, a to z vodní ultrazvukové lázně, centrifugy, termobloku, vortexu a termocyklu.

Pro analýzu pivo kazících bakterií byl použit speciální kit vyvinutý stejnou firmou Pall Corporation viz Obrázek 9. Souprava obsahovala MasterMix (směs enzymů a reagentů), Extraction Pack Food 1 (obsahuje předplněné mikrozskumavky a ředící roztok), GeneDisc Plate for Beer Spoilage Bacteria (minerální olej a disky s 6 sektory, každá po 6 kapilárách).

Každý sektor je předplněn reagenty, inhibiční kontrolou, primery a proby určené pro detekci *Lactobacillus* spp. (*L. brevis*, *L. (para)collinoides*, *L. backii*, *L. lindneri*, *L. acetotolerans*, *L. (para)casei*, *L. coryniformis*, *L. rossiae*, *L. parabuchneri*, *L. perolens* a *L. plantarum*), *Megasphaera* spp., *Pediococcus* spp., *Pectinatus* spp.

4.4.1 Chemikálie

- Master Mix
- Minerální olej
- 70 % ethanol

4.4.2 Přístroje a pomůcky

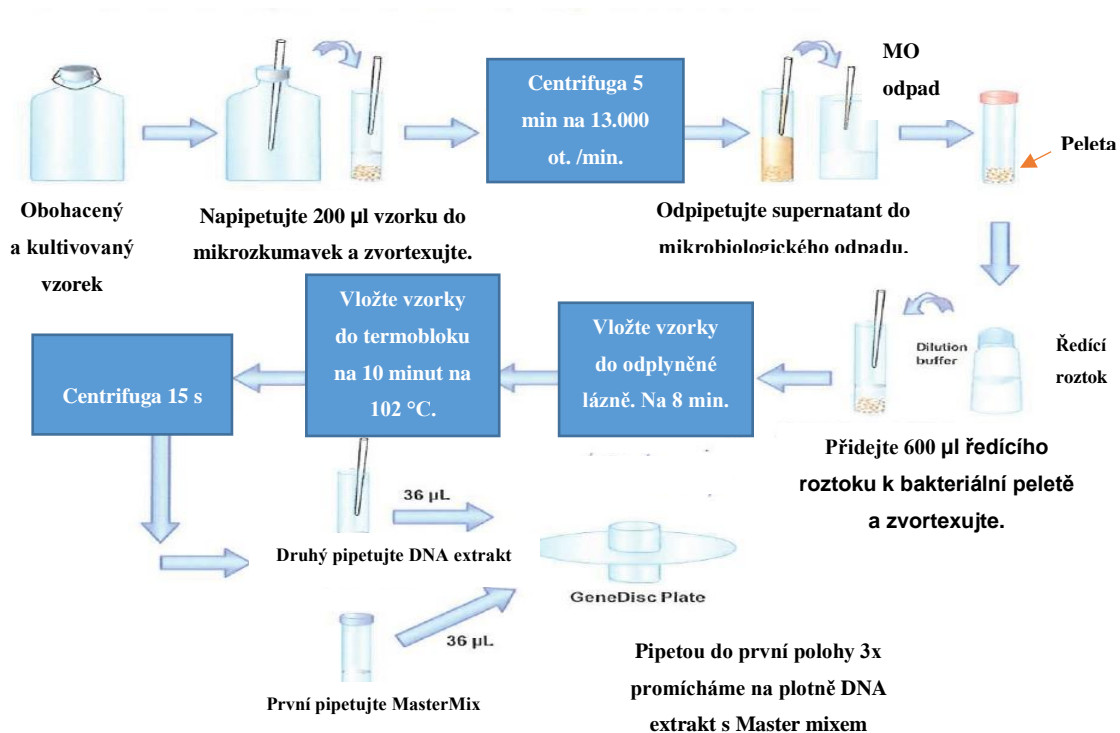
- GeneDisc Plate for Beer Spoilage Bacteria
- Pall GeneDisc cyklér
- Vortex
- Centrifuga
- Vodní ultrazvuková lázeň
- Topné těleso
- 10–100 μ l, 20–200 μ l špičky a automatické pipety
- Extraction Pack Food 1 (Pall)
- Stojan na mikrozkušavky



Obrázek 9 Vlevo ředící roztok, uprostřed směs Master Mix a vpravo plotna pro pivo kazící bakterie

4.4.3 Příprava vzorků

- Pracovní prostor byl ošetřen 70 % etanolem. Během přípravy byly použity rukavice bez pudru. Před pipetováním vzorků do GeneDisc ploten byly rukavice vyměněny.
- Mikrozkumavky s připraveným roztokem (Extraction pack) byly krátce odstředěny na centrifuze. Tento krok se provádí proto, aby se veškerá kapalina usadila na dně microzkumavky.
- Následně bylo odebráno 200 μ l dobře promíchaného vzorku do microzkumavky s připraveným roztokem.
- Obsah mikrozkumavek se pomocí vortexu promíchal.
- Následně byly vzorky odstředěny na centrifuze (5 min na 13.000 rpm).
- Mezitím bylo zapnuto odplynění ve vodní ultrazvukové lázni, které probíhalo minimálně 2 minuty.
- Supernatant byl šetrně odpipetován. Tento krok odstranil ze vzorku všechny potenciální inhibitory a zbytky matrice vzorku.
- K vzorkům bylo přidáno 600 μ l ředícího pufru.
- Vzorky byly znovu promíchány pomocí vortexu.
- Následně byly vloženy do vodní ultrazvukové lázně a následovalo 8 minut mechanického rozbíjení buněk při výkonu 80 %.
- Dalším krokem bylo zahřátí vzorků v termobloku na 102 °C po dobu 10 minut.
- Vzorky byly promíchány pomocí vortexu.
- Následovalo poslední odstředění (15 s na 13.000 rpm).
- Na vyčištěnou plochu byla z obalu vyjmuta GeneDisc plotna s 6 otvory.
- Jako první se pipetovalo 36 μ l MasterMixu (směs primerů) do každé sekce.
- Jako druhý v pořadí byl pipetován hotový DNA extrakt (supernatant ze vzorku). Do každé sekce 1 vzorek podle čísla vzorku v množství 36 μ l. Opětovným nasátím do první polohy pipety byl vzorek s MasterMixem promíchán.
- Celý postup je graficky znázorněn níže na Obrázek 10



Obrázek 10 Grafické znázornění přípravy vzorků

4.4.4 Analýza

- Po zapnutí přístroje GeneDisc byl do přístroje naskenován čárový kód plotny a MasterMixu. Přístroj dle kódu rozpoznal druh analýzy a sám předpřipravil program.
- Po zapsání vzorků bylo zapnuto predehřování termocyklieru.
- Systém následně vyzýval k dalším krokům. Po nasazení hadičky na plotnu proběhlo nasátí vzorků do jednotlivých kapilár za současného poklepávání s plotnou (rozbíjení bublinek).
- K vzorkům byly přidány 4 kapky minerálního oleje. Nasadila se hadička a opět došlo k nasátí vzorků do kapilár i s olejem.
- Správné rozložení vzorků v jednotlivých kapilárách bylo vizuálně zkontrolováno a plotna byla vložena do termocyklieru.
- V tuto chvíli začal program běžet samovolně. Analýza trvá přibližně 60 minut.
- Po ukončení analýzy byly výsledky překontrolovány a následně stáhnuty na USB disk k dalšímu zpracování.

4.5 Záznam dat a vyhodnocení

K plnicí lince bylo nainstalováno teplotně-vlhkostní čidlo typu TEHUM od výrobce Bluematic. Čidlo bylo umístěno na sloup 2 m nad zem a cca 3 m od plniče. Přesnost měření teploty byla $\pm 0,3$ °C v rozsahu měření od -35 °C až 60 °C. Přesnost měření relativní vlhkosti byla ± 2 % v rozsahu měření 0–100 %. Naměřené hodnoty byly odeslány do volně dostupného softwaru Grafana Labs, ze kterého byly následně data exportovány do Microsoft Excel. Data o chodu linky byla stažena z interního programu IVAMS (Ivanovo Monitoring Systém) a zpracována v programu Microsoft Excel.

Výsledná data byla vyhodnocena pomocí korelační matice v programu Microsoft Excel přes funkci (correl). Následně byly vypočítány a do grafů zaneseny četnosti výskytu mikroorganismů a jejich procentuální zastoupení.

5 Výsledky

V experimentální části mé diplomové práce byly zjišťovány závislosti mezi úrovní mikrobiální kontaminace, frekvencí pěnování a mezi vnějšími podmínkami, na které má vliv roční období. Měřenými parametry byla úroveň kontaminace, vlhkost, teplota, rosný bod, výskyt bakterií, kvasinek, plísní a frekvence pěnování. Vzorky byly odebírány každý týden, pokud to chod linky umožnil. Odběry vzorků probíhaly v období březen až listopad. Odběr začal 10. týdnem roku 2019 a končil 48. týdnem roku 2019 s dvěma výpadky z důvodu odstávky linky a z nedostatku kultivačního média. Během 37 týdnů bylo odebráno a kultivováno celkem 740 vzorků. Pro kontrolu média byl v každé sadě umístěn i slepý vzorek, který byl připraven totožně s rozdílem použití sterilní stěrové vatové tyčinky.

Vztahy mezi proměnnými byly vneseny do korelační matice viz Tabulka 4. Z uvedené matice vyplývá, že očekávané korelace mezi proměnnými nedosáhly požadované průkazné statistické závislosti. Byl nalezen středně silný korelační vztah (0,4) mezi parametry: úroveň kontaminace a počet pěnování mezi sanitací a odběrem. Silný korelační vztah (0,72) byl nalezen mezi výskytem bakterií a 48 h kultivace a zároveň střední závislost (0,49) při kultivaci do 72 h. Z toho vyplývá, že většina pozitivních vzorků obsahující bakterie byla pozitivní do 48 nebo 72 h. Kultivace vzorků probíhala vždy 3 dny. Po 24 h se vzorky kontrolovaly a případná barevná změna, díky acidobazickému indikátoru, znamenala pozitivní nález. Jak uvádí výrobce, čím dřív proběhne barevná reakce, tím je úroveň kontaminace větší. Médium je speciálně vyrobeno pro pivovarský provoz k detekci indikátorových bakterií tvořící biofilm. U každého pozitivního vzorku následně proběhla mikroskopická kontrola výskytu konkrétního druhu mikroorganismu (bakterie, plíseň nebo kvasinka). Středně silný korelační vztah (0,53) byl zaznamenán mezi výskytem bakterií a kvasinek. Kvasinky se prakticky nevyskytovaly samostatně, ale vždy v přítomnosti bakterií.

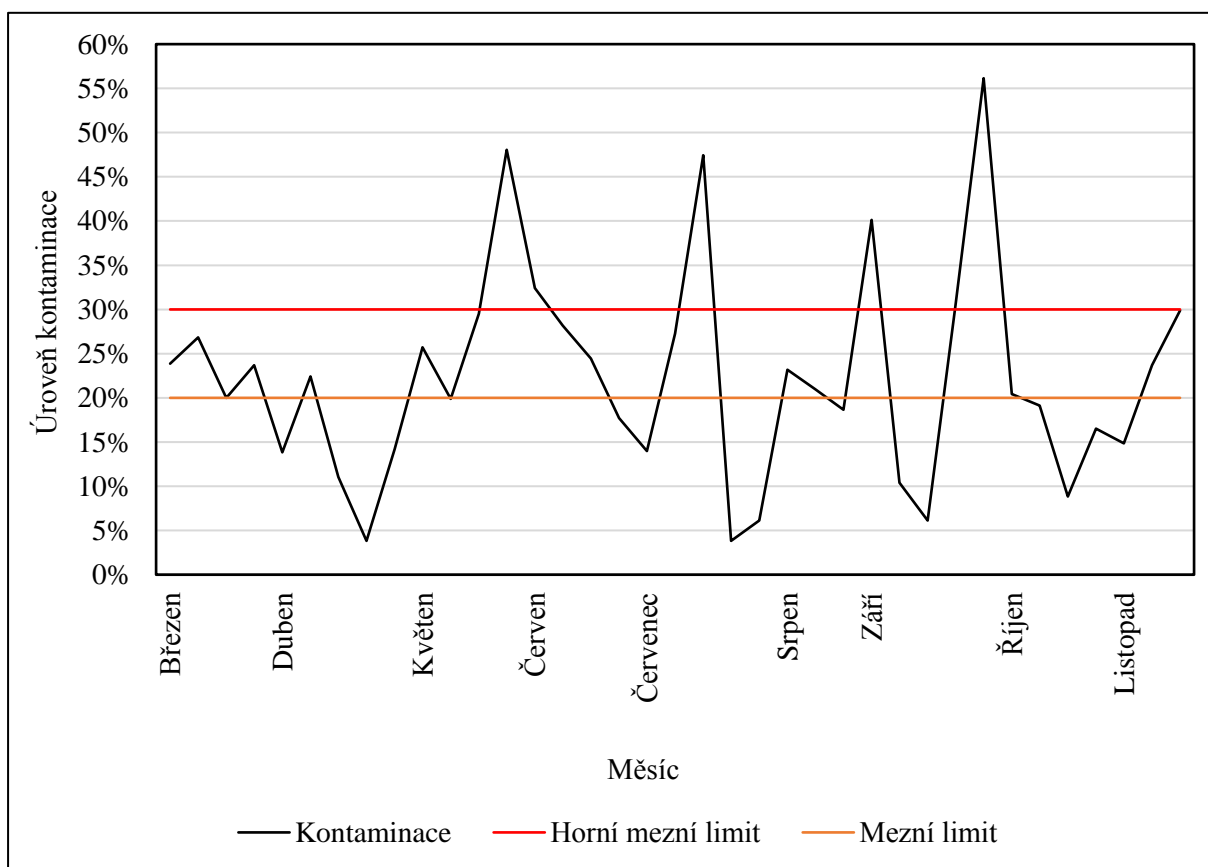
Hypotézou předpokládaný korelační vztah mezi proměnnými (počet hodin od sanitace, počet pěnování nebo počet hodin od posledního pěnování ve vztahu k výskytu mikroorganismům a úrovně kontaminace) zjištěn nebyl. Nebyl zjištěn ani statisticky významný vztah mezi teplotou, rosným bodem, vlhkostí a kontaminací.

Tabulka 4 Korelace mezi proměnnými

	Úroveň kontaminace (%)	Kultivace 24 h	Kultivace 48 h	Kultivace 72 h	Bakterie	Kvasinky	Plísně	Počet hod. od sanitace	Počet pěnování mezi sanitací a odběrem	Počet h od posledního pěnování	D-Rosný bod	D-Vlhkost %	D-Teplota na stáčírně
Úroveň kontaminace (%)	1,00												
Kultivace 24 h	0,07	1,00											
Kultivace 48 h	0,33	-0,07	1,00										
Kultivace 72 h	0,02	0,05	-0,15	1,00									
Bakterie	0,31	0,18	0,72	0,49	1,00								
Kvasinky	0,19	0,07	0,30	0,41	0,53	1,00							
Plísně	0,08	-0,01	0,08	-0,01	0,06	-0,01	1,00						
Počet hod. od sanitace	-0,02	-0,02	0,02	-0,03	-0,01	0,14	-0,03	1,00					
Počet pěn. mezi san. a odběrem	0,40	-0,08	0,21	-0,05	0,13	0,12	0,08	0,43	1,00				
Počet h od posledního pěnování	-0,13	0,00	-0,04	-0,01	-0,05	0,07	-0,03	0,66	0,06	1,00			
D-Rosný bod	0,06	-0,02	-0,01	0,06	0,04	0,12	0,02	0,05	0,22	-0,30	1,00		
D-Vlhkost %	0,16	-0,07	0,10	-0,02	0,06	0,09	0,02	0,56	0,50	0,15	0,54	1,00	
D-Teplota na stáčírně	-0,05	0,03	-0,06	0,04	-0,01	0,03	0,00	-0,43	-0,20	-0,47	0,71	-0,15	1,00

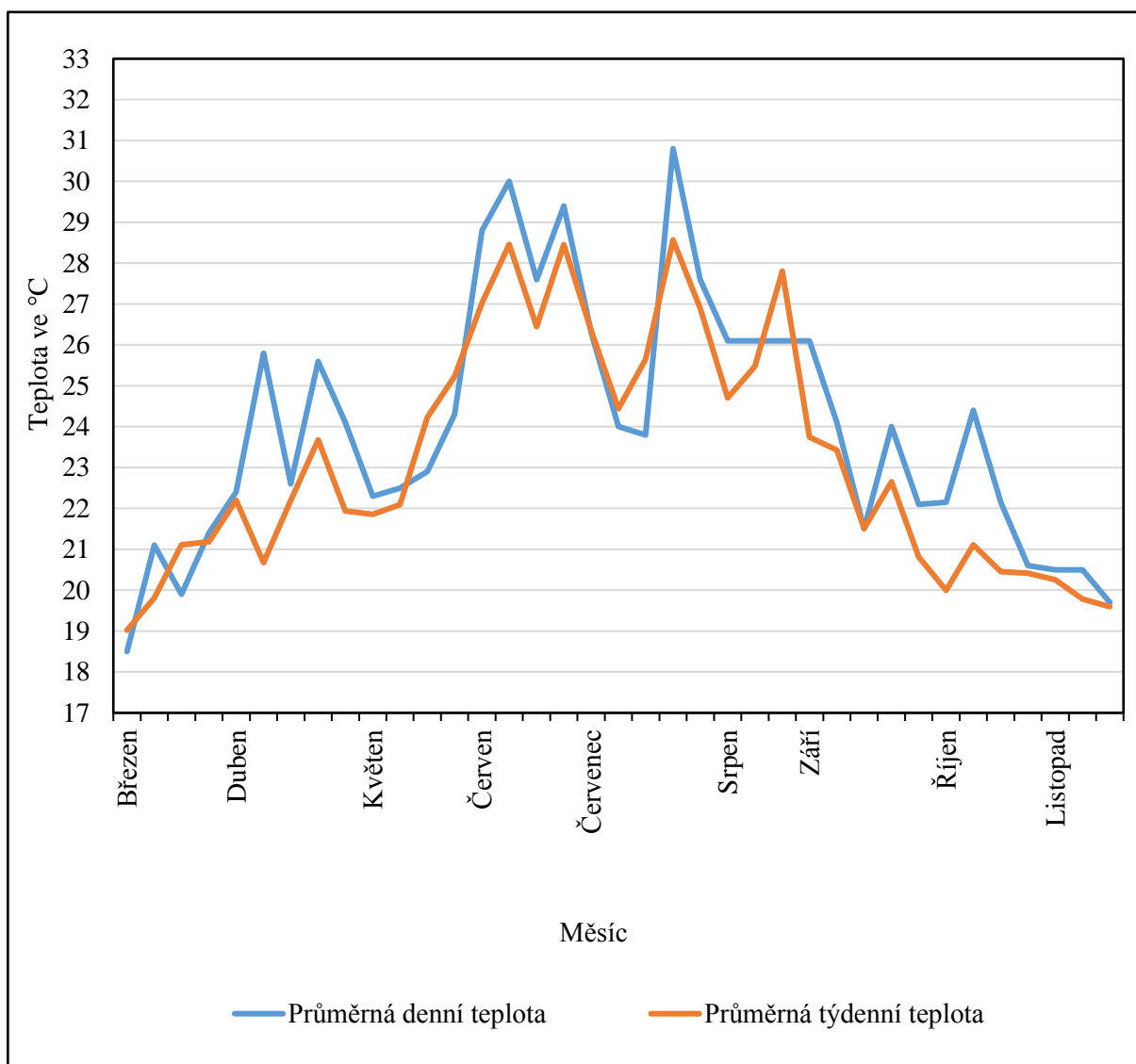
Na **Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.** je zobrazen vývoj úrovně kontaminace v procentech. Při výpočtu procent byla zohledněna i váha daného vzorkovacího místa (přímý nebo nepřímý kontakt s pivem) a doba kultivace při zaznamenání pozitivního výsledku. Nepřímá místa, např. talířky a dopravníky, měla váhu (0,35). Přímá místa, která přichází do kontaktu s pivem např. plnicí ventily a jehly, měla váhu (0,65). Pozitivní vzorek do 24 h měl váhu 1, do 48 h, 0,875 a do 72 h 0,625, protože rychlost barevné reakce je přímo úměrná počtu mikroorganismů ve vzorku. Pomocí těchto vah pro daná místa a dobu kultivace bylo zohledněno riziko závažnosti daného místa. Např. pokud by se vzorek z plnicích jehel (přímé místo) zbarvil do 24 h, měla by jeho hodnota při výpočtu nejvyšší váhu. Limity byly nastaveny dle pokynů výrobce kultivačního média. Horní mezní limit byl 30 %. Mezní limit, který upozorňuje na možné riziko, byl mezi 20 % a 30 % a pod 20 % pozitivních vzorků se sada brala jako bezpečná, bez rizika sekundární kontaminace produktu.

Úroveň kontaminace, která je bezpečná ($\leq 20\%$) se vyskytovala v 43 % všech případů. Nad mezním limitem (20–30 %) se vyskytovalo 41 % případů. V průběhu letního období (květen–září) jsou na grafu vidět výkyvy, které přesáhly horní mezní limit v 5 případech z celkových 6, což odpovídá 16 % případů nad 30 %.



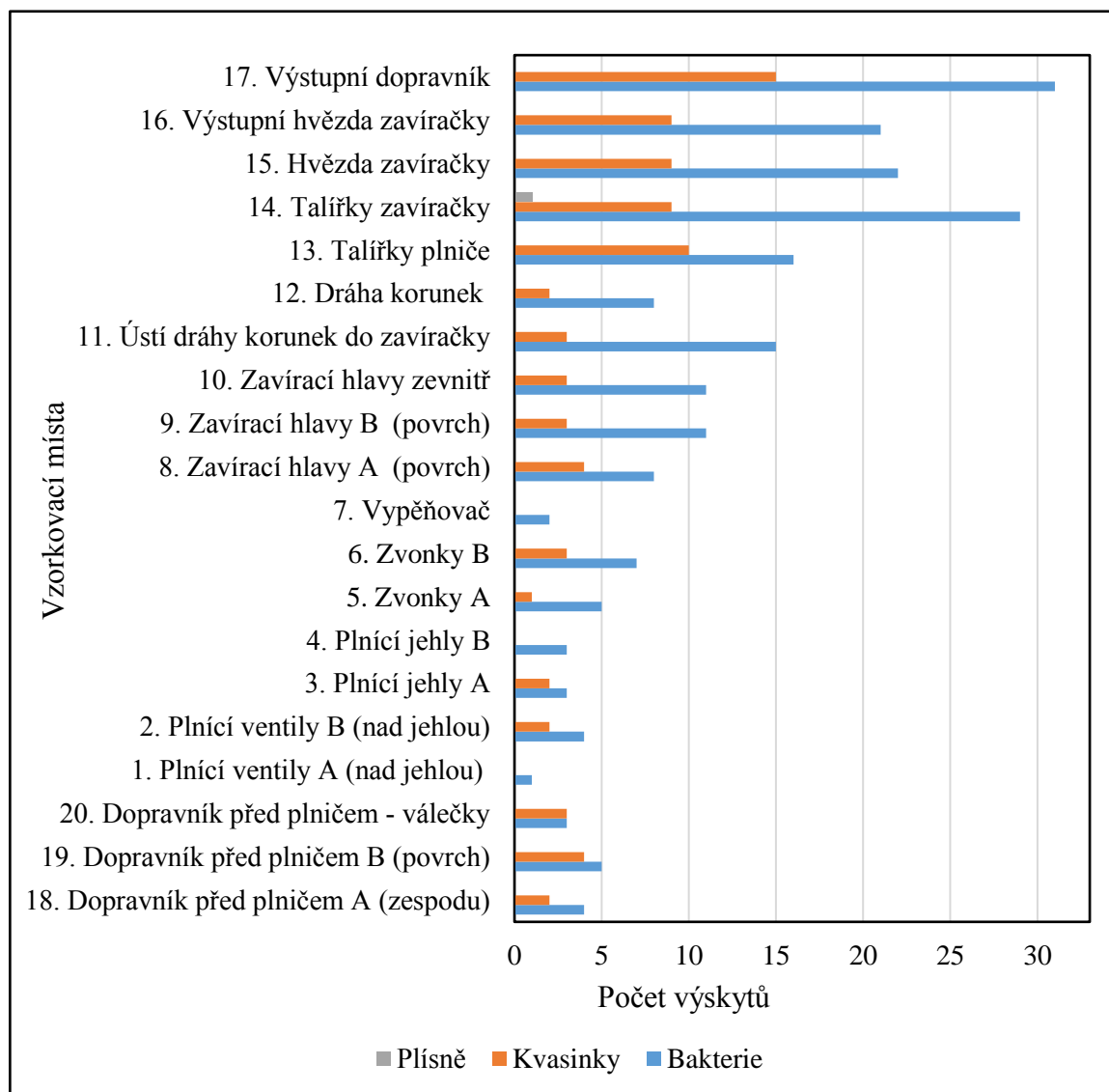
Graf 1 Vývoj úrovně kontaminace v daných týdnech

Ve stejném období (květen–září) došlo k růstu teplot v hale, který odpovídá i růstu kontaminace nad 30 % z předchozího grafu. Data ovšem nejsou statisticky průkazná, protože nebyl zjištěn korelační vztah mezi proměnnými. Celý vývoj v daných týdnech je zobrazen na **Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.** Dle grafického zobrazení křivek je vidět, že denní vývoj odpovídá průměrnému vývoji teplot v týdnu. Denní průměr teplot byl 23,99 °C a týdenní průměr byl 23,22 °C. Průměr teplot v období (květen–září) byl 25,54 °C denní a 25,04 °C týdenní. Maximální denní teplota byla 30,8 °C v týdnu od 22. července a maximální týdenní teplota byla 28,57 °C ve stejném týdnu. V tomto týdnu byla kontaminace nejnižší, pouze 4 %, ale předchozí týden dosahovala signifikantních 47 %.



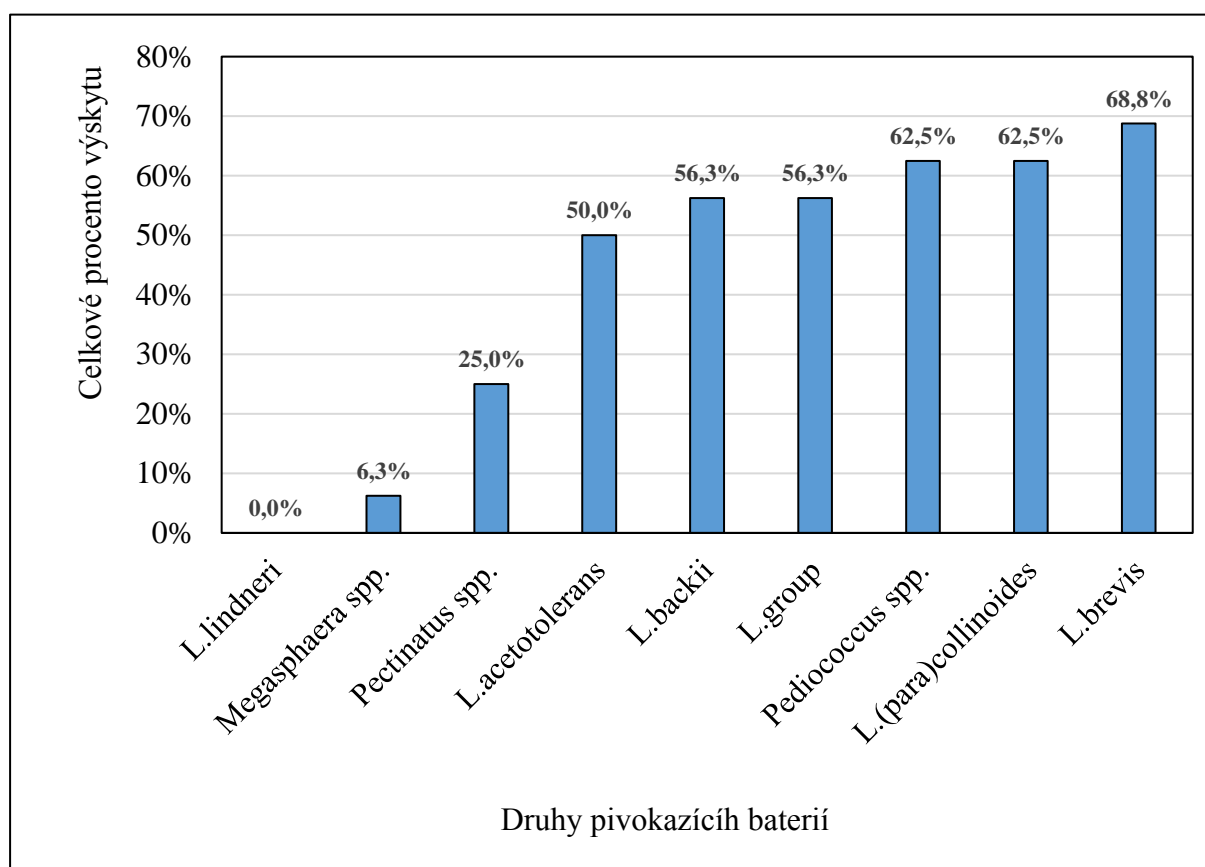
Graf 2 Vývoj teplot v hale

Výskyt mikroorganismů na jednotlivých vzorkovacích místech zobrazuje **Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.** Každý pozitivní vzorek byl mikroskopován. Z mikroskopického obrazu byl stanoven výskyt bakterií, kvasinek či plísní. Nejčastější skupinou byly bakterie. Kvasinky se vyskytovaly vždy v přítomnosti bakterií. Na přímých místech (pozice 1–12) bylo celkem 34 % pozitivních případů a na nepřímých místech (pozice 13–20) bylo zbývajících 66 %. Z grafu vyplývá, že kontaminace roste postupně s průběhem plnění. Před vypěněním lahve je kontaminace relativně nízká do 10 případů a po naplnění a vypěnění je vidět lineární růst až k poslednímu místu. Poslední vzorkovací místo (výstupní dopravník) bylo zároveň místo s nejvyšším počtem výskytu mikroorganismů. Z grafu tedy vyplývá, že nejrizikovějším přímým místem z hlediska sekundární kontaminace produktu je závěrka.



Graf 3 Výskyt mikroorganismů na jednotlivých vzorkovacích místech

Druhové zastoupení pivo kazících bakterií v biofilmu bylo testováno na 16 pozitivních vzorcích pomocí RT–PCR. Kvalitativní výsledky přítomnosti či nepřítomnosti jednotlivých druhů byly zpracovány do jednoduchého grafu viz **Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.** Z celkových 16 případů se nejčastěji vyskytoval *L. brevis* (68,8 %), byl přítomen v 11 vzorcích. Následně *L. (para)collinoides* (62,5 %) a *Pediococcus* spp. (62,5 %), *L. group* (56,3 %) neboli (*L. casei*, *L. paracasei*, *L. coryniformis*, *L. rossiae*, *L. parabuchneri*, *L. perolens* a *L. plantarum*, *L. backii* (56,3 %), *L. acetotolerans* (50,0 %), *Pectinatus* spp. (25 %), *Megasphaera* spp. (6,3 %), *L. lindneri* se nevyskytoval.



Graf 4 Druhové zastoupení pivo kazících bakterií v biofilmu

6 Diskuze

V dnešní moderní době jsou na potraviny kladeny různé legislativní požadavky od druhu obalů až po složení a značení jednotlivých výrobků. Hlavním a nejdůležitějším kritériem je a vždy bude zdravotní nezávadnost. Tento požadavek musí být splněn u všech potravin uváděných na trh. Zároveň je to hlavní cíl potravinové legislativy České republiky i legislativy Evropské unie. Pro zajištění zdravotní nezávadnosti na celém trhu jsou zavedeny různé preventivní postupy, jako je např. systém analýzy kritických bodů HACCP (Hazard Critical Control Points), správná výrobní a hygienická praxe (Parlament České republiky 1997).

Z tohoto důvodu se řízení rizik mikrobiální kontaminace stalo jedním z hlavních předmětů kontroly kvality v potravinářských provozech. Rozsáhlá bakteriální kontaminace v pivovaru by neměla být život ohrožující, protože pivo je charakteristické médium, ve kterém bakterie způsobující alimentární onemocnění nerostou (Storgårds et al. 2006b). Avšak některé druhy jako např. *Bacillus cereus* lze z piva alespoň izolovat. V zajímavé brazilské studii z celkových 163 vzorků nealkoholických piv vědci izolovali 260 sporotvorných bakterií. Nejpravděpodobnějším zdrojem byly použité suroviny (slad, voda nebo surogáty). Pouze 5 % bakterií obsahovalo geny *horA* a *horC*, ve kterých je kódovaná schopnost kazit pivo. V následujícím testu nebyla tato schopnost u vybraných izolátů potvrzena (Munford et al. 2017). V pivu se pomnožují a kazí ho tzv. pivo kazící bakterie, mezi které se řadí především *Lactobacillus* spp., *Pediococcus* spp., *Pectinatus* spp., a *Megasphaera* spp. (Back 2005). Bakteriálně zkažené pivo je charakteristické mléčným zákalem a řadou senzoricky nežádoucích pachů a chutí, jako např. máselné aroma způsobené vyšším množstvím diacetylu (Sakamoto & Konings 2003).

Primární kontaminace pochází z použitých surovin, výrobních zařízení, CKT tanků či z kontaminované propagace kvasnic. Mikrobiální kontaminace pocházející z výchozích surovin je zahubena již během výroby mladiny při vystírání a chmelovaru. Rizikovějším technologickým krokem na mikrobiální napadení je kvašení mladiny, kdy dochází k pomnožování pivovarských kvasinek. Zvrhlé kvašení celé várky je silně nežádoucí a z tohoto důvodu dochází k pravidelným rozborům a kontrole kvašeného díla. Případná nežádoucí kontaminace vzniklá během kvašení bývá utlumena následujícími kroky, jako je filtrace a pasterace. Díky existenci těchto regulačních kroků nebývá primární kontaminace v určité míře natolik závažná oproti sekundární kontaminaci (Storgårds 2000; Vaughan et al. 2005). Z pohledu Backa (1997) je mnohem rizikovější sekundární kontaminace probíhající ve stáčekci hale, která způsobuje až 50 % případů mikrobiologicky znehodnoceného piva. Při testování

80 kusů hotových piv z 19 minipivovarů, jež nebyly pasterované, dosahovala úroveň kontaminace pivo kazícími bakteriemi až 30 % (Menz et al. 2010). Možnou sekundární kontaminací se zabývala i tato diplomová práce. Konkrétně byla zaměřena na úroveň hygieny plnicí lahvové linky z pohledu tvorby biofilmu na površích výrobního zařízení, protože biofilm jakožto konsorcium mikroorganismů je mnohem odolnější a nebezpečnější, než samotné planktonické buňky (Kubota et al. 2008). Analytické rozbory piva lze běžně změřit v provozní laboratoři do několika hodin. S podobnou rychlostí se u biologické kontroly běžně bohužel nesetkáme. Klasické kultivační metody dokážou první kolonie kvasinek odhalit po 48 h. Grampozitivní mléčné bakterie, které představují riziko mikrobiálního kažení, jsou na půdách detekovatelné po 5–7 dnech (Hollerová & Kubizniaková 2001).

V této práci bylo pro detekci biofilmu na stáček lince v pivovaru použito speciálně vyvinuté kultivační médium NBB-B-am, které slouží k detekci indikátorových bakterií. Vyhodnocení úrovně kontaminace linky probíhalo po 3 dnech. Jedná se o metodu retrospektivní, na kterou nelze v kritický moment v průběhu stáčení dostatečně rychle reagovat. Linka byla následně v provozu dalších 72 h a mezitím už proběhlo několik sad čištění a plnění. Nelze tedy provádět okamžitá opatření. Je všeobecně známo, že růst bakterií a tvorba biofilmu je převážně závislá na dostupnosti živin, prostředí, teplotě a vlhkosti. Rosný bod, teplota i vlhkost jsou velice jednoduše fyzikálně měřitelné parametry vnějšího prostředí. Z výše zmíněných důvodů byla sestavena hypotéza, která měla potvrdit tento vztah a umožnit tak rychlejší předvídatelnost hygieny plnění na základě okamžitě měřitelných parametrů frekvence čištění, vlhkosti, teploty a případně i rosného bodu. S hypotézou, že letní období ovlivňuje perzistenci pivo kazících bakterií v hale, souhlasí i Back (1994). S vlivem vnějšího prostředí stáček haly na výskyt mikroorganismů a tím pádem i se zvýšeným rizikem sekundární kontaminace souhlasí i Timke et al (2005) a Maifreni et al (2015). Výsledky této práce však nebyly dostatečně statisticky průkazné a nebyl prokázán vztah mezi vybranými vnějšími podmínkami (vlhkost, teplota, frekvence pěnování...) a úrovní kontaminace. Z grafů je však patrné, že vysoké teploty v hale v letním období květen až září podpořily vývoj biofilmu. V tomto období se vyskytovalo 5 případů z celkových 6, kdy úroveň kontaminace přesáhla signifikantních 30 %. Pravděpodobně jedním z důvodů, proč nevyšlo statistické vyhodnocení, byl nevhodně zvolený poměr výsledků kultivace k naměřeným vnějším podmínkám v hale. Hypotéza nebyla prokázána.

Rychlou metodou detekce bakteriálního biofilmu kontaminujícího plnicí zařízení v pivovaru se pokoušeli vyvinout i vědci z Brna. Konkrétně se zabývali hmotnostní

spektrometrií s laserovou desorpcí a ionizací za účasti matrice s průletovým analyzátozem ve zkratce MALDI–TOF MS. Nejdříve rozšířili databázi o 58 čistých izolátů a následně otestovali 4 metody přímé detekce izolovaného biofilmu. Získaná spektra se ovšem neshodovala s databází (Vávrová et al. 2014). Podobné studie zaměřené na tuto metodu provedli i Kern et al. (2014) a Wieme et al. (2014).

Rychlou metodou stanovení pivo kazících bakterií, která by byla pro komerční pivovary reálná a v praxi použitelná, je analýza pomocí PCR. V této práci byla využita RT–PCR, protože se jedná o relativně rychlou, zhruba čtyřhodinovou analýzu, avšak zároveň se jedná o finančně náročnější metodu detekce. Z tohoto důvodu byla v práci využita jako doplňková analýza pro dokreslení představy o složení biofilmu.

Monitoringem a složením bakteriálních biofilmů na stáčecí lince minipivovaru se zabývali i vědci z Itálie. Zjistili, že biofilmy v tomto prostředí mají vysoký stupeň mikrobiální diverzity a jsou potenciálně rizikové, protože obsahují i pivo kazící bakterie. Navíc došli ke zjištění, že zralý biofilm nebyl dezinfekčním prostředkem na nerezové oceli dostatečně inaktivován (Maifreni et al. 2015).

Uspokojivou kvalitu čištění v České republice potvrzuje i čtyřletá studie, která byla provedena Výzkumným ústavem pivovarským a sladařským v 16 pivovarech. Postupně odebírali vzorky z různých fází výroby. V závěru shrnují, že hygiena pivovarů je dobrá a nejčastějším druhem mléčné bakterie byl *L. brevis* (Hollerová & Kubizniaková 2001). V Čínské studii byl zastoupen rod *Lactobacillus* v 67,8 % (Zheng et al. 2018). Ve studii zkoumající hotová piva z minipivovarů byl taktéž nejčastějším druhem *L. brevis* (Menz et al. 2010). S výsledkem se shoduje i tento experiment, kdy se pomocí RT–PCR podařilo zjistit přítomnost *L. brevis* v 68,8 % případů analyzovaných vzorků. O trochu větší zastoupení naměřili němečtí vědci v bakteriálních izolátech z německých piv, kde dominoval v 75 % (Riedl et al. 2019). V rozsáhlé sedmileté studii byl taktéž nejčastějším druhem bakterie a to s 41,9 % (Schneiderbanger et al. 2018).

Tato rychlá metoda založená na amplifikaci genetické informace se využívá především v případech, pokud chceme detekovat striktně anaerobní bakterie, obzvláště rody *Pectinatus* a *Megasphaera*, které jsou obligátně pivo kazící. Kvůli jejich metabolismu jsou pomocí klasických filtračních a kultivačních metod prakticky nedetekovatelné. V případě stěru z povrchu je jejich viabilita limitována kontaktem s kyslíkem při samotném odběru vzorků. Výskyt striktních anaerobů v pivu se zvyšuje se stále se zlepšující technikou plnění, jejímž cílem je především snížit obsah kyslíku na minimum (Matoulková 2008). V rozsáhlé sedmileté

studii se díky RT–PCR podařilo identifikovat striktně anaerobní rody, jež se vyskytovaly v signifikantních 95 % případech jako sekundární kontaminanty hotového piva, konkrétně spodně kvašených piv (Schneiderbanger et al. 2018). V Anglické studii bylo analyzováno 117 vzorků z různých částí výroby. Rod *Pectinatus* se vyskytoval v 6 vzorcích a *Megasphaera* ve 3. Nejčtenější zastoupení měl rod *Lactobacillus* s celkem 34 pozitivními vzorky (Paradh et al. 2011). V této diplomové práci se taktéž díky RT–PCR podařilo stanovit striktní anaeroby, konkrétně ze vzorků stěrů z povrchů plnicího lahvového zařízení. K analýze byly vybrány vzorky, které se jeví jako nejvíce kontaminované dle stupně zakalení, zápachu či rychlosti zbarvení média. Z celkových vybraných 16 vzorků se *Pectinatus* spp. vyskytoval v 25 % a *Megasphaera* spp. v 6,3 % případech. Tato čísla vypovídají o delší akumulaci biofilmu na výrobním zařízení, jelikož tyto striktní bakterie jsou schopny přežít pouze v pokročilých fázích, kdy je ve středu biofilmu díky ostatním bakteriím vytvořeno anaerobní prostředí. Adheze striktních anaerobů se zabývala studie *in vitro*, která potvrdila, že tyto bakterie jsou běžnou součástí pivovarů a jejich perzistence je velice běžná. Po sanitaci navrhuji využití oplachů alkalickou vodou, jelikož zásadité pH mělo signifikantní vliv na jejich přilnutí k povrchu (Bittner et al. 2016).

Cílem této diplomové práce bylo optimalizovat režim pěnování na stáčecí lince pivovaru tak, aby byla zachována bezpečná provozní hygiena linky, ale zároveň aby nedocházelo k zbytečnému plýtvání chemikáliemi, vodou, energiemi a lidskou pracovní silou. Pěnování je součástí automatického CIP čištění. Výsledky ohledně úrovně kontaminace v této práci byly uspokojivé, protože 43 % výsledků bylo pod mezním limitem, 41 % bylo nad mezním limitem, ale stále ne v kritické oblasti. Bylo zaznamenáno pouze 6 případů nad mezním limitem 30 % kontaminace a 5 z nich v letním období květen až září. Limity byly stanoveny na základě doporučení od výrobce. Každý provoz je však jiný a z určitého množství dat v časech lze tyto limity upravit a aplikovat na daný provoz. Naměřené výsledky ukazují na uspokojivou kvalitu pěnování a zvládnutí hygieny plnění. Navíc nebyla v daném období zaznamenána žádná reklamace na zkažené lahvové pivo. Dobrou hygienu potvrzují i výsledky finálních produktů, které se pravidelně mikrobiologicky kontrolují. Stále je zde ale velký potenciál pro zlepšení, převážně tedy v letním období. Pěnování probíhá pravidelně po 8 h v zimním období a v letním období po 6 h. Z výše uvedených výsledků by bylo vhodné zvážit doplňkovou kontrolu v rizikovém letním období. Tou by mohl být odběr pomocí ATP stěrů v pravidelných intervalech. Tyto odběry by nám v kritickém období mohly poskytnout rychlou zpětnou vazbu

a umožnit tak reagovat v řádu několika hodin. Studie zabývající se pouze pěnáním a tvorbou biofilmu nebyly nalezeny. Je tedy nutné se na čištění a hygienu plnění dívat komplexněji.

Celkové výsledky této práce pravděpodobně ovlivnila i protilehlá linka K36, která se nacházela přímo naproti zkoumané lince K60. Linky nepracují ve stejném režimu, je tedy možné, že pokud docházelo v průběhu plnění linky K60 zároveň k úklidu či sanitaci na lince K36, docházelo tak k náhodným ovlivněním vnějších podmínek. Dalším faktorem, který mohl ovlivnit průběh výsledků, je seřizenost vypěnování, provoz tunelové pasterace, tlakové čištění podlah a lidská práce. Haikara a Helander (2006) uvádí, že vnější podmínky v hale, např. i cirkulace vzduchu nebo nesanitované dopravníkové pásy, mohou být příčinou rychlé rekontaminace plniče. Toto tvrzení uvádí ve své práci i Matoulková et al (2012) a Zheng et al (2018). Rozdílnost ve složení biofilmu mezi plnicími linkami dvou různých pivovarů potvrzuje i studie od Timke et al. (2005b). Toto zjištění potvrzuje, že každý pivovar má vlivem vnějších podmínek na stáčírně svoje jedinečné zastoupení bakteriálních druhů (Zheng et al. 2018).

Rychlostí rekontaminace linky se zabývala finská studie, která testovala nově instalované sterilní části plniče z nerezové oceli a rychlost růstu biofilmu. Studie probíhala celkem 8 týdnů ve dvou pivovarech na 8 lahvových a na 3 plechovkových plničích. Výsledky ukazují, že primární fáze biofilmu se začala tvořit na nově instalovaných sterilních částech mezi 2–12 h od začátku produkce. Zajímavým zjištěním bylo, že plechovkové plniče vykazovaly signifikantně menší náchylnost k tvorbě biofilmů, a bylo doporučeno redukovat množství horizontálních ploch v konstrukci plniče pro menší riziko akumulace kontaminace během plnění (Storgårds et al. 2006b). Ve studii analyzující primární kolonizátory plniče po provedeném čištění se až v 71 % vyskytoval *Acinetobacter* spp., a dokonce vykazoval pevnější adhezi na nerezovou ocel než většina ostatních mikroorganismů (Lipski 2005). Dalším možným druhem podílejícím se na rychlé rekolonizaci vyčištěných povrchů plnicí linky je *Chryseobacterium* spp. Na tuto bakterii se ve svém výzkumu zaměřil Herzog et al (2008). Primárními kolonizátory jsou tedy octové bakterie, *Acinetobacter* či *Chryseobacterium* spp. Jedná se však o aerobní bakterie, které v této práci zkoumány nebyly.

V experimentu se v analyzovaných vzorcích vedle bakterií vyskytovaly i kvasinky. Ve stočeném filtrovaném a pasterovaném pivu se jako kontaminanty považují všechny druhy kvasinek, jak divoké, tak i kulturní pivovarské kvasinky. Mezi výskytem bakterií a kvasinek byla zjištěna korelace (0,53), která udává střední závislost mezi proměnnými. Ve všech pozitivních případech se kvasinky vyskytovaly vždy v přítomnosti bakterií. Tato skutečnost je pravděpodobně dána tím, že kultivační médium NBB-B-am je vyrobeno primárně

pro detekci indikátorů pivovarského biofilmu, kterým nejčastěji bývají primární adherující bakterie. Přítomnost divokých kvasinek v biofilmech izolovaných ze dvou pivovarů prokázala studie od Timke et al. (2008). Výsledky ukázaly přítomnost převážně *Saccharomyces cerevisiae* (46 %) a dále pak *Candida* spp. (24 %). Tyto kvasinky v přítomnosti pivo kazících bakterií izoloval z biofilmu i Storgårds et al. (2006b).

V rámci zlepšení efektivity čištění a omezení adheze bakterií na povrchy se aktuální výzkum zabývá využitím nanočástic a nanomateriálů. Několik studií se zaměřilo na tyto částice, které by mohly sloužit formou ochranné vrstvičky na nerezové oceli výrobních zařízení. Hypotéza udává, že tato vrstva bude schopna snížit rozvoj bakteriální kontaminace a tím snížit náklady na zdroje, chemikálie, čas a pracovní sílu při čištění zařízení (Fujishima et al. 2008). Nadějně byly laboratorní studie využívající oxid titaničitý s různou kombinací dalších sloučenin (Sunada et al. 2003; Allion et al. 2007; Ratova et al. 2013; Naik & Kowshik 2014). Tyto metody se snažil aplikovat i Priha et al. (2015) v *in situ* studii v pivovaru na jedné lahvové a jedné plechovkové lince. Jejich výsledky však nepotvrdily úspěšné výsledky z *in vitro* studií.

Stáčecí hala v pivovarském provozu nebude nikdy sterilním prostředím. Proces plnění lahví je a bude vždy rizikový, protože rychle rotující dopravníky, vypěňování a oplach lahví umožňují aerosolaci, díky které se usnadňuje pohyb bakterií po celém provozu. Vnější podmínky jsou bohužel vlivem nepravidelných a náhodných jevů (neplánovaná zastavení, porucha, mimořádné čištění atd.) nepředvídatelné. Do tohoto procesu značně zasahuje i lidská práce, proto by se mělo dbát převážně na prevenci a na striktní dodržování provozních a hygienických pravidel. Mělo by se dbát i na pravidelné školení a edukaci zaměstnanců. Převážně pak v letním období, kdy dochází k nárůstu teplot, které se udržují po delší dobu na optimální teplotě pro růst pivo kazících bakterií. Do budoucna by bylo lepší se zaměřit na proces čištění komplexněji, tedy nejen na pěňování, což je pouze jedna z částí. Z výše zmíněných údajů vyplývá, že rekontaminace výrobního zařízení je velice rychlý děj, který je závislý na hygieně a postupech v celé stáčecí hale.

7 Závěr

V této diplomové práci byla nalezena korelace mezi výskytem bakterií a kvasinek v jednom vzorku s tím, že množství pozitivních vzorků bylo nejvyšší na posledním vzorkovacím místě na výstupním dopravníku. To odpovídá faktu, že kontaminace jednotlivých částí plniče kopírovala technologii plnění, kdy za vypěněním lahve docházelo k nárůstu pozitivních vzorků. Bylo zjištěno, že nejrizikovější částí plniče je zavíračka, která je označena jako místo, které stále ještě přichází do kontaktu s pivem.

Detekce striktních anaerobů je v provozu kultivačně náročná, a pokud se chceme zaměřit na konkrétní druhy, bude nejvýhodnější zvolit RT-PCR, která tyto striktní anaeroby ve vybraných vzorkách detekovala. Úroveň kontaminace v pivovaru byla dostačující, není tedy nutné měnit režimy pěnování, avšak proměnlivé a nepředvídatelné vnější vlivy mohou urychlovat rekontaminaci plniče hlavně v letním období. Přestože se v letních měsících vyskytly určité výkyvy, nebyla zaznamenána žádná reklamace na zkažené lahvové pivo. Navíc je každý finální výrobek mikrobiologicky kontrolován.

Pouze z monitoringu vnějších vlivů v různých ročních obdobích, jako je vlhkost, teplota, rosný bod, frekvence pěnování, počet hodin od posledního pěnování atd., nelze předpovídat vývoj úrovně kontaminace. Hypotéza nebyla prokázána. Stáčecí hala je totiž dynamicky se měnící prostředí, které ovlivňuje velkou měrou náhodné nepředvídatelné vlivy.

8 Literatura

Abraham EP, Chain E. 1940. An Enzyme from Bacteria able to Destroy Penicillin. *Nature* **146**:837.

Alberts B. 1998. *Základy buněčné biologie: úvod do molekulární biologie buňky*. Espero, Ústí nad Labem.

Allion A, Merlot M, Boulangé-Petermann L, Archambeau C, Choquet P, Damasse JM. 2007. Thin photocatalytic TiO₂ coatings: Impact on bioadhesion and cell viability. *Plasma Processes and Polymers* **4**:374–379.

Amato SM, Fazen CH, Henry TC, Mok WWK, Orman MA, Sandvik EL, Volzing KG, Brynildsen MP. 2014. The role of metabolism in bacterial persistence. *Frontiers in Microbiology* **5**:1–9.

Arampatzi SI, Giannoglou G, Diza E. 2011. Biofilm formation: A complicated microbiological process. *Aristotle University Medical Journal* **38**:21–29.

Back W. 1994. *Farbatlas und Handbuch der Getränkebiologie / Werner Back ; Teil 1: Kultivierung/Methoden, Brauerei, Winzerei*. Carl, Getränke-Fachver, Nürnberg.

Back W. 1997. Technical and technological prerequisites for “cold sterile” bottling. *Brauwelt International*:192–201.

Back W. 2005. *Colour Atlas and Handbook of Beverage Biology*. Fachverlag Hans Carl, Nürnberg (Germany).

Barnett JA. 2004. A history of research on yeasts 8: Taxonomy. *Yeast* **21**:1141–1193.

Bartovská L, Šišková M. 2005. *Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav*. VŠCHT, Praha.

Basařová G, Šavel J, Basař P, Lejsek T. 2010. *Pivovarství: Teorie a praxe výroby piva*. VŠCHT, Praha.

Belessi CEA, Gounadaki AS, Psomas AN, Skandamis PN. 2011. Efficiency of different sanitation methods on *Listeria monocytogenes* biofilms formed under various environmental conditions. *International Journal of Food Microbiology* **145**:S46–S52. Elsevier B.V.

Bittner M, de Souza AC, Brozova M, Matoulkova D, Dias DR, Branyik T. 2016. Adhesion of anaerobic beer spoilage bacteria *Megasphaera cerevisiae* and *Pectinatus frisingensis* to stainless steel. *LWT - Food Science and Technology* **70**:148–154. Elsevier Ltd.

Boone DR, Castenholz RW, Garrity GM. 2009. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Springer, New York.

- Boulton Ch. 2013. *Encyclopaedia of Brewing*. Wiley-Blackwell, Hoboken.
- Braun F, Hildebrand N, Wilkinson S, Back W, Krottenthaler M, Becker T. 2011. Large-scale study on beer filtration with combined filter aid additions to cellulose fibres. *Journal of the Institute of Brewing* **117**:314–328.
- Briggs DE, Boulton CA, Brookes PA, Stevens R. 2004. *Brewing Science and practice* Woodhead P. Woodhead Publishing Limited, Cambridge.
- Buzrul S. 2007. A suitable model of microbial survival curves for beer pasteurization. *LWT - Food Science and Technology* **40**:1330–1336.
- Byung Hong K, Gadd GM. 2008. *Bacterial physiology and metabolism*. Cambridge University Press, New York.
- Čejka P, Čepička J, Havlová P, Hons S, Kosař K, Kubíček J, Pech P, Procházka S, Ťopka P, Novotný R. 2000. *Technologie výroby sladu a piva*. Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, a. s., Praha.
- Chaban B, Deneer H, Dowgiert T, Hymers J, Ziola B. 2005. The flagellin gene and protein from the brewing spoilage bacteria *Pectinatus cerevisiophilus* and *Pectinatus frisingensis*. *Canadian Journal of Microbiology* **51**:863–874.
- Chmielewski RAN, Frank JF. 2003. Biofilm formation and control in food processing facilities. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **2**:22–32.
- Demnerová K. 2012. Mikrobiologická bezpečnost potravin: Současné strategie pro efektivní kontrolu. *Chemicke Listy* **106**:920–925.
- Devolli A, Kodra M, Shahinasi E, Feta D, Dara F. 2016. Hygienic control in beer bottling and dispensing system. *Journal of Hygienic Engineering and Design* **15**:5–11.
- Dobson CM, Deneer H, Lee S, Hemmingsen S, Glaze S, Ziola B. 2002. Phylogenetic analysis of the genus *Pediococcus*, including *Pediococcus claussenii* sp. nov., a novel lactic acid bacterium isolated from beer. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **52**:2003–2010.
- Döhler GmbH. 2016. NBB®-B-Am Broth Manual. Döhler GmbH, Darmstadt. Available from https://www.doehler.com/fileadmin/Dokumente/EN/dmd_productrange/Doehler-NBB-B-Am_User-manual_EN-DE.pdf.
- Eßlinger HM. 2009. *Handbook of Brewing: Processes, Technology, Markets*. John Wiley & Sons Ltd., Weinheim.
- Fagerlund A, Moretro T, Heir E, Briandet R, Langsrud S, Møretro T, Heir E, Briandet R, Langsruda S. 2017. Cleaning and Disinfection of Biofilms Composed of *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology* **83**:1–21.

- Flemming HC, Wingender J. 2010. The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology* **8**:623–633. Nature Publishing Group.
- Frantík F, Soukupová L. 2004. Pivo, slad, chmel od A do Z : české, moravské a slovenské osobnosti. Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, Praha.
- Fujishima A, Zhang X, Tryk DA. 2008. TiO₂ photocatalysis and related surface phenomena. *Surface Science Reports* **63**:515–582.
- Garcia-Garcia JH, Galán-Wong LJ, Pereyra-Alfárez B, Damas-Buenrostro LC, Pérez E, Carlos Cabada J. 2017. Distribution of lactobacillus and pediococcus in a brewery environment. *Journal of the American Society of Brewing Chemists* **75**:312–317.
- Geissler AJ, Behr J, Von Kamp K, Vogel RF. 2016. Metabolic strategies of beer spoilage lactic acid bacteria in beer. *International Journal of Food Microbiology* **216**:60–68. Elsevier B.V.
- Gillet A, Dupuche MH, Velings N. 2003. Supplementation to the MRS medium for the cultivation of fastidious beer spoilage bacteria. *Monatsschrift fur Brauwissenschaft* **56**:10–14.
- Gutiérrez D, Rodríguez-Rubio L, Martínez B, Rodríguez A, García P. 2016. Bacteriophages as weapons against bacterial biofilms in the food industry. *Frontiers in Microbiology* **7**:1–15.
- Haikara A, Helander I. 2006. Pectinatus , Megasphaera and Zymophilus. *Prokaryotes* **4**:965–981.
- Hebly M, Brickwedde A, Bolat I, Driessen MRM, De Hulster EAF, Van den Broek M, Pronk JT, Geertman JM, Daran JM, Daran-Lapujade P. 2015. *S. cerevisiae* × *S. eubayanus* interspecific hybrid, the best of both worlds and beyond. *FEMS Yeast Research* **15**:1–14.
- Helaine S, Kugelberg E. 2014. Bacterial persisters: Formation, eradication, and experimental systems. *Trends in Microbiology* **22**:417–424. Elsevier Ltd.
- Herzog P, Winkler I, Wolking D, Kämpfer P, Lipski A. 2008. *Chryseobacterium ureilyticum* sp. nov., *chryseobacterium gambrini* sp. nov., *chryseobacterium pallidum* sp. nov. and *chryseobacterium molle* sp. nov., isolated from beer-bottling plants. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **58**:26–33.
- Hill A. 2015. *Brewing Microbiology: Managing Microbes, Ensuring Quality and Valorising Waste*. Page (Hill AE, editor). Woodhead Publishing.
- Hofmann R, Fischer J. 2015. Beer packaging: Microbiological hazards and considerations. Pages 319–334 in A. E. Hill, editor. *Brewing Microbiology: Managing Microbes, Ensuring Quality and Valorising Waste*. Elsevier Ltd, Internet.
- Holah JT. 2013. Cleaning and disinfection practices in food processing. Pages 259–304 in H. L. M. Lelieveld, J. T. Holah, and D. Napper, editors. *Hygiene in Food Processing: Principles and Practice*. Woodhead Publishing Limited, Cambridge.

- Hollerová I, Kubizniaková P. 2001. Monitoring gram positive bacterial contamination in Czech breweries. *Journal of the Institute of Brewing* **107**:355–358.
- Hornsey IS. 2003. *A history of beer and brewing*. Royal Society of Chemistry, Cambridge.
- Horsáková I. 2017. Biofilmy v potravinářství. *Výživa a potraviny* **5**:114–117.
- Janagama HK, Mai T, Han S, Nadala LM, Nadala C, Samadpour M. 2018. Dipstick assay for rapid detection of beer spoilage organisms. *Journal of AOAC International* **101**:1913–1919.
- Juvonen R, Koivula T, Haikara A. 2008. Group-specific PCR-RFLP and real-time PCR methods for detection and tentative discrimination of strictly anaerobic beer-spoilage bacteria of the class Clostridia. *International Journal of Food Microbiology* **125**:162–169.
- Juvonen R, Suihko ML. 2006. *Megasphaera paucivorans* sp. nov., *Megasphaera sueciensis* sp. nov. and *Pectinatus haikarae* sp. nov., isolated from brewery samples, and emended description of the genus *Pectinatus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **56**:695–702.
- Kern CC, Vogel RF, Behr J. 2014. Identification and differentiation of brewery isolates of *Pectinatus* sp. by Matrix-Assisted-Laser Desorption-Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS). *European Food Research and Technology* **238**:875–880.
- Kratochvíle A. 2000. Plnění piva do lahví a plechovek. Pages 306–307 in K. Kosař and S. Procházka, editors. *Technologie výroby sladu a piva*. VÚPS, Praha.
- Kubota H, Senda S, Nomura N, Tokuda H, Uchiyama H. 2008. Biofilm Formation by Lactic Acid Bacteria and Resistance to Environmental Stress. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **106**:381–386.
- Kunová G, Pechačová M, Jaglič Z, Pazlarová J, Roubal P. 2011. Biofilmy a hygiena výroby v mlékárenských provozech. *Mlékařské listy* **127**:19–22.
- Kunze W. 2014. *Technology Brewing and Malting*. VLB Berlin, Berlin.
- Kyselová L, Brányik T. 2015. Quality improvement and fermentation control in beer. Page Advances in Fermented Foods and Beverages: Improving Quality, Technologies and Health Benefits. Elsevier Ltd.
- Landaud S, Latrille E, Corrieu G. 2001. Top pressure and temperature control the fusel alcohol/ester ratio through yeast growth in beer fermentation. *Journal of the Institute of Brewing* **107**:107–117.
- Langsrud S, Moen B, Møretrø T, Løype M, Heir E. 2016. Microbial dynamics in mixed culture biofilms of bacteria surviving sanitation of conveyor belts in salmon-processing plants. *Journal of Applied Microbiology* **120**:366–378.

- Lewis K. 2010. Persister Cells. *Annual Review of Microbiology* **64**:357–372.
- Lipski A. 2005. New focus in combating biofilms: The pioneer organisms on cleaned surfaces. *Page Brau Forum*. German.
- Loeffler D. 2006. Modern brewery sanitation. Pages 308–334 in C. W. Bamforth, editor. *Brewing: New Technologies*. Woodhead Publishing Limited.
- Maifreni M, Frigo F, Bartolomeoli I, Buiatti S, Picon S, Marino M. 2015. Bacterial biofilm as a possible source of contamination in the microbrewery environment. *Food Control* **50**:809–814. Elsevier Ltd.
- Malowicki MG, Shellhammer T. 2005. Isomerization and Degradation Kinetics of Hop (*Humulus lupulus*) Acids in a Model Wort-Boiling System. *Journal of agricultural and food chemistry* **53**:4434–4439.
- Mamvura TA, Iyuke SE, Cluett JD, Paterson AE. 2011. Soil films in the beverage industry: A review. *Journal of the Institute of Brewing* **117**:608–616.
- Matoulková D. 2008. Striktně anaerobní bakterie v pivu a pivovarském provozu. *Kvasný průmysl* **54**.
- Matoulková D, Kosar K, Slabý M, Sigler K. 2012. Occurrence and species distribution of strictly anaerobic bacterium *pectinatus* in brewery bottling halls. *Journal of the American Society of Brewing Chemists* **70**:262–267.
- Matoulková D, Kubizniaková P. 2014. Mikrobiologie pivovarské výroby – Striktně anaerobní bakterie *Megasphaera*, *Pectinatus*, *Selenomonas* a *Zymophilus* a metody jejich detekce. *Kvasný průmysl* **60**:285–294. Praha.
- Matoulková D, Šavel J. 2007. Pivovarství a Taxonomie Pivovarských Kvasinek. *Kvasný Průmysl* **53**:206–214.
- Menz G, Andrighetto C, Lombardi A, Corich V, Aldred P, Vriesekoop F. 2010. Isolation, identification, and characterisation of beer-spoilage lactic acid bacteria from microbrewed beer from Victoria, Australia. *Journal of the Institute of Brewing* **116**:14–22.
- Ministerstvo zemědělství. 2018. Vyhláška č. 248 ze dne 24. října 2018 o požadavcích na nápoje, kvasný ocet a droždí. Pages 4274–4305. In: *Sbírka zákonů České republiky, Česká republika*.
- Moerman F, Holah JT, Steenaard P. 2013. Hygienic practices for equipment maintenance. Pages 384–407 in H. L. M. Lelieveld, J. T. Holah, and N. D., editors. *Hygiene in Food Processing: Principles and Practice*. Woodhead Publishing Limited, Cambridge.
- Munford ARG, Alvarenga VO, Prado-Silva L do, Crucello A, Campagnollo FB, Chaves RD, Oteiza JM, Sant’Ana AS. 2017. Sporeforming bacteria in beer: Occurrence, diversity, presence of hop resistance genes and fate in alcohol-free and lager beers. *Food Control* **81**:126–136.

- Naik K, Kowshik M. 2014. Anti-biofilm efficacy of low temperature processed AgCl-TiO₂ nanocomposite coating. *Materials Science and Engineering C* **34**:62–68.
- NobelPrize.org. 2019. The Nobel Prize in Chemistry 1993. Available from <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/1993/press-release/> (accessed November 4, 2019).
- Paradh AD, Mitchell WJ, Hill AE. 2011. Occurrence of Pectinatus and megasphaera in the major UK breweries. *Journal of the Institute of Brewing* **117**:498–506.
- Parlament České republiky. 1997. Zákon č. 110 ze dne 24. dubna 1997 o potravinách a tabákových výrobcích a o změně a doplnění některých souvisejících zákonů. Pages 2178–2188. In: *Sbírka zákonů České republiky, Česká republika*.
- Pinguli L, Malollari I, Troja R, Manaj H, Dhroso A. 2018. Controlling Beer Filtration Process Through Implementation of Enzymatic and Microbiological Techniques. *The EuroBiotech Journal* **2**:165–170.
- Priest F. 2013. *Brewing Microbiology*. Springer US.
- Priest FG, Campbell I. 1996. *Brewing microbiology*. Chapman & Hall, Edinburgh, UK.
- Priha O et al. 2015. Microbial populations on brewery filling hall surfaces - Progress towards functional coatings. *Food Control* **55**:1–11.
- Quain DE. 2015. Assuring the microbiological quality of draught beer. Page *Brewing Microbiology: Managing Microbes, Ensuring Quality and Valorising Waste*. Elsevier Ltd.
- Ratova M, Kelly PJ, West GT, Iordanova I. 2013. Enhanced properties of magnetron sputtered photocatalytic coatings via transition metal doping. *Surface and Coatings Technology* **228**. Elsevier B.V.
- Řezanka T, Matoulková D, Benada O, Sigler K. 2015. Lipidomics as an important key for the identification of beer-spoilage bacteria. *Letters in Applied Microbiology* **60**:536–543.
- Riedl R, Dünzer N, Michel M, Jacob F, Hutzler M. 2019. Beer enemy number one: genetic diversity, physiology and biofilm formation of *Lactobacillus brevis*. *Journal of the Institute of Brewing* **125**:250–260.
- Rieger F, Novák V, Jirout T. 2005. *Hydromechanické procesy*. ČVUT, Praha.
- Říhová Ambrožová J, Vejmelková D, Čiháková P. 2017. *Technická mikrobiologie a hydrobiologie*. VŠCHT, Praha.
- Rosypal S, Doškař J, Pantůček R, Kailerová J, Relichová J, Růžičková V, Šmarda J, Štěpán J. 2001. *Terminologie molekulární biologie, České odborné termíny, definice a anglické ekvivalenty*. Stanislav Rozsypal, Brno.

Ruml T. 2002. Genové inženýrství. VŠCHT, Praha.

Saik RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. 1988. Primer Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase. *Science* **239**.

Sakamoto K, Konings WN. 2003. Beer spoilage bacteria and hop resistance. *International Journal of Food Microbiology* **89**:105–124.

Schleifer KH, Leuteritz M, Weiss N, Ludwig W, Kirchhof G, Seidel-Rufer H. 1990a. Taxonomic study of anaerobic, gram-negative, rod-shaped bacteria from breweries: Emended description of *Pectinatus cerevisiiphilus* and description of *Pectinatus frisingensis* sp. nov., *Selenomonas lacticifex* sp. nov., *Zymophilus raffinovorans* gen. nov., . *International Journal of Systematic Bacteriology* **40**:19–27.

Schleifer KH, Leuteritz M, Weiss N, Ludwig W, Kirchhof G, Seidel-Rüfer H. 1990b. Emended Description of *Pectinatus cerevisiiphilus* and Description of *Pectinatus frisingensis* sp. nov., *Selenomonas lacticifex* sp. nov., *Zymophilus raffinovorans* gen. International *Journal of Systematic Bacteriology* **40**:19–27.

Schneiderbanger J, Grammer M, Jacob F, Hutzler M. 2018. Statistical evaluation of beer spoilage bacteria by real-time PCR analyses from 2010 to 2016. *Journal of the Institute of Brewing* **124**:173–181.

Sharma M, Anand SK. 2002. Biofilms evaluation as an essential component of HACCP for food/dairy processing industry - A case. *Food Control* **13**:469–477.

Siegrist J, Kohlstock M, Merx K, Vetter K. 2015. Rapid detection and identification of spoilage bacteria in beer. *Page Brewing Microbiology: Managing Microbes, Ensuring Quality and Valorising Waste*. Elsevier Ltd.

Šilhánková L. 2002. Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology. Academia, Praha.

Simões M, Simões LC, Vieira MJ. 2010. A review of current and emergent biofilm control strategies. *LWT - Food Science and Technology* **43**:573–583.

Singh R, Paul D, Jain RK. 2006. Biofilms: implications in bioremediation. *Trends in Microbiology* **14**:389–397.

Stewart GG. 2015. Yeast quality assessment, management and culture maintenance. Pages 11–29 in A. E. Hill, editor. *Brewing Microbiology: Managing Microbes, Ensuring Quality and Valorising Waste*. Springer, Edinburgh.

Stewart GG. 2017. History of Brewing and Distilling Yeast. Pages 11–36 *Brewing and Distilling Yeasts*. Springer, Cham, Berlin Heidelberg, New York.

Stewart GG, Russell I, Anstruther A, editors. 2017. *Handbook of Brewing*. CRC Press, Taylor

& Francis, London.

Storgårds E. 2000. Process hygiene control in beer production and dispensing. Page VTT Publications. Valtion teknillinen tutkimuskeskus, Espoo.

Storgårds E, Haikara A, Juvonen R. 2006a. Brewing control systems: Microbiological analysis. Pages 391–426 in C. W. Bamforth, editor. *Brewing: New Technologies*. Woodhead Publishing Limited, Cambridge.

Storgårds E, Priha O. 2009. Biofilms and brewing. *Biofilms in the Food and Beverage Industries*:432–454.

Storgårds E, Tapani K, Hartwall P, Saleva R, Suihko ML. 2006b. Microbial attachment and biofilm formation in brewery bottling plants. *Journal of the American Society of Brewing Chemists* **64**:8–15.

Suchý O, Chládek L. 2013. Měření bsahu rozpuštěného kyslíku v pivu a možnosti jeho snižování. *Agritech Science* **7**:1–3.

Sunada K, Watanabe T, Hashimoto K. 2003. Bactericidal activity of copper-deposited TiO₂ thin film under weak UV light illumination. *Environmental Science and Technology* **37**:4785–4789.

Suzuki K. 2011. 125th anniversary review: Microbiological instability of beer caused by spoilage bacteria. *Journal of the Institute of Brewing* **117**:131–155.

Suzuki K, Iijima K, Sakamoto K, Saihi M, Yamashita H. 2006. A review of hop resistance in beer spoilage lactic acid bacteria. *Journal of the Institute of Brewing* **112**:173–191.

The Brewers of Europe. 2018. Beer statistics 2018 edition. Page The Brewers of Europe Rue. The Brewers of Europe, Brussels.

Timke M, Wang-lieu NQ, Altendorf K. 2005a. Community Structure and Diversity of Biofilms from a Beer Bottling Plant as Revealed Using 16S rRNA Gene Clone Libraries. *American Society for Microbiology* **71**:6446–6452.

Timke M, Wang-Lieu NQ, Altendorf K, Lipski A. 2005b. Fatty acid analysis and spoilage potential of biofilms from two breweries. *Journal of Applied Microbiology* **99**:1108–1122.

Timke M, Wang-Lieu NQ, Altendorf K, Lipski A. 2008. Identity, beer spoiling and biofilm forming potential of yeasts from beer bottling plant associated biofilms. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology* **93**:151–161.

Van Houdt R, Michiels CW. 2010. Biofilm formation and the food industry, a focus on the bacterial outer surface. *Journal of Applied Microbiology* **109**:1117–1131.

Varga Á, Gáspár I, Juhász R, Ladányi M, Hegyes-Vecseri B, Kókai Z, Márki E. 2019. Beer

microfiltration with static turbulence promoter: Sum of ranking differences comparison. *Journal of Food Process Engineering* **42**:1–9.

Vaughan A, O’Sullivan T, Van Sinderen D. 2005. Enhancing the microbiological stability of malt and beer. *Journal of the Institute of Brewing* **111**:355–371.

Vávrová A, Matoulková D, Žová TB, Šedo O. 2014. MALDI-TOF MS analysis of anaerobic bacteria isolated From biofilm-covered surfaces in brewery bottling halls. *Journal of the American Society of Brewing Chemists* **72**:95–101.

Vlková E, Rada V, Killer J. 2009. *Potravinářská mikrobiologie*. Česká zemědělská univerzita, Praha.

Wang R, Kalchayanand N, King DA, Luedtke BE, Bosilevac JM, Arthur TM. 2014. Biofilm formation and sanitizer resistance of *Escherichia coli* O157:H7 strains isolated from “high event period” meat contamination. *Journal of Food Protection* **77**:1982–1987.

Wieme AD, Spitaels F, Aerts M, De Bruyne K, Van Landschoot A, Vandamme P. 2014. Identification of beer-spoilage bacteria using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *International Journal of Food Microbiology* **185**:41–50. Elsevier B.V.



Wuijts S, Van Den Berg HHJL, Miller J, Abebe L, Sobsey M, Andremont A, Medlicott KO, Van Passel MWJ, De Roda Husman AM. 2017. Towards a research agenda for water, sanitation and antimicrobial resistance. *Journal of Water and Health* **15**:175–184.




Zheng F, Niu C, Tang D, Liu C, Li Y, Wang J, Li Q. 2018. Monitoring the Microbial Conditions in Breweries in Yangtze River Delta Region, China. *Journal of the American Society of Brewing Chemists* **76**:125–129.

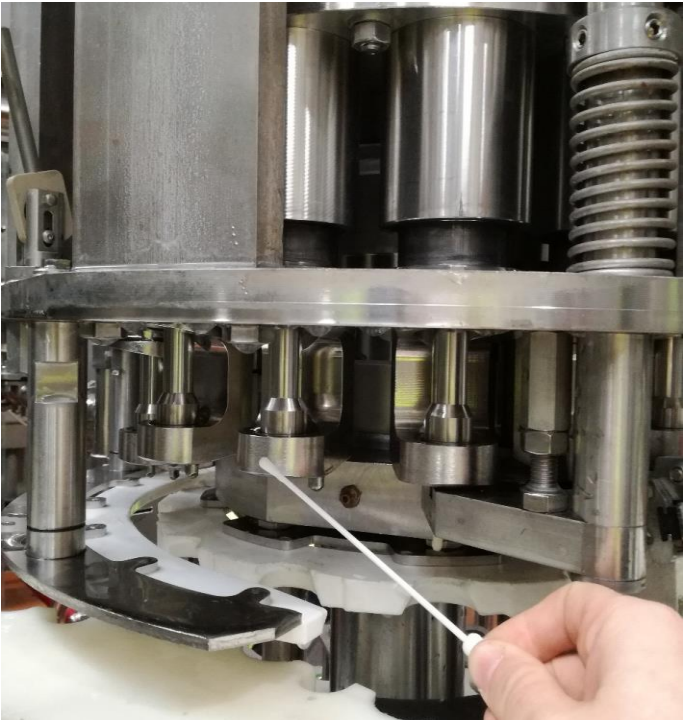
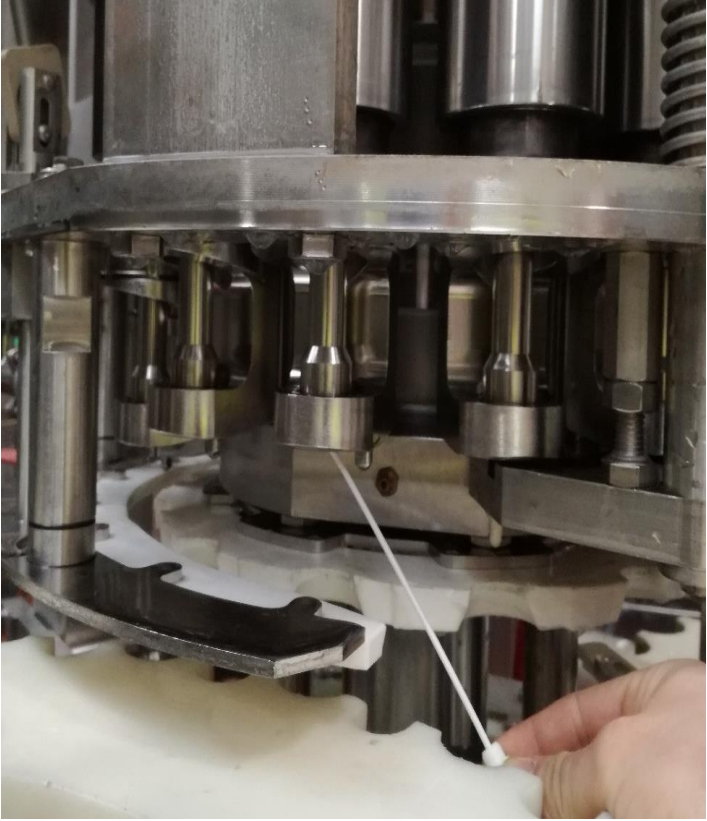
Ziola B et al. 2000. Monoclonal Antibodies Showing Surface Reactivity with *Lactobacillus* and *Pediococcus* Beer Spoilage Bacteria. *Journal of the American Society of Brewing Chemists* **58**:63–68.

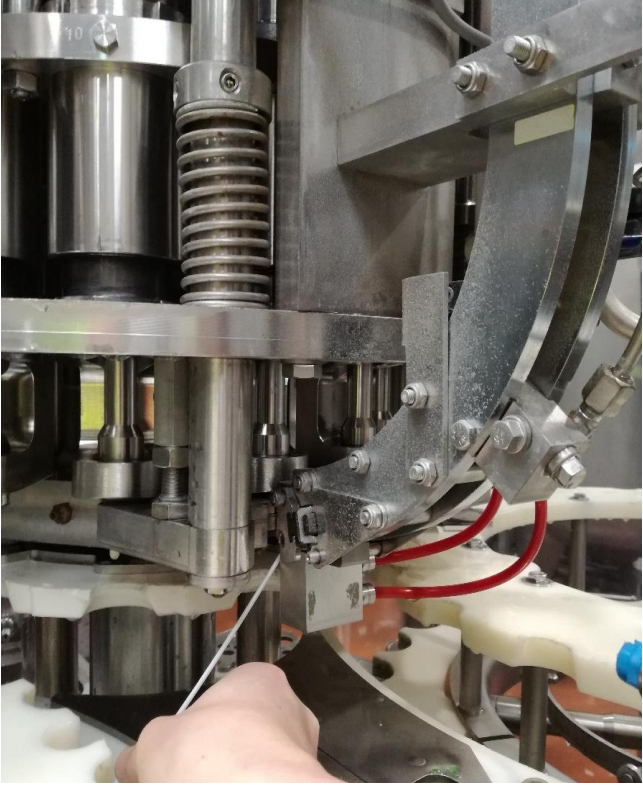
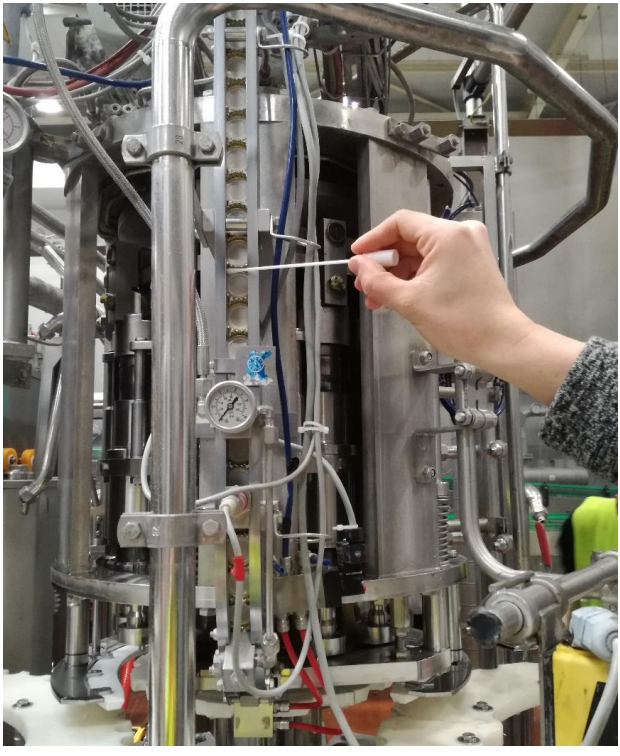
9 Samostatné přílohy



9.1 Příloha 1 – Vzorkovací místa



1.	Plnicí ventily A (nad jehlou)	PŘÍMÝ	
2.	Plnicí ventily B (nad jehlou)	PŘÍMÝ	
3.	Plnicí jehly A	PŘÍMÝ	
4.	Plnicí jehly B	PŘÍMÝ	

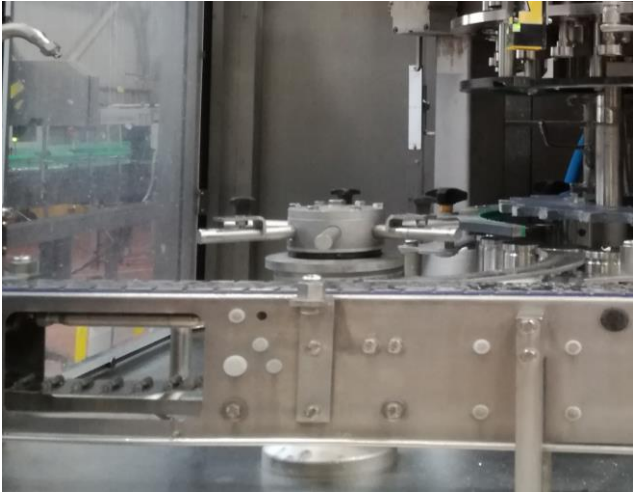


5.	Zvonky A	PŘÍMÝ	
6.	Zvonky B	PŘÍMÝ	
7.	Vypěňovač	PŘÍMÝ	

8.	Zavírací hlavy A (povrch)	PŘÍMÝ	
9.	Zavírací hlavy B (povrch)	PŘÍMÝ	
10.	Zavírací hlavy zevnitř	PŘÍMÝ	

11.	Ústí dráhy korunek do zavíračky	PŘÍMÝ	
12.	Dráha korunek	PŘÍMÝ	

13.	Talířky plniče	NEPŘÍMÝ	
14.	Talířky zavíračky	NEPŘÍMÝ	

15.	Hvězda zavíračky	NEPŘÍMÝ	 <p>A close-up photograph of a hand adjusting a white, star-shaped mold component within a complex industrial machine. The machine features numerous vertical metal rods and cylindrical parts. The hand is using a thin white tool to make adjustments to the mold.</p>
16.	Výstupní hvězda zavíračky	NEPŘÍMÝ	 <p>A photograph showing a hand adjusting a large, white, star-shaped mold component in a factory setting. The mold is mounted on a complex industrial machine with many vertical rods and pipes. The background shows a typical industrial environment with metal structures and lighting.</p>

17.	Výstupní dopravník	NEPŘÍMÝ	
18.	Dopravník před plničem (zvednout dopravník)	NEPŘÍMÝ	
19.	Dopravník před plničem povrch	NEPŘÍMÝ	
20.	Válečky před plničem	NEPŘÍMÝ	