

NBB[®]-A, NBB[®]-B, NBB[®]-C Manual



WE BRING
IDEAS TO LIFE.

NATURAL INGREDIENTS
INGREDIENT SYSTEMS
INTEGRATED SOLUTIONS

Table of Contents

	Page
1. Introduction: Microbial quality control in breweries with NBB [®] -A, NBB [®] -B and NBB [®] -C	5
2. NBB [®] -A, NBB [®] -B and NBB [®] -C: Packaging formats	7
3. Storage	8
4. Intended purpose	8
5. Safety requirements	8
6. Quality control	9
7. Your benefits with the ready-to-use media: NBB [®] -A, NBB [®] -B and NBB [®] -C	9
8. Materials needed for implementation (not included)	9
9. Important information	13
10. Protocols NBB [®] -A Agar	13
10.1. NBB [®] -A Agar: Preparation of agar plates	14
10.1.1. Liquefaction of NBB [®] -A Agar	14
10.1.2. Plate pouring with NBB [®] -A Agar	15
10.2. NBB [®] -A Agar: Detection of beer spoiling bacteria with membrane filtration	16
10.2.1. Membrane filtration of clear beer samples	16
10.2.2. Incubation of NBB [®] -A Agar plates	17
10.2.3. Evaluation of NBB [®] -A Agar plates with membrane filter	17
10.3. NBB [®] -A Agar: Detection of beer spoiling bacteria using plating or spreading method	18
10.3.1. Plating or spreading on NBB [®] -A Agar	18
10.3.2. Incubation of NBB [®] -A Agar plates	19
10.3.3. Evaluation of NBB [®] -A Agar plates	19
10.4. NBB [®] -A Agar: Detection of beer spoiling bacteria from air samples	20
10.4.1. Air sampling with NBB [®] -A Agar	20
10.4.2. Incubation of NBB [®] -A Agar plates	20
10.4.3. Evaluation of NBB [®] -A Agar plates	20
10.5. NBB [®] -A Agar: Detection of beer spoiling bacteria from CO ₂ and compressed air	21
10.5.1. CO ₂ and compressed air sampling with NBB [®] -A Agar	21
10.5.2. Membrane filtration	21
10.5.3. Incubation of NBB [®] -A Agar plates	22
10.5.4. Evaluation of NBB [®] -A Agar plates with membrane filter	22
10.6. NBB [®] -A Agar: Detection of beer spoiling bacteria using the pour-plate method	23
10.6.1. Liquefaction of NBB [®] -A Agar	23
10.6.2. Pouring plates with NBB [®] -A Agar	24
10.6.3. Incubation of NBB [®] -A Agar pour plates	25
10.6.4. Evaluation of NBB [®] -A Agar pour plates	25

	Page
11. Protocols NBB [®] -B Broth	25
11.1. NBB [®] -B Broth: Detection of beer spoiling bacteria from yeast samples in tubes	25
11.1.1. Preparation of NBB [®] -B Broth tubes	25
11.1.2. Yeast sampling in NBB [®] -B Broth tubes	26
11.1.3. Incubation of NBB [®] -B Broth tubes	27
11.1.4. Evaluation of NBB [®] -B Broth tubes	27
11.2. NBB [®] -B Broth: Detection of beer spoiling bacteria from yeast samples in swing top bottles	27
11.2.1. Addition of yeast into swing top bottles	27
11.2.2. Addition of NBB [®] -B Broth in swing top bottles	28
11.2.3. Incubation of NBB [®] -B Broth swing top bottles	28
11.2.4. Evaluation of NBB [®] -B Broth swing top bottles	28
11.3. NBB [®] -B Broth: Detection of beer spoiling bacteria from CO ₂ and compressed air	29
11.3.1. Preparation of NBB [®] -B Broth tubes	29
11.3.2. CO ₂ and compressed air sampling with NBB [®] -B Broth	29
11.3.3. Incubation of NBB [®] -B Broth tubes	30
11.3.4. Evaluation of NBB [®] -B Broth tubes	30
12. Protocols NBB [®] -C Concentrate	31
12.1. NBB [®] -C Concentrate: Enrichment of beer spoiling bacteria from turbid beer samples	31
12.1.1. NBB [®] -C Concentrate: Preparation of swing top bottles	31
12.1.2. Initiating enrichment with NBB [®] -C Concentrate in swing top bottles or beer bottles	32
12.1.3. Incubation of NBB [®] -C Concentrate	33
12.1.4. Evaluation of NBB [®] -C Concentrate	34
12.2. NBB [®] -C Concentrate: Enrichment of beer spoiling bacteria from wort samples	35
12.2.1. NBB [®] -C Concentrate: Preparation of swing top bottles	35
12.2.2. NBB [®] -C Concentrate: Enrichment of wort samples in swing top bottles	35
12.2.3. Incubation of NBB [®] -C Concentrate	36
12.2.4. Evaluation of NBB [®] -C Concentrate	36
12.3. NBB [®] -C Concentrate: Enrichment of beer spoiling bacteria from yeast samples (alternative protocol)	37
12.3.1. NBB [®] -C Concentrate: Preparation of sample enrichment	37
12.3.2. Incubation of NBB [®] -C Concentrate with yeast samples	37
12.3.3. Evaluation of NBB [®] -C Concentrate with yeast samples	38

	Page
13. FAQs on application and evaluating the results	39
13.1. NBB®-A Agar	39
13.2. NBB®-B Broth	40
13.3. NBB®-C Concentrate	40
14. Appendix:	42
14.1. Brief overview: Detection of beer spoiling bacteria using NBB®-A Agar	42
14.2. Brief overview: Detection of beer spoiling bacteria using NBB®-B Broth	43
14.3. Brief overview: Detection of beer spoiling bacteria using NBB®-C Concentrate	43
14.4. Glossary (in alphabetical order)	44
15. Supply Sources	45
16. Information	46
16.1. Trademarks	46
16.2. Distribution	46
16.3. Recommended further reading	46

1. Introduction: Microbial quality control in breweries with NBB®-A, NBB®-B and NBB®-C

Producing microbiologically immaculate beer is the key role of a brewery. However, beer spoiling bacteria can impair fermentation or have a negative impact on the beer's flavour. Microbiological control of the brewing process is therefore extremely important and critical. The **NBB®** products make it possible to carry out microbiological control on all samples of the brewing process in a simple, fast and comprehensive way (see Figure 1).

Gram-positive lactic acid bacteria like *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus lindneri* and *Pediococcus damnosus* are responsible for 70–80% of contamination in breweries. In addition, gram-negative bacteria like *Pectinatus* spp. and *Megasphaera* spp. cause around 3–7% of microbial contamination and, together with lactic acid bacteria, form the most significant group of obligate beer spoiling bacteria.

With **NBB®-A** Agar, beer spoiling bacteria can be quantitatively detected in rinsing water, in beer, in CO₂ or compressed air systems and in the ambient air. With **NBB®-B** Broth, the brewing yeast can be qualitatively analysed for microbiological contamination, allowing beer spoiling bacteria to be spotted before the start of fermentation. The microbiological detection with **NBB®-A** Agar and **NBB®-B** Broth can be easily and reliably seen through a change in the colour from red to yellow, even without any previous knowledge.

NBB®-C Concentrate is used to enrich beer spoiling bacteria from turbid beer samples. Additionally, these bacteria can be enriched by wort samples by adding sterile beer and **NBB®-C** Concentrate. The samples can be analysed with a microscope after incubation. The combination of **NBB®-A** Agar, **NBB®-B** Broth and **NBB®-C** Concentrate enables complete microbiological control of the brewing process and can even detect microbial trace contaminations. This reduces the risk of beers with microbial impairment and enhances efficiency in the brewery.

The **NBB®** products have been used successfully in quality assurance in breweries for 30 years and have established themselves in various collections of standard methods, such as MEBAK and EBC.

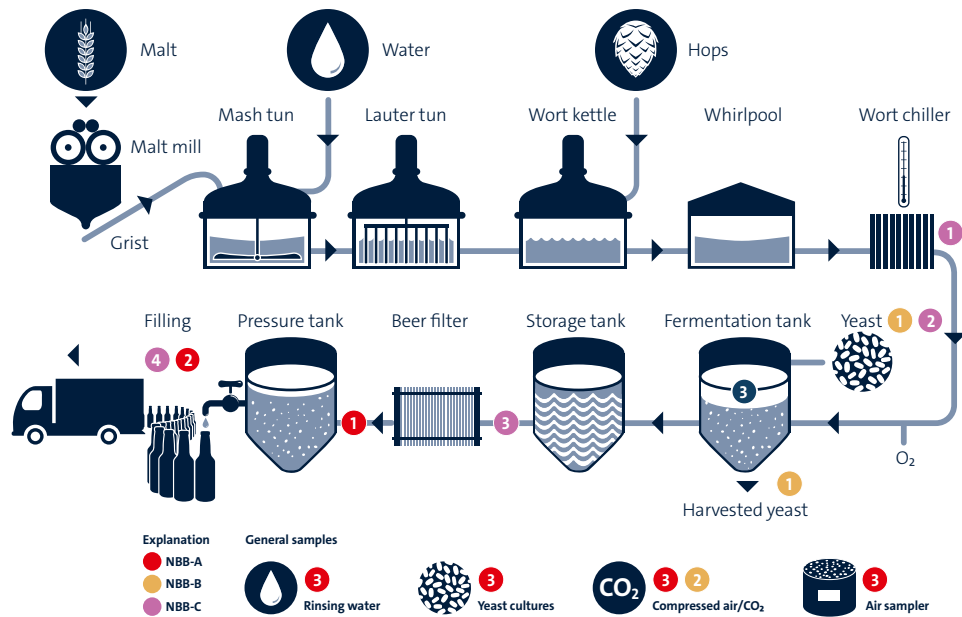


Figure 1: Overview of the microbial analysis options for the brewing process with the NBB® product portfolio.

Overview of the detection options for beer spoiling bacteria with the NBB® product portfolio:

Labelling	Sample types	Methods	NBB® product
1 2	Clear beer samples/rinsing water	Membrane filtration & pour-plate method	NBB®-A Agar
3	Yeast cultures	Spreading or plating on agar	NBB®-A Agar
3	Air	Airborne bacteria collection on agar	NBB®-A Agar
3 2	CO ₂ and compressed air	Blowing into sterile water and membrane filtration on agar or direct gassing in broth	NBB®-A Agar NBB®-B Broth
1 2	Yeast samples	Enrichment with broth or enrichment with concentrate	NBB®-B Broth NBB®-C Concentrate
3 4	Turbid beer samples	Enrichment with concentrate	NBB®-C Concentrate
1	Wort samples	Enrichment with concentrate (sterile beer addition)	NBB®-C Concentrate

2. NBB®-A, NBB®-B and NBB®-C: Packaging formats



2.04709.782



2.04723.646 / 2.04710.782



2.04711.782

Art. no.	Döhler Microsafety Design® product	Description	Target bacteria	Packaging unit
2.04709.782	NBB®-A Agar (bottle)	For the analysis of clear beer samples (membrane filtration), pour-plate method, plating & swab processes, CO ₂ and compressed air (first blowing into sterile water). Ready-to-use NBB®-A Agar for the detection of beer spoiling bacteria through colour change.	Beer spoiling bacteria: e.g. <i>Lactobacillus</i> spp. and <i>Pediococcus</i> spp. as well as <i>Pectinatus</i> spp. and <i>Megasphaera</i> spp.	1 cardboard box (9x 250 ml NBB®-A Agar bottle)
2.04723.646	NBB®-B Broth (tubes)	For the analysis of pitching and harvesting yeast as well as CO ₂ and compressed air. Ready-to-use NBB®-B Broth for the detection of beer spoiling bacteria through colour change.		1 polystyrene box (20x 10 ml NBB®-B Broth tubes)
2.04710.782	NBB®-B Broth (bottle)			1 cardboard box (9x 250 ml NBB®-B Broth bottle)
2.04711.782	NBB®-C Concentrate (bottle)	For the enrichment of (yeast-) turbid beer samples. Ready-to-use NBB®-C Concentrate for the detection of beer spoiling bacteria through microscopy.		1 cardboard box (9x 250 ml NBB®-C Concentrate bottle)

3. Storage

NBB®-A Agar, **NBB®-B** Broth and **NBB®-C** Concentrate must be stored in a dark, dry place at a temperature of +4 to +8° C. The products must not be frozen. The expiration date can be found on the label on the packaging (see product label).

4. Intended purpose

NBB®-A Agar, **NBB®-B** Broth and **NBB®-C** Concentrate are intended for the detection of beer spoiling bacteria in breweries.

When using the products, we recommend that you pay attention to the safety requirements outlined below and work particularly cautiously and hygienically to prevent secondary contamination during sampling.

5. Safety requirements

The basic rules for microbiological operations shall be observed when using this product. This includes using clean equipment such as lab coats, safety goggles and gloves. Such equipment not only contributes to your own personal safety, but also prevents any secondary contaminations being passed on by the user. The safety data sheets can be found at www.doehler-dmd.com.

NBB®-A Agar, **NBB®-B** Broth and **NBB®-C** Concentrate are not suitable for consumption.



Special care is required when using Bunsen burners while wearing latex gloves. Always maintain a sufficiently safe distance from the flame. If the gloves catch fire, it can result in extremely severe injuries.



Fire hazard: Never use alcohol for sterilisation or decontamination purposes while working with an open flame (Bunsen burner).

6. Quality control

The quality of **NBB®-A** Agar, **NBB®-B** Broth and **NBB®-C** Concentrate is carefully tested. In particular, the functionality of the culture media is specifically tested and secured using beer spoiling bacteria and regularly checked at the Research Center Weihenstephan at Technical University Munich. You can obtain a certificate of analysis from Doehler GmbH.


7. Your benefits with the ready-to-use media: **NBB®-A, NBB®-B and NBB®-C**

NBB®-A Agar, **NBB®-B** Broth and **NBB®-C** Concentrate are ready-to-use culture media, eliminating the need for extensive and costly preparations such as weighing and dissolving chemicals, in addition to adjusting the pH values and conducting subsequent autoclaving processes. Quality control has also already been conducted on the culture media's function. This saves you both time and money so you can focus on your microbiological quality control straight away.

8. Materials needed for implementation (not included)

When using **NBB®-A** Agar, **NBB®-B** Broth and **NBB®-C** Concentrate, the following items are recommended for carrying out the experiments:

General laboratory items	Use
Mobile Bunsen burner	Bunsen burner flames create a sterile work area (approx. 50 cm around the flame) in which microbiological experiments can be carried out. The heat kills off any bacteria in the immediate atmosphere. The Bunsen burner is also a useful tool for collecting sterile samples.

General laboratory items	Use
A sterile (serological) pipette (1 – 10 ml) with pipetting aid (e.g. Peleus ball or pipetting aid made of plastic)	(Serological) pipettes are suitable for transferring sterile liquids.  Warning: Never pipette fluids with your mouth! Always use a pipetting aid!
Incubator with thermostat	For incubating samples at defined temperatures.
Disposable gloves	Disposable gloves to prevent secondary contamination by the user.
Sterile workbench	Provides a sterile working environment. Essential lab equipment for sterile work.
Laboratory vessels (e. g. Duran® glass bottles)	Inert and autoclavable vessels for sampling.
Anaerobiosis jar (incl. CO₂ gassing)	For incubating samples under anaerobic conditions.
Autoclave	Standard laboratory device for sterilising laboratory materials.
70 % alcohol solution	For decontaminating surfaces and devices. Composed of 30 % distilled, deionised water and 70 % ethanol.

Laboratory items for NBB®-A Agar	Use
Water bath	Water bath with temperature control for gentle liquefaction of NBB®-A Agar.
Air sampler (as needed)	Airborne microorganism collector that can be equipped with Petri dishes. It should be possible to adjust the air volume variably.
Membrane filtration system	For the filtration of liquids with sterile membrane filters with different pore sizes (e. g. 0.45 µm).
Sterile tweezers	Stainless steel tweezers that can be autoclaved in glass vessels. For transferring membrane filters.
Drigalski spatula or inoculation loop	Disposable or reusable laboratory items for plating or spreading microorganisms. Reusable spatulas (stainless steel) or loops (platinum wire) must be sterilised by flaming before use.
Sterile Petri dishes with vents	Sterile Petri dishes can be obtained from specialist laboratory suppliers. The vents enable gas exchange.

Laboratory items for NBB®-B Broth	Use
Sterile swab	Sterile (wooden) swab with cotton tip, usually available sterile and individually-packaged (see Chapter 15, p. 45)
Transparent swing top bottle	Swing top bottles are available in various volumes. 50 ml swing top bottles are needed for NBB®-B Broth. Transparent bottles are needed in order to recognise the colour change. Stainless steel wire should be used for autoclaving. (Procurement source: specialist laboratory suppliers e.g. VWR)

Laboratory items for NBB [®] -B Broth	Use
Screw-top test tubes	Inert and autoclavable vessels available in various volumes. The screw top allows loose to tight sealing. Not required for use with NBB[®]-B-Am Broth tubes (2.04723.646).
Test tube racks	NBB[®]-B Broth tube holder

Laboratory items for NBB [®] -C Concentrate	Use
Transparent swing top bottles	Swing top bottles are available in various volumes. 200 ml swing top bottles are needed for NBB[®]-C Concentrate. Stainless swing tops should be used for autoclaving. (Procurement source: specialist laboratory suppliers e.g. VWR)
Shaker	Laboratory device whose rotational frequency can be controlled to shake microbial culture vessels.
Erlenmeyer flasks with cotton stoppers	Inert and autoclavable laboratory vessels with a capacity of at least 200 ml.

9. Important information

Clean microbiological work is the basis of all analysis. In order to obtain reliable results, we strongly recommend following the safety instructions and the work steps below (see Protocols, from p. 13).

NBB[®]-A Agar, **NBB[®]-B** Broth and **NBB[®]-C** Concentrate are not suitable for consumption.

Following analysis, the incubated culture media should be deactivated before being disposed of. Autoclaving the culture media or disposing of them as hazardous waste is recommended for deactivating the bacteria.

10. Protocols NBB[®]-A Agar

DMD [®] product	Preparation	Application	Frequency	Protocol
NBB[®]-A Agar	Preparation of agar plates (see Protocol 10.1.)	Membrane filtration of clear beer samples or water	Regular (every production cycle)	10.2.
		Spreading and plating method	As needed	10.3.
		Airborne microorganism collection	Monthly/as needed	10.4.
		CO ₂ and compressed air sampling	Occasional (for analysis of contamination source)	10.5.
	No preparation	Pour-plate method	As needed	10.6.

10.1. NBB[®]-A Agar: Preparation of agar plates



10.1.1. Liquefaction of NBB[®]-A Agar

Liquefy an appropriate number of **NBB[®]-A Agar** bottles for your tests in a water bath at approx. 95 °C. Liquefaction of a bottle of **NBB[®]-A Agar** takes approx. 40–45 min.

Allow the **NBB[®]-A Agar** to cool to approx. 45–50 °C, so that you can touch the bottles without danger of being burned. Make sure that the agar does not solidify again as it cools.



Warning:

Never keep the liquefied NBB[®]-A Agar in a water bath at 45 °C for more than 4 h. This damages the agar structure and changes its solidification properties irrevocably. Therefore, avoid long liquefaction or multiple liquefactions at 95 °C, as the growth components could be damaged otherwise.

Do not use a microwave to liquefy NBB[®]-A Agar. Danger of fire due to the bottle's metal lid and local overheating also destroys some ingredients.



10.1.2. Plate pouring with NBB[®]-A Agar

Take the bottles, now cooled to 45 °C, into a sterile workbench and arrange the required number of empty Petri dishes with vents. Consider the diameter of the Petri dishes needed for the tests.

Homogenise the **NBB[®]-A Agar** by gently swirling the bottle. Pour into the **NBB[®]-A Agar** plates as required. If possible, pour a whole bottle of **NBB[®]-A Agar** into Petri dishes, as heating the **NBB[®]-A Agar** bottle repeatedly damages the ingredients and leads to poorer results.

Petri dish diameter	Fill volume with NBB [®] -A Agar	Number of plates from one bottle of NBB [®] -A Agar
5.5 cm	10 ml	25 pc.
9 cm	31 ml	8 pc.
14 cm	62 ml	4 pc.

Poured **NBB[®]-A Agar** plates should be stacked for cooling in order to prevent the formation of condensation.

NBB[®]-A Agar plates can be stored in a dark place at a temperature of +4 to +8 °C for approx. 1 week. Storing the plates upside down is recommended.

The **NBB[®]-A Agar** plates should be dried in a sterile workbench before use, so that any condensation is removed.

10.2. NBB[®]-A Agar: Detection of beer spoiling bacteria with membrane filtration



10.2.1. Membrane filtration of clear beer samples

Define a suitable volume of a clear beer sample that you want to examine.

Use your membrane filtration system to filter the clear beer samples on a suitable membrane filter. Please note the manufacturer's instructions on the membrane filtration system. For strictly anaerobic beer spoiling bacteria (e.g. *Pectinatus* spp.), the filter should be briefly flushed with CO₂ in order to remove oxygen from the filter.



Label your **NBB[®]-A** Agar plates.

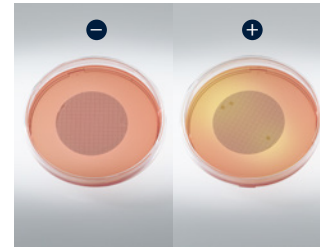
Then transfer the membrane filter to an **NBB[®]-A** Agar plate with sterile tweezers. Place the membrane filter on the surface of the **NBB[®]-A** Agar plate, taking care to avoid air bubbles.



10.2.2. Incubation of NBB[®]-A Agar plates

Incubate the **NBB[®]-A** Agar plates with the membrane filter under anaerobic conditions (e.g. in an anaerobiosis jar) for 5 – 7 days at 27 ± 2 °C in an incubator.

The incubation time will need to be extended for some slow-growing beer spoiling bacteria (e.g.: *Lactobacillus lindneri*).



10.2.3. Evaluation of NBB[®]-A Agar plates with membrane filter

A change in colour from red to yellow shows the growth of typical beer spoiling bacteria on **NBB[®]-A** Agar plates with membrane filters.

Further analysis techniques, such as microscopy and PCR analysis, can be used to identify the bacteria.

10.3. NBB[®]-A Agar: Detection of beer spoiling bacteria using plating or spreading method



10.3.1. Plating or spreading on NBB[®]-A Agar

Label the **NBB[®]-A** Agar plates for this test.

A) Method: plating

Pipette max. 150 µl of your sample onto the **NBB[®]-A** Agar plate in a sterile workbench. Use a Drigalski spatula to plate the sample evenly over the agar.

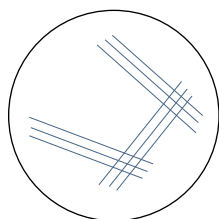


B) Method: spreading (e.g. cultures)

Take a sterile inoculation loop and immerse it once briefly in a homogeneous (yeast) culture.

Use this inoculation loop to spread the microorganisms onto an **NBB[®]-A** Agar plate.

With the help of the spreading pattern below, you can detect microorganisms individually, i.e. individual colonies. Use the same inoculation loop for all spreading lines. Do not immerse it in the culture again. If using reusable inoculation loops, flame between spreading – or use a new disposable inoculation loop.



Warning:

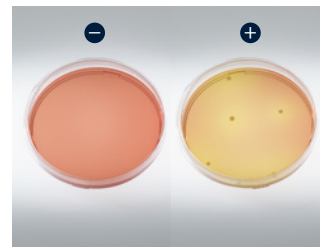
Always use a new sterile inoculation loop for every new culture or NBB[®]-A Agar plate, or flame the reusable inoculation loop, in order to prevent secondary contamination.



10.3.2. Incubation of NBB[®]-A Agar plates

Incubate the **NBB[®]-A** Agar plates under anaerobic conditions (e.g. in an anaerobiosis jar) for 5 – 7 days at 27 ± 2 °C in an incubator.

The incubation time will need to be extended for some slow-growing beer spoiling bacteria (e.g.: *Lactobacillus lindneri*).



10.3.3. Evaluation of NBB[®]-A Agar plates

A change in colour from red to yellow shows the growth of typical beer spoiling bacteria on **NBB[®]-A** Agar plates (see image on left: plated samples with negative and positive results).

Further analysis techniques, such as microscopy and PCR analysis, can be used to identify the bacteria.

10.4. NBB[®]-A Agar: Detection of beer spoiling bacteria from air samples



10.4.1. Air sampling with NBB[®]-A Agar

Determine which agar plate diameters can be used with your air sampler. Various air samplers for agar plates are available for purchase.

Label suitable **NBB[®]-A** Agar plates for this test.

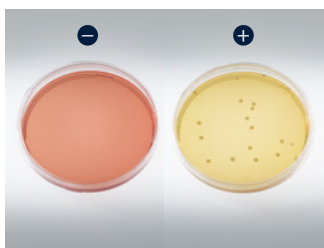
Use your air sampler in accordance with the manufacturer's instructions and collect the required volume of ambient air on the plate.



10.4.2. Incubation of NBB[®]-A Agar plates

Incubate the **NBB[®]-A** Agar plates under anaerobic conditions (e.g. in an anaerobiosis jar) for 5 days at 27 ± 2 °C in an incubator.

If you incubate for more than 5 days, unspecific microorganisms, i.e. bacteria that are not obligately beer spoiling, will also be enriched. Therefore, always analyse the **NBB[®]-A** Agar plates after 5 days.



10.4.3. Evaluation of NBB[®]-A Agar plates

A change in colour from red to yellow shows the growth of typical beer spoiling bacteria on **NBB[®]-A** Agar plates.

Further analysis techniques, such as microscopy and PCR analysis, can be used to identify the bacteria.

10.5. NBB[®]-A Agar: Detection of beer spoiling bacteria from CO₂ and compressed air

10.5.1. CO₂ and compressed air sampling with NBB[®]-A Agar

Fill a sterile bottle or a sterile vessel with ca. 50 ml of sterile water.

Decontaminate the outlet of the compressed air or CO₂ system with a 70% alcohol solution.

Then immerse the outlet in the sterile water. Allow compressed air or CO₂ to flow slowly into the water for around 15 seconds, preventing gas from shooting out. Most microorganisms are found in the back of the sampling tap.



10.5.2. Membrane filtration

Use your membrane filtration system to filter the gassed water from 10.5.1. onto a suitable membrane filter. Please note the manufacturer's instructions on the membrane filtration system. For strictly anaerobic beer spoiling bacteria (e.g. *Pectinatus* spp.), the membrane filter should be briefly flushed with CO₂ in order to remove oxygen from the filter.

Label the **NBB[®]-A** Agar plates.

Transfer the membrane filter to an **NBB[®]-A** Agar plate with sterile tweezers. Place the membrane filter on the surface of the **NBB[®]-A** Agar plate, taking care to avoid air bubbles.

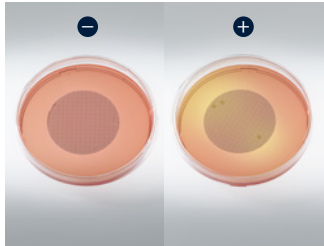




10.5.3. Incubation of NBB[®]-A Agar plates

Incubate the **NBB[®]-A** Agar plates with the membrane filter under anaerobic conditions (e.g. in an anaerobiosis jar) for 5–7 days at $27 \pm 2^\circ\text{C}$ in an incubator.

The incubation time will need to be extended for some slow-growing beer spoiling bacteria (e.g.: *Lactobacillus lindneri*).



10.5.4. Evaluation of NBB[®]-A Agar plates with membrane filter

A change in colour from red to yellow shows the growth of typical beer spoiling bacteria on **NBB[®]-A** Agar plates with membrane filters.

Further analysis techniques, such as microscopy and PCR analysis, can be used to identify the bacteria.

10.6. NBB[®]-A Agar: Detection of beer spoiling bacteria using the pour-plate method



10.6.1. Liquefaction of NBB[®]-A Agar

Liquefy an appropriate number of **NBB[®]-A** Agar for your tests in a water bath at approx. 95°C . Liquefaction of a bottle of **NBB[®]-A** Agar takes approx. 40 – 45 min.

Allow the **NBB[®]-A** Agar to cool to approx. $45 - 50^\circ\text{C}$, so that you can touch the bottles without danger of being burned. Make sure that the agar does not solidify again as it cools.



Warning:

Never keep the liquefied NBB[®]-A Agar in a water bath at 45°C for more than 4 h. This damages the agar structure and changes its solidification properties irrevocably. Therefore, avoid long liquefaction or multiple liquefactions at 95°C , as the growth components could be damaged otherwise.

Do not use a microwave to liquefy NBB[®]-A Agar. Danger of fire due to the bottle's metal lid and local overheating also destroys some ingredients.



10.6.2. Pouring plates with NBB®-A Agar

Take the bottles, now cooled to 45 °C, into a sterile workbench and arrange sufficient empty Petri dishes with vents. Make sure that the liquefied agar is not too hot, as bacteria can be killed by excessive agar temperatures.

Label the Petri dishes.



Use a pipette to add the beer samples to the Petri dishes – do not exceed the maximum sample volumes given below for each Petri dish diameter.

Petri dish diameter	Max. sample volume
9 cm	5 ml
14 cm	10 ml



Homogenise the **NBB®-A** Agar by gently swirling the bottle. Fill up the sample volume with **NBB®-A** Agar. Use the Petri dish diameter as a guide for the volume of **NBB®-A** Agar to be added.

Petri dish diameter	Fill volume with NBB®-A Agar	Number of plates from one bottle of NBB®-A Agar
5.5 cm	10 ml	25 pc.
9 cm	31 ml	8 pc.
14 cm	62 ml	4 pc.

Mix the **NBB®-A** Agar pour plates by rotating the Petri dish gently multiple times (in a figure eight). Do not allow the agar to splash onto the lid or run out of the plate. If this does happen, dispose of the plate affected and start again.

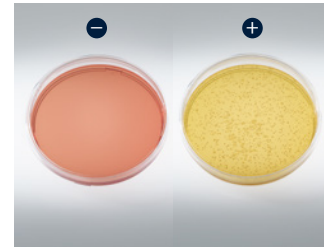
Poured **NBB®-A** Agar pour plates should be stacked for cooling in order to prevent the formation of condensation.



10.6.3. Incubation of NBB®-A Agar pour plates

Incubate the **NBB®-A** Agar pour plates under anaerobic conditions (e.g. in an anaerobiosis jar) for 5 – 7 days at 27 ± 2 °C in an incubator.

The incubation time will need to be extended for some slow-growing beer spoiling bacteria (e.g.: *Lactobacillus lindneri*).



10.6.4. Evaluation of NBB®-A Agar pour plates

A change in colour from red to yellow shows the growth of typical beer spoiling bacteria on **NBB®-A** Agar pour plates.

Further analysis techniques, such as microscopy and PCR analysis, can be used to identify the bacteria.

11. Protocols NBB®-B Broth

DMD® product	Application	Frequency	Protocol
NBB®-B Broth	Yeast sampling	Regular (every production cycle: e.g. after yeast harvesting or before adding yeast)	11.1. & 11.2.
	CO ₂ and compressed air sampling	Monthly/as needed	11.3.

11.1. NBB®-B Broth: Detection of beer spoiling bacteria from yeast samples in tubes



11.1.1. Preparation of NBB®-B Broth tubes

Fill an appropriate test tube to approx. 70 % with **NBB®-B** Broth in a sterile workbench using a sterile serological pipette, or use pre-filled **NBB®-B** Broth tubes (art. no. 2.04723.646).



11.1.2. Yeast sampling in NBB®-B Broth tubes

A) Low-viscosity yeast suspension

Extract 0.1 – 0.3 ml from a pipettable yeast suspension using a sterile pipette.



Make sure that only the tip of the pipette comes into contact with the yeast suspension in order to prevent secondary contamination.



Then add the yeast suspension to the prepared **NBB®-B** Broth tube from Step 11.1.1.

Do not seal the **NBB®-B** Broth tube completely to allow CO₂ to diffuse during incubation.

Label the tube.



B) High-viscosity yeast suspension

Extract ca. 0.3 ml of the high-viscosity yeast suspension using a sterile swab.

Transfer the swab to the prepared **NBB®-B** Broth tube from Step 11.1.1. Detach the yeast suspension from the swab by stirring and gently shaking.

Then discard the swab. Do not seal the **NBB®-B** Broth tube completely to allow CO₂ to diffuse during incubation.

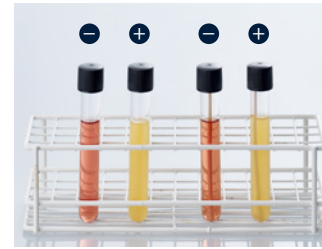
Label the tube.



11.1.3. Incubation of NBB®-B Broth tubes

Incubate the **NBB®-B** Broth tubes with their screw tops loosely attached under anaerobic conditions (e.g. in an anaerobiosis jar) for 5 days at 27 ± 2 °C in an incubator.

The incubation time will need to be extended for some slow-growing beer spoiling bacteria (e.g.: *Lactobacillus lindneri*).



11.1.4. Evaluation of NBB®-B Broth tubes

A change in colour from red to yellow shows the growth of typical beer spoiling bacteria in **NBB®-B** Broth. As well as sedimentation and turbidity, gas formation can occur.

Further analysis techniques, such as microscopy and PCR analysis, can be used to identify the bacteria.

11.2. NBB®-B Broth: Detection of beer spoiling bacteria from yeast samples in swing top bottles



11.2.1. Addition of yeast into swing top bottles

Use a sterile pipette to place 0.25 – 0.75 ml of yeast suspension into a transparent swing top bottle (50 ml).

If the yeast cannot be pipetted, you can also transfer it to the bottle with a sterile spatula or by pouring.



11.2.2. Addition of NBB[®]-B Broth in swing top bottles

Pipette approx. 25 ml of **NBB[®]-B** Broth into the swing top bottle that already contains the yeast suspension.

Close the swing top bottle, but do not seal the swing top completely. This prevents explosions due to gas formation.

Label the bottle.



11.2.3. Incubation of NBB[®]-B Broth swing top bottles

Incubate the **NBB[®]-B** Broth swing top bottle for 5 days at $27 \pm 2^\circ\text{C}$ in an incubator. The brief fermentation of the yeast means that enough CO_2 is produced to generate an anaerobic environment. Shortly afterwards, inhibitors reduce the yeast growth.

The incubation time will need to be extended for some slow-growing beer spoiling bacteria (e.g.: *Lactobacillus lindneri*).



11.2.4. Evaluation of NBB[®]-B Broth swing top bottles

A change in colour from red to yellow shows the growth of typical beer spoiling bacteria in **NBB[®]-B** Broth. Turbidity and gas formation can also occur.

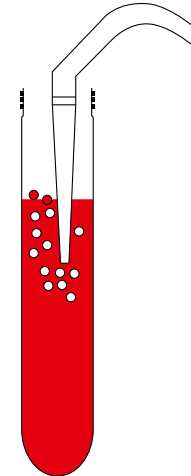
Further analysis techniques, such as microscopy and PCR analysis, can be used to identify the bacteria.

11.3. NBB[®]-B Broth: Detection of beer spoiling bacteria from CO_2 and compressed air



11.3.1. Preparation of NBB[®]-B Broth tubes

Fill an appropriate test tube to approx. 70% with **NBB[®]-B** Broth in a sterile workbench using a sterile serological pipette, or use pre-filled **NBB[®]-B** Broth tubes (art. no. 2.04723.646).



11.3.2. CO_2 and compressed air sampling with NBB[®]-B Broth

Sterilise your CO_2 or compressed air outlet (e.g. using a 70% alcohol solution).

Do not allow gas to shoot out, as most bacteria are found in the sampling tap. Allow CO_2 or compressed air to flow into the tube filled with **NBB[®]-B** Broth.

After a defined period (e.g. 15 seconds), shut off the flow of gas.

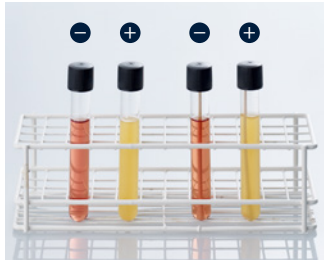
Close the screw top loosely to allow gas diffusion and label it.



11.3.3. Incubation of NBB®-B Broth tubes

Incubate the **NBB®-B** Broth tubes under anaerobic conditions (e.g. in an anaerobiosis jar) for 5 days at 27 ± 2 °C in an incubator.

The incubation time will need to be extended for some slow-growing beer spoiling bacteria (e.g.: *Lactobacillus lindneri*).



11.3.4. Evaluation of NBB®-B Broth tubes

A change in colour from red to yellow shows the growth of typical beer spoiling bacteria in **NBB®-B** Broth. Turbidity and gas formation can also occur.

Further analysis techniques, such as microscopy and PCR analysis, can be used to identify the bacteria.

12. Protocols NBB®-C Concentrate

DMD® product	Application	Frequency	Protocol
NBB®-C Concentrate	Enrichment of turbid beer samples	Regular (every production cycle)	12.1.
	Enrichment of wort samples (sterile beer addition)	Occasional	12.2.
	Yeast sampling	Occasional	12.3.

12.1. NBB®-C Concentrate: Enrichment of beer spoiling bacteria from turbid beer samples

Detection of beer spoiling bacteria with **NBB®-C** Concentrate is not based on a change in colour. The samples incubated with **NBB®-C** Concentrate are analysed under a microscope (e.g. in a counting chamber). The selectivity of the enrichment can be varied by mixing the beer sample with **NBB®-C** Concentrate and adding sterile water, which dilutes the bitter hop compounds. This makes it possible to detect everything from obligate beer spoiling bacteria to indicator microorganisms (see Figure 2 below). For indicator microorganisms air should be left in the bottle head space.

12.1.1. NBB®-C Concentrate: Preparation of swing top bottles

Turbid beer samples can be incubated in sterile, transparent swing top bottles for enrichment or for the detection of beer spoiling bacteria.



Warning: In order to produce sterile swing top bottles, fill the bottles with approx. 10 ml of deionised water and autoclave. The water does not have to be removed from the bottle before use.

This small amount of water can be left in the bottle due to the higher hop concentration of unfiltered beer samples.

The swing top on the bottle should be made from stainless steel to prevent corrosion during autoclaving.

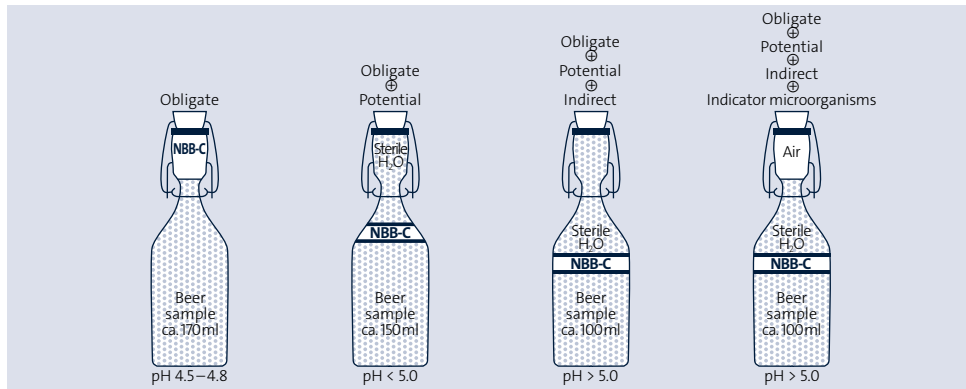


Figure 2: Selective detection of bacteria with NBB®-C Concentrate. The selectivity of the enrichment can be changed through the addition of sterile water. This allows enrichment of everything from obligate beer spoiling bacteria (e.g. *L. brevis*, *Pectinatus* spp. & *Megasphaera* spp.) to indicator microorganisms by adding air to the bottle headspace (e.g. acidic acid bacteria) (see Back, W., 2005). The volumes stated relate to a 180 ml swing top bottle and may need to be adapted to the actual bottle volume used.



12.1.2. Initiating enrichment with NBB®-C Concentrate in swing top bottles or beer bottles

A) Enrichment in swing top bottles

The beer volume to be investigated is placed into the pre-sterilised swing top bottles in a sterile workbench.

The bottle is then filled to 5% of the total volume with NBB®-C Concentrate.



If needed, the selectivity of the enrichment can be modified through the addition of sterile deionised water or sterile tap water, as depicted in Figure 2, p. 32. For example: Adding more than 25% (v/v) water enables the enrichment of potentially beer spoiling bacteria. The bottle should be filled to the top with water. If you want to enrich indicator microorganisms, the headspace has to be filled with air.

Close the sample bottle with the lid. For samples that contain yeast (e.g. yeast containing weiss beer), do not close the bottle tightly in order to allow gas diffusion.

Label the sample.



The lid can be sealed tight after three days of incubation (see 12.1.3, p. 33).



B) Enrichment in beer bottles

Enrichment can also be conducted directly in the beer bottle in order to test beer after filling.

Remove approx. 5% of the bottle volume and fill the bottle almost to the top with approx. 5% NBB®-C Concentrate.

Close the sample bottle with the lid. For samples that contain yeast (e.g. yeast containing weiss beer), do not close the bottle tightly in order to allow gas diffusion.

Label the sample.

The lid can be sealed tight after three days of incubation (see 12.1.3, p. 33).



12.1.3. Incubation of NBB®-C Concentrate

Incubate the bottle with NBB®-C Concentrate for 7 – 12 days at 27 ± 2 °C in an incubator or incubation room.

Please note that brief yeast growth can cause CO₂ formation, which puts the bottle under pressure. Yeast growth is quickly suppressed by inhibitors. The CO₂ formation replaces the anaerobic incubation.

The incubation time will need to be extended for some slow-growing beer spoiling bacteria (e.g.: *Lactobacillus lindneri*).



12.1.4. Evaluation of NBB[®]-C Concentrate

NBB[®]-C Concentrate does not contain a colour indicator. Turbidity can display the growth of typical beer spoiling bacteria in **NBB[®]-C** Concentrate macroscopically. The sample should be constantly checked for the growth of beer spoiling bacteria during incubation. In very turbid samples, a microscope is the only reliable way to determine the growth of beer spoiling bacteria. In the microscopic evaluation (e.g. counting chamber; Neubauer improved), the number of bacteria in 16 microscopic fields (= group square) at a magnification of 600 must be significantly greater than 1. When the chambers have a layer thickness of 0.1 mm, there should be around 4 cells per group square. This corresponds to contamination of approx. 10⁶ cells/ml. If there are only isolated cells visible, these are dead or harmless bacteria for the most part, which are almost always found in these kinds of samples.

Ambiguous samples can then be enriched with **NBB[®]-B** Broth to make sure. To do this, mix one drop of **NBB[®]-C** sample sediment with approx. 20 ml **NBB[®]-B** Broth and incubate for one day at 27 ± 2 °C.

Further analysis techniques, such as PCR analysis, can be used to identify the bacteria.

12.2. NBB[®]-C Concentrate: Enrichment of beer spoiling bacteria from wort samples

12.2.1. NBB[®]-C Concentrate: Preparation of swing top bottles

Wort samples with addition of sterile beer can be incubated in sterile, transparent swing top bottles for enrichment or for the detection of beer spoiling bacteria.



Warning:

In order to produce sterile swing top bottles, fill the bottles with approx. 10 ml of deionised water or tap water and autoclave it. The water does not have to be removed from the bottle before use. This small amount of water can be left in the bottle due to the higher hop concentration of wort and unfiltered beer samples. The swing top on the bottle should be made from stainless steel to prevent corrosion during autoclaving.



12.2.2. NBB[®]-C Concentrate: Enrichment of wort samples in swing top bottles

For a 200 ml swing top bottle, which holds around ca. 210 ml when filled to the top, place ca. 20 ml of sterile water in the swing top bottle.

Then fill the swing top bottle with ca. 50 ml wort and add approx. 5% **NBB[®]-C** Concentrate (here ca. 10 ml).

Finally, fill the bottle to the top with pasteurised beer (e.g. samples from the shelf-life cabinet). The beer quantity is around 130 ml.

Loosely close the sample bottle with the lid in order to allow gas diffusion and label it.



12.2.3. Incubation of NBB[®]-C Concentrate

Incubate the bottle with the **NBB[®]-C** Concentrate for 7 – 12 days at $27 \pm 2^\circ\text{C}$ in an incubator or incubation room.

The incubation time will need to be extended for some slow-growing beer spoiling bacteria (e.g.: *Lactobacillus lindneri*).



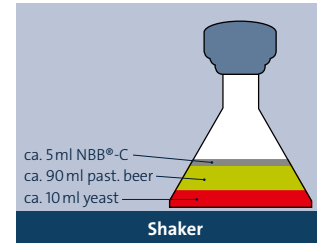
12.2.4. Evaluation of NBB[®]-C Concentrate

NBB[®]-C Concentrate does not contain a colour indicator. Turbidity can display the growth of typical beer spoiling bacteria in **NBB[®]-C** Concentrate macroscopically. The sample should be constantly checked for the growth of beer spoiling bacteria during incubation. In slightly turbid samples, a microscope is the only reliable way to determine the growth of beer spoiling bacteria. In the microscopic evaluation (e.g. counting chamber; Neubauer improved), the number of bacteria in 16 microscopic fields (= group square) at a magnification of 600 must be significantly greater than 1. When the chambers have a layer thickness of 0.1 mm, there should be around 4 cells per group square. This corresponds to contamination of approx. 10^6 cells/ml. If there are only isolated cells visible, these are dead or harmless bacteria for the most part, which are almost always found in these kinds of samples.

Ambiguous samples can then be enriched with **NBB[®]-B** Broth to make sure. To do this, mix one drop of **NBB[®]-C** sample sediment with approx. 20 ml **NBB[®]-B** Broth and incubate for one day at $27 \pm 2^\circ\text{C}$.

Further analysis techniques, such as PCR analysis, can be used to identify the bacteria.

12.3. NBB[®]-C Concentrate: Enrichment of beer spoiling bacteria from yeast samples (alternative protocol)



12.3.1. NBB[®]-C Concentrate: Preparation of sample enrichment

Autoclave a 200 ml Erlenmeyer flask with a cotton stopper.

In a sterile workbench, add approx. 10 ml of the yeast sample to be tested to the sterile flask.

Then add approx. 90 ml of sterile beer.

Pipette approx. 5 ml **NBB[®]-C** Concentrate into the flask.

Close the flask with the sterile cotton stopper.

Mix the liquids by gently swirling the closed flask.

12.3.2. Incubation of NBB[®]-C Concentrate with yeast samples

Incubate the flask with the yeast sample on a shaker (slow rotation) in an incubator for 5 – 12 days at $27 \pm 2^\circ\text{C}$.

The brief yeast fermentation generates an anaerobic atmosphere in the flask, so anaerobic cultivation is not essential.

12.3.3. Evaluation of NBB[®]-C Concentrate with yeast samples

NBB[®]-C Concentrate does not contain a colour indicator. Turbidity can display the growth of typical beer spoiling bacteria in **NBB[®]-C** Concentrate macroscopically. The sample should be constantly checked for the growth of beer spoiling bacteria during incubation. In very turbid samples, a microscope is the only reliable way to determine the growth of beer spoiling bacteria. In the microscopic evaluation (e.g. counting chamber; Neubauer improved), the number of bacteria in 16 microscopic fields (= group square) at a magnification of 600 must be significantly greater than 1. When the chambers have a layer thickness of 0.1 mm, there should be around 4 cells per group square. This corresponds to contamination of approx. 10⁶ cells/ml. If there are only isolated cells visible, these are dead or harmless bacteria for the most part, which are almost always found in these kinds of samples.

Ambiguous samples can then be enriched with **NBB[®]-B** Broth to make sure. To do this, mix one drop of **NBB[®]-C** sample sediment with approx. 20 ml **NBB[®]-B** Broth and incubate for one day at 27 ± 2 °C.

Further analysis techniques, such as PCR analysis, can be used to identify the bacteria.

13. FAQs on application and evaluating the results

13.1. NBB[®]-A Agar

	Cause	Solution
Strictly anaerobic bacteria like Pectinatus and Megasphaera do not grow on the membrane filter.	Especially strict anaerobic beer spoiling bacteria are often exposed to oxygen during the membrane filtration process, which inhibits their growth.	After membrane filtration, either slightly flush the membrane filter with CO ₂ or incubate the membrane filter in NBB[®]-B in an anaerobiosis jar.
After storage in a water bath, NBB[®]-A Agar no longer solidifies completely or at all.	Storing liquid agar at approx. 45 °C or at 95 °C in a water bath causes chemical damage to the agar structure. This prevents the agar from solidifying.	Never store NBB[®]-A Agar in a water bath at 45 °C for more than 4 h. Avoid extended liquefaction times at 95 °C or multiple liquefactions.
In the pour-plate method, the colour changes as soon as the samples are added.	You have added too much sample or the sample is excessively acidic to the NBB[®]-A Agar.	Adhere to the maximum sample volumes specified in the protocol (see Protocol 10.6., p. 23). If your sample is very acidic, reduce the sample volume
Bacteria growth with no change in colour.	Microorganisms that do not cause a change in colour on NBB[®]-A Agar should be analysed with a microscope. Indicator microorganisms (e.g. <i>Enterobacter</i> spp.) may grow in case of insufficient anaerobiosis.	For ambiguous samples, you can conduct a bacteria examination under a microscope or a differentiation with PCR methods. You should also check your incubation conditions.

13.2. NBB®-B Broth

	Cause	Solution
Turbidity with no change in colour.	If the nutrient medium becomes turbid after 5 days of incubation and there is no colour change, this implies a contamination that may have occurred during sampling.	Please repeat the sampling and comply with the outlined work steps. Please pay attention that microbiological work is carried out in a hygienic manner.
Differentiating between or identifying beer spoiling bacteria.	It is not possible to differentiate or identify beer spoiling bacteria with NBB®-B Broth.	Further analysis techniques, such as PCR-based methods, can be applied to differentiate bacteria.
Observing yeast growth.	Shortly after the yeast is added, particularly in large quantities, it may grow briefly in the NBB®-B Broth. However, the yeast's growth will be inhibited after a short period. This leads to CO ₂ formation in the short-term and thus provides an ideal anaerobic atmosphere. The yeast quantity may also cause turbidity.	After 5 days, only beer spoiling bacteria are detected in the analysis. Please observe the exact analysis times. If the solution becomes turbid, please also pay attention to a change in colour as this often indicates the presence of beer spoiling bacteria (adding too much yeast prevents the colour change). Unclear results can also be examined under a microscope where beer spoiling bacteria can be recognized in addition to many yeast cell.

13.3. NBB®-C Concentrate

	Cause	Solution
The colour change is not visible.	NBB®-C Concentrate does not contain a colour indicator.	The beer spoiling bacteria can be determined with a microscope. Only significant growth indicates a result.
Enriching clear beer samples with NBB®-C Concentrate.	–	Clear beer samples can also be enriched with NBB®-C Concentrate for qualitative observation. Analysis is done by assessing the sediment and turbidity and using a microscope.

14. Appendix

14.1 Brief overview: Detection of beer spoiling bacteria using NBB®-A Agar

	Membrane filtration (clear beer samples/ water)	Plating & spreading method	Air samples	CO ₂ & compressed air	Pour-plate method	
Sample volume	Individual volume (default: 300–500 ml)	Max. 150 µl for plating/ loop volume for spreading	Individual air volume with air sampler or individual time interval with sedimentation process	Membrane filtration of ca. 50 ml of sterile water with CO ₂ /compressed air (15 seconds)	Petri dish diameter	Max. sample volume
					9 cm	5 ml
					14 cm	10 ml
Incubation conditions	Temp.: 27±2°C Time: 5–7 Days	Temp.: 27±2°C Time: 5 Days	Temp.: 27±2°C Time: 5–7 Days			
Analysis	Positive: Colour change, red to yellow, colony formation Negative: No colour change, no colony formation					

14.2 Brief overview: Detection of beer spoiling bacteria using NBB®-B Broth

	Yeast samples (tube)	Yeast samples (swing top bottle 50 ml)	CO ₂ & compressed air
Sample volume	0.1–0.3 ml of yeast or swab sample	0.25–0.75 ml yeast sample	Approx. 10 ml NBB®-B Broth with individual volume of CO ₂ /compressed air (15 seconds)
Incubation conditions	Temp.: 27±2°C Time: 5 days		
Analysis	Positive: Colour change, red to yellow, clear turbidity (gas formation) Negative: No colour change, no turbidity		

14.3 Brief overview: Detection of beer spoiling bacteria using NBB®-C Concentrate

	Turbid beer samples	Wort samples				Yeast samples (alternative protocol)
Sample volume	Variable (example: at a total volume of 180 ml, approx. 100–170 ml of beer sample, depending on selectivity)	Variable Example for 200 ml swing top bottle. The volume needs to be adapted to the bottle volume.				10 ml yeast suspension (see p. 37)
		Wort	Sterile water	NBB®-C Concentrate	Pasteurised beer	
		ca. 50 ml	ca. 20 ml	ca. 10 ml	ca. 130 ml (filled to the top)	
Incubation conditions	Temp.: 27±2°C Time: 7–12 days					Temp.: 27±2°C Time: 5–12 days
Analysis	Positive: Microscopic detection: In 16 microscopic fields at a magnification of 600, significantly more than 1 beer spoiling microorganism in each field of view. Negative: Less than 1 bacteria cell per field of view can be microscopically detected.					

14.4. Glossary (in alphabetical order)

Differentiation	The process of identifying bacteria on the basis of their biochemical or genetic properties down to their genus and species names, e.g. <i>Lactobacillus brevis</i> .
Inert	Is an object that behaves in a stable and non-chemically-reactive way under certain conditions.
Incubation	The process of incubating culture media under defined conditions and parameters (e.g. in terms of time and temperature).
Peleus ball	A rubber ball with valves used for sucking in and discharging liquids from glass or plastic pipettes.
Qualitative detection	Detection based on a yes/no statement, i.e. the sample does or does not contain microorganisms.
Quantitative detection	Detection based on a value-based analysis i.e. the number of microorganisms in a sample can be determined.
Serological pipette	Pipette usually made out of plastic or glass used for transferring liquids. The scale featured on the pipette displays the volume. Plastic pipettes are usually available in individual, sterile packaging.
Sterile	Sterile means free from bacteria and living microorganisms.

15. Supply sources

Döhler provides you with various solutions for your quality control:

Article no.	Product	Packaging unit
2.04709.782	NBB®-A Agar	1x cardboard box (9x 250 ml in bottle)
2.04710.782	NBB®-B Broth	1x cardboard box (9x 250 ml in in bottle)
2.04723.646	NBB®-B Broth (tubes)	1x polystyrene box (20x 10 ml in tubes)
2.04711.782	NBB®-C Concentrate	1x cardboard box (9x 250 ml in bottle)

Sterile wooden swabs are also available as accessories:

Article no.	Product	Packaging unit
2.04725.244	sterile (wooden) swabs (individually packaged)	100 pc./package

All labware can be obtained from a laboratory supplier.

| 16. Information

16.1. Trademarks

NBB® and Doehler Microsafety Design® are both trademarks of Doehler GmbH that are registered and protected worldwide.

15.2. Distribution

You can find more information about our Doehler Microsafety Design® product portfolio on the website www.doehler-dmd.com.

Email contact: dmd@doehler.com

15.3. Recommended further reading

Back, W.: Colour Atlas and Handbook of Beverage Biology, Fachverlag Hans Carl, Nuremberg, 2005.

Back, W. (pub.): [Selected chapters of brewing technology, second updated edition, p. 319 seq., Fachverlag Hans Carl, Nuremberg, 2008.]

| Inhaltsverzeichnis

Deutsch

	Seite
1. Einleitung: Mikrobielle Qualitätskontrolle in der Brauerei mit NBB®-A, NBB®-B und NBB®-C	50
2. NBB®-A, NBB®-B und NBB®-C: Verpackungsformate	52
3. Lagerung	53
4. Verwendungszweck	53
5. Sicherheitsbestimmungen	53
6. Qualitätskontrolle	54
7. Ihre Vorteile durch die gebrauchsfertigen Medien: NBB®-A, NBB®-B und NBB®-C	54
8. Equipment zur Durchführung (nicht enthalten)	54
9. Wichtige Hinweise	58
10. Protokolle NBB®-A Agar	58
10.1. NBB®-A Agar: Vorbereitung von Agarplatten	59
10.1.1. Verflüssigen von NBB®-A Agar	59
10.1.2. Plattengießen aus NBB®-A Agar	60
10.2. NBB®-A Agar: Nachweis von bierschädigenden Bakterien mittels Membranfiltration	61
10.2.1. Membranfiltration von klaren Bierproben	61
10.2.2. Inkubation NBB®-A Agarplatten	62
10.2.3. Evaluation NBB®-A Agarplatten mit Membranfilter	62
10.3. NBB®-A Agar: Nachweis von bierschädigenden Bakterien mittels Ausplattierungs- oder Ausstrichverfahren	63
10.3.1. Ausplattierung oder Ausstrich auf NBB®-A Agar	63
10.3.2. Inkubation NBB®-A Agarplatten	64
10.3.3. Evaluation NBB®-A Agarplatten	64
10.4. NBB®-A Agar: Nachweis von bierschädigenden Bakterien aus Luftproben	65
10.4.1. Luftprobennahme mit NBB®-A Agar	65
10.4.2. Inkubation NBB®-A Agarplatten	65
10.4.3. Evaluation NBB®-A Agarplatten	65
10.5. NBB®-A Agar: Nachweis von bierschädigenden Bakterien aus CO ₂ und Druckluft	66
10.5.1. Probennahme aus CO ₂ bzw. Druckluft mit NBB®-A Agar	66
10.5.2. Membranfiltration	66
10.5.3. Inkubation NBB®-A Agarplatten	67
10.5.4. Evaluation NBB®-A Agarplatten mit Membranfilter	67
10.6. NBB®-A Agar: Nachweis von bierschädigenden Bakterien mittels Gussplattenverfahren	68
10.6.1. Verflüssigen von NBB®-A Agar	68
10.6.2. Plattengießen aus NBB®-A Agar	69
10.6.3. Inkubation NBB®-A Agargussplatten	70
10.6.4. Evaluation NBB®-A Agargussplatten	70

	Seite
11. Protokolle NBB®-B Bouillon	70
11.1. NBB®-B Bouillon: Nachweis von bierschädigenden Bakterien aus Hefeproben in Röhrchen	71
11.1.1. Vorbereitung von NBB®-B Bouillon Röhrchen	71
11.1.2. Probennahme von Hefe in NBB®-B Bouillon Röhrchen	71
11.1.3. Inkubation NBB®-B Bouillon Röhrchen	72
11.1.4. Evaluation NBB®-B Bouillon Röhrchen	73
11.2. NBB®-B Bouillon: Nachweis von bierschädigenden Bakterien aus Hefeproben in Bügelverschlussflaschen	73
11.2.1. Hefezugabe in Bügelverschlussflaschen	73
11.2.2. NBB®-B Bouillon Zugabe in Bügelverschlussflaschen	73
11.2.3. Inkubation NBB®-B Bouillon Bügelverschlussflaschen	74
11.2.4. Evaluation NBB®-B Bouillon Bügelverschlussflaschen	74
11.3. NBB®-B Bouillon: Nachweis von bierschädigenden Bakterien aus CO ₂ und Druckluft	74
11.3.1. Vorbereitung von NBB®-B Bouillon Röhrchen	74
11.3.2. Probennahme CO ₂ bzw. Druckluft mit NBB®-B Bouillon	75
11.3.3. Inkubation NBB®-B Bouillon Röhrchen	75
11.3.4. Evaluation NBB®-B Bouillon Röhrchen	75
12. Protokolle NBB®-C Konzentrat	76
12.1. NBB®-C Konzentrat: Anreicherung von bierschädigenden Bakterien aus trüben Bierproben	76
12.1.1. NBB®-C Konzentrat: Vorbereitung von Bügelverschlussflaschen	76
12.1.2. Ansetzen der Anreicherung mit NBB®-C Konzentrat in Bügelverschlussflaschen oder Bierflaschen	77
12.1.3. Inkubation NBB®-C Konzentrat	78
12.1.4. Evaluation NBB®-C Konzentrat	79
12.2. NBB®-C Konzentrat: Anreicherung von bierschädigenden Bakterien aus Würzproben	80
12.2.1. NBB®-C Konzentrat: Vorbereitung von Bügelverschlussflaschen	80
12.2.2. NBB®-C Konzentrat: Anreicherung von bierschädigenden Bakterien in Würzproben in Bügelverschlussflaschen	80
12.2.3. Inkubation NBB®-C Konzentrat	81
12.2.4. Evaluation NBB®-C Konzentrat	81
12.3. NBB®-C Konzentrat: Anreicherung von bierschädigenden Bakterien aus Hefeproben (Alternatives Protokoll)	82
12.3.1. NBB®-C Konzentrat: Vorbereitung Probenanreicherung	82
12.3.2. Inkubation NBB®-C Konzentrat Hefeproben	82
12.3.3. Evaluation NBB®-C Konzentrat Hefeproben	83

	Seite
13. Häufige Fragen zur Anwendung und zur Bewertung von Ergebnissen	84
13.1. NBB®-A Agar	84
13.2. NBB®-B Bouillon	85
13.3. NBB®-C Konzentrat	86
14. Appendix:	87
14.1. Schnellübersicht: NBB®-A Agar Nachweis von bierschädigenden Bakterien	87
14.2. Schnellübersicht: NBB®-B Bouillon Nachweis von bierschädigenden Bakterien	88
14.3. Schnellübersicht: NBB®-C Konzentrat Nachweis von bierschädigenden Bakterien	88
14.4. Glossar (alphabetisch)	89
15. Bezugsquellen	90
16. Informationen	91
16.1. Trademarks	91
16.2. Vertrieb	91
16.3. Literaturempfehlung	91

1. Einleitung: Mikrobielle Qualitätskontrolle in der Brauerei mit NBB®-A, NBB®-B und NBB®-C

Die Herstellung von mikrobiologisch einwandfreiem Bier ist die zentrale Aufgabe einer Brauerei. Allerdings können bierschädigende Bakterien die Gärung beeinträchtigen oder das Bier geschmacklich negativ beeinflussen. Die mikrobiologische Kontrolle des Brauprozesses ist daher von entscheidender Bedeutung. **NBB®**-Produkte ermöglichen eine einfache, schnelle und umfassende mikrobiologische Kontrolle für viele Proben des Brauprozesses (siehe Abbildung 1).

Grampositive Milchsäurebakterien wie *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus lindneri* und *Pediococcus damnosus* sind für ca. 70 – 80% der Kontaminationen in Brauereien verantwortlich. Darüber hinaus verursachen gramnegative Bakterien wie *Pectinatus* spp. und *Megasphaera* spp. etwa 3 – 7% der mikrobiellen Kontaminationen und bilden zusammen mit den Milchsäurebakterien die wesentliche Gruppe der obligat bierschädigenden Bakterien.

Bierschädigende Bakterien können in (Spül-)Wasser, in Bier, in CO₂- oder Druckluftanlagen sowie in der Umgebungsluft mit **NBB®-A** Agar quantitativ detektiert werden. Die Brauhefe kann mit **NBB®-B** Bouillon auf mikrobiologische Kontamination qualitativ analysiert werden, damit bierschädigende Bakterien vor Beginn der Gärung erkannt werden können. Die mikrobiologische Nachweise mit **NBB®-A** Agar und **NBB®-B** Bouillon sind meist schon durch einen Farbumschlag von rot nach gelb, auch ohne intensive Vorkenntnisse, sicher und einfach zu erkennen.

Durch Zugabe von **NBB®-C** Konzentrat in trübe Bierproben oder Zwickelproben werden bierschädigende Bakterien angereichert. Zudem können diese in Würzeproben durch Zugabe von sterilem Bier und **NBB®-C** Konzentrat vermehrt werden. Die Proben können nach der Inkubation mit einem Mikroskop ausgewertet werden. Das Zusammenspiel von **NBB®-A** Agar, **NBB®-B** Bouillon und **NBB®-C** Konzentrat ermöglicht eine vollständige mikrobiologische Kontrolle des Brauprozesses. Selbst vorhandene mikrobielle Spurenkontaminationen können erfolgreich nachgewiesen werden. Das Risiko von mikrobiologisch beeinträchtigten Bieren wird damit gemindert und die Effizienz in der Brauerei gesteigert.

Die **NBB®**-Produkte werden seit 30 Jahren erfolgreich für die Qualitätssicherung in Brauereien weltweit eingesetzt und sind in verschiedenen Standardmethodensammlungen wie MEBAK und EBC etabliert.

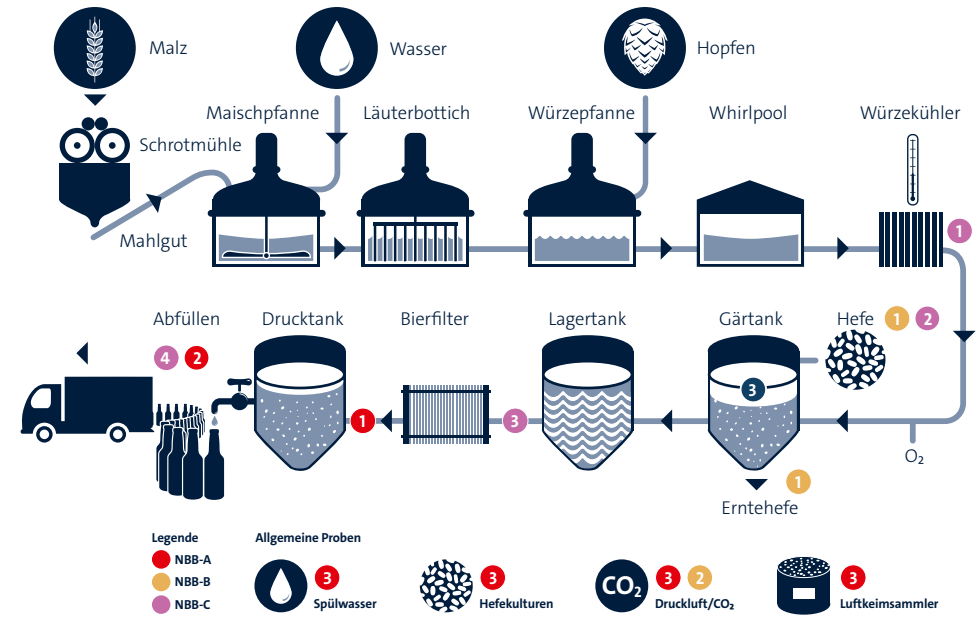


Abbildung 1: Übersicht über die mikrobiellen Analysemöglichkeiten des Brauprozesses mit dem **NBB®**-Produktportfolio.

Übersicht über die Nachweismöglichkeiten von bierschädigenden Bakterien mit dem **NBB®**-Produktportfolio:

Markierung	Probetypen	Methoden	NBB®-Produkt
1 2	Klare Bierproben/(Spül-)Wasser	Membranfiltration & Gussplattenverfahren	NBB®-A Agar
3	Hefekulturen (Reinzucht-, Anstell-, Erntehefen)	Ausstrich oder Ausplattierung auf Agar	NBB®-A Agar
3	Luft	Luftkeimsammlung auf Agar	NBB®-A Agar
3 2	CO ₂ und Druckluft	Einblasen in steriles Wasser und Membranfiltration auf Agar oder direkte Begasung in Bouillon	NBB®-A Agar NBB®-B Bouillon
1 2	Hefeproben	Anreicherung mit Bouillon oder Anreicherung mit Konzentrat	NBB®-B Bouillon NBB®-C Konzentrat
3 4	Trübe Bierproben	Anreicherung mit Konzentrat	NBB®-C Konzentrat
1	Würzeproben	Anreicherung mit Konzentrat (mit Bierzusatz)	NBB®-C Konzentrat

2. NBB[®]-A, NBB[®]-B und NBB[®]-C: Verpackungsformate



2.04709.782



2.04723.646 / 2.04710.782



2.04711.782

Art.-Nr.	Döhler Microsafety Design [®] - Produktformat	Beschreibung	Zielkeim(e)	Verpackungs- einheit
2.04709.782	NBB[®]-A Agar (Flasche)	Zur Analyse von klaren Bierproben (Membranfiltration), Gussplattenverfahren, Plattierungs- & Ausstrichverfahren sowie CO ₂ und Druckluft (zuvor Einblasen in steriles Wasser). Gebrauchsfertiger NBB[®]-A Agar zur Detektion von bierschädigenden Bakterien mittels Farbumschlag.	Bierschädigende Bakterien: z. B. <i>Lactobacillus</i> spp., <i>Pediococcus</i> spp., <i>Pectinatus</i> spp. & <i>Megasphaera</i> spp.	1 Karton (9x 250 ml NBB[®]-A Agar Flasche)
2.04723.646	NBB[®]-B Bouillon (Röhrchen)	Zur Analyse von Anstell- und Erntehefe sowie CO ₂ und Druckluft. Gebrauchsfertige NBB[®]-B Bouillon zur		1 Styroporbox (20x 10 ml NBB[®]-B Bouillon Röhrchen)
2.04710.782	NBB[®]-B Bouillon (Flasche)	Detektion von bierschädigenden Bakterien mittels Farbumschlag.		1 Karton (9x 250 ml NBB[®]-B Bouillon Flasche)
2.04711.782	NBB[®]-C Konzentrat (Flasche)	Zur Anreicherung von (hefe-) trüben Bierproben. Gebrauchsfertiges NBB[®]-C Konzentrat zur Detektion von bierschädigenden Bakterien mittels Mikroskopie.		1 Karton (9x 250 ml NBB[®]-C Konzentrat Flasche)

3. Lagerung

NBB[®]-A Agar, **NBB[®]-B** Bouillon und **NBB[®]-C** Konzentrat müssen bei +4 °C bis +8 °C lichtgeschützt und trocken gelagert werden. Die Produkte dürfen nicht eingefroren werden. Das Mindesthaltbarkeitsdatum befindet sich auf dem Etikett der Verpackung (siehe Produktaufdruck).

4. Verwendungszweck

NBB[®]-A Agar, **NBB[®]-B** Bouillon und **NBB[®]-C** Konzentrat sind für den Nachweis von bierschädigenden Bakterien in der Brauerei vorgesehen.

Bei der Anwendung empfehlen wir, auf die nachfolgenden Sicherheitsbestimmungen zu achten und besonders sorgfältig und sauber zu arbeiten, um Sekundärkontaminationen bei der Probenentnahme zu vermeiden.

5. Sicherheitsbestimmungen

Die Grundregeln des mikrobiologischen Arbeitens sind bei der Verwendung dieser Produkte zu beachten. Dies beinhaltet eine saubere Ausrüstung wie Laborkittel, Schutzbrille und Handschuhe. Diese Ausrüstung dient neben dem Eigenschutz auch zur Vermeidung von Sekundärkontaminationen durch den Anwender. Die Sicherheitsdatenblätter erhalten Sie über www.doehler-dmd.com.

NBB[®]-A Agar, **NBB[®]-B** Bouillon und **NBB[®]-C** Konzentrat sind grundsätzlich nicht für den Verzehr geeignet.



Im Umgang mit einem Bunsenbrenner ist besondere Vorsicht erforderlich, wenn man mit Latexhandschuhen arbeitet. Daher immer einen ausreichenden Sicherheitsabstand zur Flamme einhalten. Brennende Handschuhe können zu schwerwiegenden Verletzungen führen.



Brandgefahr: Alkohol zur Entkeimung/Dekontamination niemals bei offenem Feuer (Bunsenbrenner) einsetzen.

6. Qualitätskontrolle

Die Qualität von **NBB®-A** Agar, **NBB®-B** Bouillon und **NBB®-C** Konzentrat wird sorgfältig geprüft. Insbesondere die Funktionalität der Kulturmedien wird mit bierschädigenden Bakterien gezielt getestet, sichergestellt und regelmäßig an der Technischen Universität München – Weihenstephan kontrolliert. Ein Analysenzertifikat können Sie über die Döhler GmbH erhalten.

7. Ihre Vorteile durch die gebrauchsfertigen Medien: NBB®-A, NBB®-B und NBB®-C

NBB®-A Agar, **NBB®-B** Bouillon und **NBB®-C** Konzentrat sind gebrauchsfertige Kulturmedien. Somit entfallen aufwendige Vorbereitungen wie das Wiegen und Lösen von Chemikalien, die Einstellung von pH-Werten und eine anschließende Autoklavierung. Die Qualitätskontrolle der Kulturmedien auf Funktion ist ebenfalls bereits vorgenommen worden. Sie sparen somit Zeit und Geld, so dass Sie sich direkt auf die mikrobiologische Qualitätskontrolle konzentrieren können.

8. Equipment zur Durchführung

Für die Verwendung von **NBB®-A** Agar, **NBB®-B** Bouillon und **NBB®-C** Konzentrat werden die nachfolgenden Gegenstände zur Durchführung der Experimente empfohlen:

Allgemeine Laborgegenstände	Verwendung
Mobiler Bunsenbrenner	Bunsenbrenner erzeugen durch ihre Flamme einen sterilen Arbeitsbereich (ca. 50 cm um die Flamme). In diesem können mikrobiologische Experimente durchgeführt werden. Die Hitze tötet die Keime in der unmittelbaren Umgebung ab. Zudem ist der Bunsenbrenner ein Hilfsmittel zur sterilen Probenentnahme.

Allgemeine Laborgegenstände	Verwendung
Sterile (serologische) Pipette (1 – 10 ml) mit Pipettierhilfe (z. B. Peleusball oder Pipettierhilfe aus Kunststoff)	(Serologische) Pipetten eignen sich zur sterilen Überführung von Flüssigkeiten.  Achtung: Niemals Flüssigkeiten mit dem Mund pipettieren! Unbedingt eine Pipettierhilfe verwenden!
Inkubator mit Thermostat	Zur Inkubation von Proben bei definierten Temperaturen.
Einweghandschuhe	Einweghandschuhe zur Vermeidung von Sekundärkontaminationen durch den Anwender.
Sterile Werkbank	Innerhalb einer sterilen Werkbank besteht eine sterile Arbeitsumgebung. Essentielle Laborausstattung für das sterile Arbeiten.
Laborgefäße (z. B. Duran® Glasflaschen)	Inerte und autoklavierbare Gefäße zur Probennahme.
Anaerobiosetopf (inkl. CO₂-Begasung)	Zur Inkubation von Proben unter anaeroben Bedingungen.
Autoklav	Standardlaborgerät zum Sterilisieren von Labormaterialien.
70%ige Alkohollösung	Zum Dekontaminieren von Oberflächen und Geräten. Zusammengesetzt aus 30% destilliertem, entionisiertem Wasser und 70% Ethanol.

Laborgegenstand für NBB®-A Agar	Verwendung
Wasserbad	Wasserbad mit Temperaturkontrolle zum schonenden Verflüssigen von NBB®-A Agar.
Luftkeimsammler (nach Bedarf)	Luftkeimsammler, welcher mit Petrischalen bestückt werden kann. Das Luftvolumen sollte variabel angepasst werden können.
Membranfiltrationsanlage	Zur Filtration von Flüssigkeiten mit sterilen Membranfiltern unterschiedlicher Porengröße (z. B. 0,45 µm).
Sterile Pinzette	Pinzette aus Edelstahl, die in Glasgefäßen autoklaviert werden kann. Zum sterilen Überführen von Membranfiltern.
Drigalskispatel oder Impföse	Einmal- oder wiederverwendbare Laborgegenstände zum Ausplattieren bzw. Ausstreichen von Mikroorganismen. Wiederverwendbare Spatel (Edelstahl) bzw. Ösen (Platindraht) müssen durch Abflammen vor der Anwendung sterilisiert werden.
Sterile Petrischalen mit Nocken	Sterile Petrischalen können im Laborfachhandel bezogen werden. Die Nocken ermöglichen den Gasaustausch.

Laborgegenstand für NBB®-B Bouillon	Verwendung
Steriler Tupfer	Steriler (Holz-)Tupfer mit Wattekopf meist steril und einzelverpackt erhältlich (siehe Kapitel 15, S. 90)
Transparente Bügelverschlussflasche	Bügelverschlussflaschen sind in verschiedenen Volumina erhältlich. Für NBB®-B Bouillon werden 50 ml Bügelverschlussflaschen benötigt. Zur Erkennung des Farbumschlags sind transparente Flaschen notwendig. Zur Autoklavierung sollten Edelstahlbügel verwendet werden. (Bezugsquelle: Laborhändler z. B. VWR)

Laborgegenstand für NBB®-B Bouillon	Verwendung
Reagenzgläser mit Schraubdeckel	Inerte und autoklavierbare Gefäße, die in verschiedenen Volumina erhältlich sind. Der Schraubdeckel ermöglicht leichtes bis festes Verschließen. Nicht notwendig bei der Verwendung von NBB®-B Bouillon Rührchen (2.04723.646).
Reagenzglashalter	Halterung für NBB®-B Bouillon Rührchen.

Laborgegenstand für NBB®-C Konzentrat	Verwendung
Transparente Bügelverschlussflasche	Bügelverschlussflaschen sind in verschiedenen Volumina erhältlich. Für NBB®-C Konzentrat werden 200 ml Bügelverschlussflaschen benötigt. Zur Autoklavierung sollten Edelstahlbügel verwendet werden. (Bezugsquelle: Laborhändler z. B. VWR)
Schüttler	Laborgerät zum Schütteln von mikrobiellen Kulturgefäßen, das in der Rotationsfrequenz kontrolliert werden kann.
Erlenmeyerkolben mit Wattestopfen	Inerte und autoklavierbare Laborgefäße mit mindestens 200 ml Fassungsvermögen.

9. Wichtige Hinweise

Grundlage für alle Analysen ist das saubere mikrobiologische Arbeiten. Um sichere Ergebnisse zu erhalten, wird dringend empfohlen, die Sicherheitshinweise zu beachten und die nachfolgenden Arbeitsschritte (siehe Protokolle, ab S. 58) zu befolgen.

NBB®-A Agar, **NBB®-B** Bouillon und **NBB®-C** Konzentrat sind nicht zum Verzehr geeignet.

Nach der Analyse sollten die bebrüteten Kulturmedien inaktiviert werden, bevor diese entsorgt werden. Zur Inaktivierung der Keime wird das Autoklavieren der Kulturmedien oder die Entsorgung als Sondermüll empfohlen.

10. Protokolle NBB®-A Agar

DMD®-Produkt	Vorbereitung	Anwendung	Frequenz	Protokoll
NBB®-A Agar	Vorbereitung von Agarplatten (vgl. Protokoll 10.1.)	Membranfiltration klarer Bierproben oder Wasser	regelmäßig (je Produktion)	10.2.
		Ausstrich- und Ausplattierungsverfahren	nach Bedarf	10.3.
		Luftkeimsammlung	monatlich/nach Bedarf	10.4.
		CO ₂ - und Druckluftbeprobung	gelegentlich (zur Analyse von Kontaminationsquellen)	10.5.
	Keine Vorbereitung	Gussplattenverfahren	nach Bedarf	10.6.

10.1. NBB®-A Agar: Vorbereitung von Agarplatten



10.1.1. Verflüssigen von NBB®-A Agar

Verflüssigen Sie eine entsprechende Anzahl **NBB®-A** Agarflaschen für Ihre Versuche in einem Wasserbad bei ca. 95 °C. Die Verflüssigung einer Flasche **NBB®-A** Agar dauert ca. 40–45 min.

Lassen Sie den flüssigen **NBB®-A** Agar auf ca. 45–50 °C abkühlen, so dass Sie die Flaschen ohne Verbrennungsgefahr anfassen können. Achten Sie darauf, dass der Agar beim Abkühlen nicht wieder fest wird.



Achtung:

Bewahren Sie verflüssigten NBB®-A Agar niemals länger als 4 h bei 45 °C in einem Wasserbad auf. Dies schädigt die Agarstruktur und verändert seine Verfestigungseigenschaften nachhaltig. Vermeiden Sie daher auch langes bzw. mehrfaches Verflüssigen bei 95 °C, da die Wachstumsstoffe sonst geschädigt werden.

Verwenden Sie keine Mikrowellen zum Verflüssigen von NBB®-A Agar. Aufgrund des Metalldeckels der Flasche besteht Brandgefahr. Durch punktuell Überhitzen werden zudem Inhaltsstoffe zerstört.



10.1.2. Plattengießen aus NBB®-A Agar

Begeben Sie sich mit den auf 45 °C abgekühlten Flaschen unter eine sterile Werkbank und legen Sie sich die gewünschte Anzahl an leeren Petrischalen mit Nocken zurecht. Achten Sie darauf, welche Petrischalendurchmesser für die nachfolgenden Versuche benötigt werden.

Homogenisieren Sie den **NBB®-A** Agar durch leichtes Schwenken der Flasche. Gießen Sie je nach Bedarf **NBB®-A** Agarplatten. Es ist zu empfehlen möglichst eine komplette Flasche **NBB®-A** Agar in Petrischalen zu gießen. Ein mehrmaliges Erhitzen der **NBB®-A** Agarflasche schädigt Inhaltsstoffe und führt zu schlechteren Ergebnissen.

Petrischalendurchmesser	Füllvolumen mit NBB®-A Agar	Plattenanzahl aus einer Flasche NBB®-A Agar
5,5 cm	10 ml	25 Stück
9 cm	31 ml	8 Stück
14 cm	62 ml	4 Stück

Gegossene **NBB®-A** Agarplatten sollten zum Abkühlen gestapelt werden, um Kondenswasserbildung vorzubeugen.

NBB®-A Agarplatten können für ca. 1 Woche bei +4 °C bis +8 °C dunkel gelagert werden. Es wird empfohlen, die Platten umgedreht zu lagern.

Vor der Verwendung sollten die **NBB®-A** Agarplatten unter einer sterilen Werkbank getrocknet werden, so dass etwaiges Kondenswasser entfernt wird.

10.2. NBB®-A Agar: Nachweis von bierschädigenden Bakterien mittels Membranfiltration



10.2.1. Membranfiltration von klaren Bierproben

Definieren Sie ein geeignetes Volumen einer klaren Bierprobe, die Sie untersuchen möchten.

Verwenden Sie Ihre Membranfiltrationsanlage zur Filtration der klaren Bierprobe auf einen geeigneten Membranfilter. Beachten Sie die Herstellerinformationen der Membranfiltrationsanlage. Bei strikt anaeroben bierschädigenden Bakterien (z. B. *Pectinatus* spp.) sollte der Filter mit CO₂ kurz nachgespült werden, um Sauerstoff aus dem Filter zu entfernen.



Beschriften Sie ihre **NBB®-A** Agarplatten.

Überführen Sie anschließend den Membranfilter mit einer sterilen Pinzette auf eine **NBB®-A** Agarplatte.

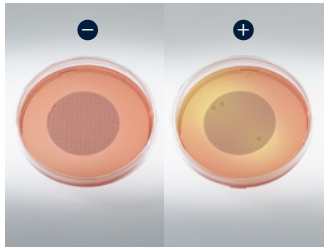
Legen Sie den Membranfilter luftblasenfrei auf die Oberfläche der **NBB®-A** Agarplatte.



10.2.2. Inkubation NBB®-A Agarplatten

Inkubieren Sie die **NBB®-A** Agarplatten mit Membranfilter unter anaeroben Bedingungen (z. B. in einem Anaerobiosetopf) für 5–7 Tage bei 27°C ± 2°C in einem Inkubator.

Für manche langsam wachsenden, bierschädigenden Bakterien (z. B.: *Lactobacillus lindneri*) muss die Inkubationszeit verlängert werden.



10.2.3. Evaluation NBB®-A Agarplatten mit Membranfilter

Eine Farbänderung von rot nach gelb zeigt das Wachstum von typischen bierschädigenden Bakterien auf **NBB®-A** Agarplatten mit Membranfilter an.

Weiterführende Analysetechniken, wie z. B. Mikroskopie oder PCR-Analyse, können zur Identifizierung der Bakterien verwendet werden.

10.3. NBB®-A Agar: Nachweis von bierschädigenden Bakterien mittels Ausplattierungs- oder Ausstrichverfahren



10.3.1. Ausplattierung oder Ausstrich auf NBB®-A Agar

Beschriften Sie die **NBB®-A** Agarplatten für diesen Versuch.

A) Methode: Ausplattieren

Pipettieren Sie unter einer sterilen Werkbank maximal 150 µl Ihrer (Hefe-)Probe auf die **NBB®-A** Agarplatte. Verwenden Sie einen sterilen Drigalskispatel, um die Probe gleichmäßig auf der Agarplatte zu verteilen.

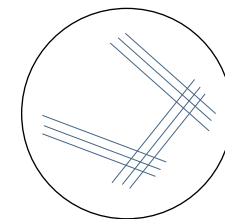


B) Methode: Ausstrich (z. B. Kulturen)

Nehmen Sie eine sterile Impföse und tauchen Sie diese einmal kurz in eine homogene (Hefe-)Kultur ein.

Streichen Sie mit dieser Impföse die Mikroorganismen auf einer **NBB®-A** Agarplatte aus.

Mithilfe des nachfolgenden Ausstrichmusters können Sie Mikroorganismen vereinzeln, d. h. einzelne Kolonien von Mikroorganismen erhalten. Verwenden Sie für alle Ausstrichlinien die Impföse ohne diese erneut in die Kultur einzutauchen. Flammen Sie bei wiederverwendbaren Impfösen zwischen den Strichen ab bzw. verwenden Sie eine neue Einmalimpföse.



Achtung:

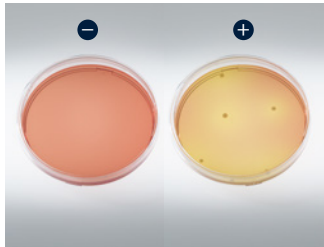
Verwenden Sie für jede neue Kultur oder **NBB®-A** Agarplatte immer eine neue sterile Impföse oder flammen Sie die wiederverwendbare Impföse ab, um Sekundärkontaminationen zu vermeiden.



10.3.2. Inkubation NBB®-A Agarplatten

Inkubieren Sie die **NBB®-A** Agarplatten unter anaeroben Bedingungen (z. B. in einem Anaerobiosetopf) für 5–7 Tage bei 27°C ± 2°C in einem Inkubator.

Für manche langsam wachsenden, bierschädigenden Bakterien (z. B.: *Lactobacillus lindneri*) muss die Inkubationszeit ggf. verlängert werden.

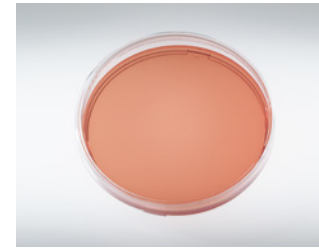


10.3.3. Evaluation NBB®-A Agarplatten

Eine Farbänderung von rot nach gelb zeigt das Wachstum von typischen bierschädigenden Bakterien auf **NBB®-A** (siehe linkes Bild: ausplattierte Probe mit negativem und positivem Befund) an.

Weiterführende Analysetechniken, wie z. B. Mikroskopie oder PCR-Analyse, können zur Identifizierung der Bakterien verwendet werden.

10.4. NBB®-A Agar: Nachweis von bierschädigenden Bakterien aus Luftproben



10.4.1. Luftprobennahme mit NBB®-A Agar

Stellen Sie fest, welche Agarplattendurchmesser mit Ihrem Luftkeimsammler verwendet werden können. Es sind verschiedene Luftkeimsammler für Agarplatten im Handel erhältlich.

Beschriften Sie geeignete **NBB®-A** Agarplatten für diesen Versuch.

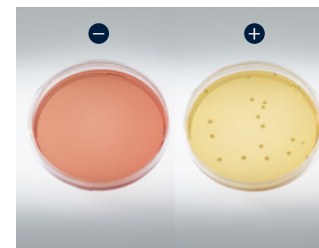
Verwenden Sie Ihren Luftkeimsammler nach den Herstellerangaben und sammeln Sie das gewünschte Volumen an Umgebungsluft auf der Platte.



10.4.2. Inkubation NBB®-A Agarplatten

Inkubieren Sie die **NBB®-A** Agarplatten unter anaeroben Bedingungen (z. B. in einem Anaerobiosetopf) für 5 Tage bei 27°C ± 2°C in einem Inkubator.

Nach mehr als 5 Tagen Inkubation werden auch unspezifische Mikroorganismen angereichert, die keine obligat bierschädigenden Bakterien sind. Werten Sie daher die **NBB®-A** Agarplatten unbedingt nach 5 Tagen aus.



10.4.3. Evaluation NBB®-A Agarplatten

Eine Farbänderung von rot nach gelb zeigt das Wachstum von typischen bierschädigenden Bakterien auf **NBB®-A** Agarplatten an.

Weiterführende Analysetechniken, wie z. B. Mikroskopie oder PCR-Analyse, können zur Identifizierung der Bakterien verwendet werden

10.5. NBB[®]-A Agar: Nachweis von bierschädigenden Bakterien aus CO₂ und Druckluft

10.5.1. Probenahme aus CO₂ bzw. Druckluft mit NBB[®]-A Agar

Befüllen Sie eine sterile Flasche oder ein steriles Gefäß mit ca. 50 ml sterilem Wasser.

Dekontaminieren Sie den Auslass der Druckluft bzw. CO₂-Anlage mit 70%iger Alkohollösung.

Anschließend führen Sie den Auslass in das sterile Wasser ein. Lassen Sie langsam Druckluft bzw. CO₂ für ca. 15 Sekunden in das Wasser einströmen, dabei sollten Sie kein Gas vorschießen lassen. Die meisten Bakterien befinden sich meist im Rückraum des Probenhahns.



10.5.2. Membranfiltration

Verwenden Sie Ihre Membranfiltrationsanlage zur Filtration des begasten Wassers aus 10.5.1. auf einen geeigneten Membranfilter. Beachten Sie die Herstellerinformationen der Membranfiltrationsanlage. Bei strikt anaeroben bierschädigenden Bakterien (z. B. *Pectinatus* spp.) sollte der Membranfilter mit CO₂ kurz nachgespült werden, um Sauerstoff aus dem Filter zu entfernen.



Beschriften Sie die **NBB[®]-A** Agarplatten.

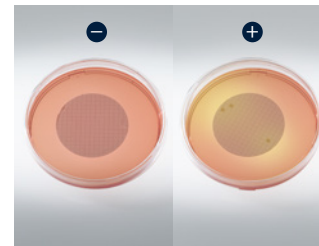
Überführen Sie den verwendeten Membranfilter mit einer sterilen Pinzette auf eine **NBB[®]-A** Agarplatte. Legen Sie den Membranfilter luftblasenfrei auf die Oberfläche der **NBB[®]-A** Agarplatte.



10.5.3. Inkubation NBB[®]-A Agarplatten

Inkubieren Sie die **NBB[®]-A** Agarplatten mit Membranfilter unter anaeroben Bedingungen (z. B. in einem Anaerobiosetopf) für 5–7 Tage bei 27°C ± 2°C in einem Inkubator.

Für manche langsam wachsenden, bierschädigenden Bakterien (z. B.: *Lactobacillus lindneri*) muss die Inkubationszeit ggf. verlängert werden.



10.5.4. Evaluation NBB[®]-A Agarplatten mit Membranfilter

Eine Farbänderung von rot nach gelb zeigt das Wachstum von typischen bierschädigenden Bakterien auf **NBB[®]-A** Agarplatten mit Membranfilter an.

Weiterführende Analysetechniken, wie z. B. Mikroskopie oder PCR-Analyse, können zur Identifizierung der Bakterien verwendet werden.

10.6. NBB®-A Agar: Vorbereitung von Agarplatten



10.6.1. Verflüssigen von NBB®-A Agar

Verflüssigen Sie eine entsprechende Menge **NBB®-A** Agar für Ihre Versuche in einem Wasserbad bei ca. 95°C. Die Verflüssigung einer Flasche **NBB®-A** Agar dauert ca. 40–45 min.

Lassen Sie den flüssigen **NBB®-A** Agar auf ca. 45°C–50°C abkühlen, so dass Sie die Flaschen ohne Verbrennungsgefahr anfassen können. Achten Sie darauf, dass der Agar beim Abkühlen nicht wieder fest wird.



Achtung:

Bewahren Sie verflüssigten NBB®-A Agar niemals länger als 4 h bei 45°C in einem Wasserbad auf. Dies schädigt die Agarstruktur und verändert seine Verfestigungseigenschaften nachhaltig. Vermeiden Sie daher auch langes bzw. mehrfaches Verflüssigen bei 95°C, da die Wachstoffsstoffe sonst geschädigt werden.

Verwenden Sie keine Mikrowellen zum Verflüssigen von NBB®-A Agar. Aufgrund des Metalldeckels der Flasche besteht Brandgefahr. Durch punktuellen Überhitzen werden zudem Inhaltsstoffe zerstört.



10.6.2. Plattengießen aus NBB®-A Agar

Begeben Sie sich mit den auf 45°C abgekühlten Flaschen unter eine sterile Werkbank und legen Sie sich genügend leere Petrischalen mit Nocken zurecht. Achten Sie darauf, dass der verflüssigte Agar nicht zu heiß ist, damit die Keime nicht durch eine zu hohe Agartemperatur abgetötet werden.

Beschriften Sie die Petrischalen.

Legen Sie je nach Petrischalendurchmesser maximal folgende Bierprobenvolumen mit einer Pipette in der Petrischale vor.

Petrischalendurchmesser	Maximales Probenvolumen
9 cm	5 ml
14 cm	10 ml

Homogenisieren Sie den **NBB®-A** Agar durch leichtes Schwenken der Flasche. Füllen Sie mit **NBB®-A** Agar die vorgelegten Probenvolumina auf. Richten Sie das zugegebene **NBB®-A** Agarvolumen nach dem Petrischalendurchmesser.

Petrischalendurchmesser	Füllvolumen mit NBB®-A Agar	Plattenanzahl aus einer Flasche NBB®-A Agar
5,5 cm	10 ml	25 Stück
9 cm	31 ml	8 Stück
14 cm	62 ml	4 Stück

Mischen Sie die **NBB®-A** Agargussplatten durch mehrmaliges, leichtes Rotieren (in Form einer „8“) der Petrischale. Vermeiden Sie dabei, dass der Agar an den Deckel spritzt oder aus der Platte läuft. Tritt dieser Fall dennoch ein, sollte die betroffene Platte entsorgt und anschließend neu angelegt werden.

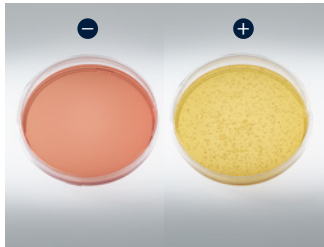
Gegossene **NBB®-A** Agargussplatten sollten zum Abkühlen gestapelt werden, um Kondenswasserbildung vorzubeugen.



10.6.3. Inkubation NBB®-A Agargussplatten

Inkubieren Sie die **NBB®-A** Agargussplatten unter anaeroben Bedingungen (z. B. in einem Anaerobiose-topf) für 5–7 Tage bei 27°C ± 2°C in einem Inkubator.

Für manche langsam wachsenden, bierschädigenden Bakterien (z. B.: *Lactobacillus lindneri*) muss die Inkubationszeit ggf. verlängert werden.



10.6.4. Evaluation NBB®-A Agargussplatten

Eine Farbänderung von rot nach gelb zeigt das Wachstum von typischen bierschädigenden Bakterien auf **NBB®-A** Agargussplatten an.

Weiterführende Analysetechniken, wie z. B. Mikroskopie oder PCR-Analyse, können zur Identifizierung der Bakterien verwendet werden.

11. Protokolle NBB®-B Bouillon

DMD®-Produkt	Anwendung	Frequenz	Protokoll
NBB®-B Bouillon	Hefebeprobung	regelmäßig (je Produktion: z. B. nach Hefeerntee oder vor Hefezugabe)	11.1. & 11.2.
	CO ₂ - und Druckluftbeprobung	monatlich / nach Bedarf	11.3.

11.1. NBB®-B Bouillon: Nachweis von bierschädigenden Bakterien aus Hefeproben in Röhrchen



11.1.1. Vorbereitung von NBB®-B Bouillon Röhrchen

Befüllen Sie ein passendes Reagenzglasröhrchen zu ca. 70 % mit **NBB®-B** Bouillon unter Verwendung einer sterilen serologischen Pipette unter einer sterilen Werkbank oder verwenden Sie bereits vorgefüllte **NBB®-B** Bouillon Röhrchen (Art.-Nr. 2.04723.646).



11.1.2. Probennahme von Hefe in NBB®-B Bouillon Röhrchen

A) Dünflüssige Hefesuspension

Entnehmen Sie mithilfe einer sterilen Pipette 0,1–0,3 ml aus einer pipettierbaren Hefesuspension.



Achtung:

Achten Sie darauf, dass nur die Pipettenspitze mit der Hefesuspension in Kontakt kommt, um Sekundärkontaminationen zu vermeiden.



Geben Sie anschließend die Hefesuspension in das vorbereitete **NBB®-B** Bouillon Röhrchen aus Schritt 11.1.1.

Verschließen Sie das **NBB®-B** Bouillon Röhrchen nicht vollständig, damit CO₂ während der Inkubation entweichen kann.

Beschriften Sie das Röhrchen.



B) Dickbreiige Hefesuspension

Entnehmen Sie mithilfe eines sterilen Abstrichtupfers ca. 0,3 ml der dickbreiigen Hefesuspension.

Transferieren Sie den Abstrichtupfer in das vorbereitete **NBB®-B** Bouillon Röhrchen aus Schritt 11.1.1.

Lösen Sie durch Rühren und leichtes Schütteln die aufgenommene Hefesuspension vom Abstrichtupfer.



Verwerfen Sie anschließend den Abstrichtupfer und verschließen Sie das **NBB®-B** Bouillon Röhrchen nicht vollständig, damit CO₂ während der Inkubation entweichen kann.

Beschriften Sie das Röhrchen.



11.1.3. Inkubation NBB®-B Bouillon Röhrchen

Inkubieren Sie die **NBB®-B** Bouillon Röhrchen mit gelockerten Schraubverschlüssen unter anaeroben Bedingungen (z. B. in einem Anaerobiosetopf) für 5 Tage bei 27°C ± 2°C in einem Inkubator.

Für manche langsam wachsenden, bierschädigenden Bakterien (z. B.: *Lactobacillus lindneri*) muss die Inkubationszeit ggf. verlängert werden.



11.1.4. Evaluation NBB®-B Bouillon Röhrchen

Eine Farbänderung von rot nach gelb zeigt das Wachstum von typischen bierschädigenden Bakterien in **NBB®-B** Bouillon an. Neben Bodensatz und Trübung kann zusätzlich Gasbildung auftreten.

Weiterführende Analysetechniken, wie z. B. Mikroskopie oder PCR-Analyse, können zur Identifizierung der Bakterien verwendet werden.

11.2. NBB®-B Bouillon: Nachweis von bierschädigenden Bakterien aus Hefeproben in Bügelverschlussflaschen



11.2.1. Hefezugabe in Bügelverschlussflaschen

Geben Sie mit einer sterilen Pipette 0,25–0,75 ml Hefesuspension in eine transparente Bügelverschlussflasche (50 ml).

Sollte die Hefe nicht pipettierbar sein, können Sie diese mit einem sterilen Spatel oder durch Schütten in die Flasche überführen.



11.2.2. NBB®-B Bouillon Zugabe in Bügelverschlussflaschen

Pipettieren Sie ca. 25 ml **NBB®-B** Bouillon in die Bügelverschlussflasche mit vorgelegter Hefesuspension.

Verschließen Sie die Bügelverschlussflasche, wobei Sie den Bügelverschluss nur lose auflegen. Dies beugt Bombagen durch Gasbildung vor.

Beschriften Sie die Flasche.



11.2.3. Inkubation NBB[®]-B Bouillon Bügelverschlussflaschen

Inkubieren Sie die **NBB[®]-B** Bouillon Bügelverschlussflasche für 5 Tage bei 27°C ± 2°C in einem Inkubator. Durch die kurzzeitige Angärung der Hefe wird genügend CO₂ für die Bildung einer anaeroben Umgebung produziert. Durch Hemmstoffe wird das Hefewachstum kurz drauf gemindert.

Für manche langsam wachsenden, bierschädigenden Bakterien (z. B.: *Lactobacillus lindneri*) muss die Inkubationszeit ggf. verlängert werden.



11.2.4. Evaluation NBB[®]-B Bouillon Bügelverschlussflaschen

Eine Farbänderung von rot nach gelb zeigt das Wachstum von typischen bierschädigenden Bakterien in **NBB[®]-B** Bouillon an. Zusätzlich kann Trübung und Gasbildung auftreten.

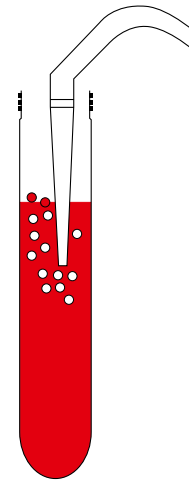
Weiterführende Analysetechniken, wie z. B. Mikroskopie oder PCR-Analyse, können zur Identifizierung der Bakterien verwendet werden.

11.3. NBB[®]-B Bouillon: Nachweis von bierschädigenden Bakterien aus CO₂ und Druckluft



11.3.1. Vorbereitung von NBB[®]-B Bouillon Röhren

Befüllen Sie ein passendes Reagenzglasröhrchen zu ca. 70% mit **NBB[®]-B** Bouillon unter Verwendung einer sterilen serologischen Pipette unter einer sterilen Werkbank oder verwenden Sie bereits vorgefüllte **NBB[®]-B** Bouillon Röhrchen (Art.-Nr. 2.04723.646).



11.3.2. Probennahme CO₂ bzw. Druckluft mit NBB[®]-B Bouillon

Sterilisieren Sie ihren CO₂- oder Druckluftauslass (z. B. mit Hilfe von einer 70%igen Alkohollösung).

Lassen Sie aus dem Auslass CO₂ oder Druckluft in das mit **NBB[®]-B** Bouillon gefüllte Röhrchen einströmen. Vermeiden sie das Vorschießen von Gas, da sich die meisten Bakterien im Probehahn befinden.

Nach einer definierten Zeitspanne (z. B. 15 Sekunden) beenden Sie den Gasstrom.

Verschließen Sie das Röhrchen lose, um Gasaustausch zu gewährleisten und beschriften Sie es.



11.3.3. Inkubation NBB[®]-B Bouillon Röhrchen

Inkubieren Sie die **NBB[®]-B** Bouillon Röhrchen unter anaeroben Bedingungen (z. B. in einem Anaerobiose-topf) für 5 Tage bei 27°C ± 2°C in einem Inkubator.

Für manche langsam wachsenden, bierschädigenden Bakterien (z. B.: *Lactobacillus lindneri*) muss die Inkubationszeit ggf. verlängert werden.



11.3.4. Evaluation NBB[®]-B Bouillon Röhrchen

Eine Farbänderung von rot nach gelb zeigt das Wachstum von typischen bierschädigenden Bakterien in **NBB[®]-B** Bouillon an. Zusätzlich kann Trübung und Gasbildung auftreten.

Weiterführende Analysetechniken, wie z. B. Mikroskopie oder PCR-Analyse, können zur Identifizierung der Bakterien verwendet werden.

12. Protokolle NBB[®]-C Konzentrat

DMD [®] -Produkt	Anwendung	Frequenz	Protokoll
NBB [®] -C Konzentrat	Anreicherung trüber Bierproben	regelmäßig (je Produktion)	12.1.
	Anreicherung von Würze- proben (mit sterilem Bier)	gelegentlich	12.2.
	Hefebeprobung	gelegentlich	12.3.

12.1. NBB[®]-C Konzentrat: Anreicherung von bierschädigenden Bakterien aus trüben Bierproben

Der Nachweis von bierschädigenden Bakterien mit **NBB[®]-C** Konzentrat basiert nicht auf einem Farbumschlag. Die mit **NBB[®]-C** Konzentrat inkubierten Proben werden unter dem Mikroskop (z. B. in einer Zählkammer) ausgewertet. Die Selektivität der Anreicherung kann durch die Mischung der Bierprobe mit **NBB[®]-C** Konzentrat und die Zugabe von sterilem Wasser eingestellt werden, wodurch die Hopfenbitterstoffe verdünnt werden. Dies ermöglicht den Nachweis von obligaten bierschädigenden Bakterien bis hin zu Indikatormikroorganismen (siehe nachfolgende Abbildung 2). Für die Indikatormikroorganismen muss zusätzlich noch Luft im Flaschenkopfraum belassen werden.

12.1.1. NBB[®]-C Konzentrat: Vorbereitung von Bügelverschlussflaschen

Zur Anreicherung bzw. zum Nachweis von bierschädigenden Bakterien können trübe Bierproben in sterilen, transparenten Bügelverschlussflaschen inkubiert werden.



Achtung:

Zur Herstellung steriler Bügelverschlussflaschen sollten diese mit ca. 10 ml entionisiertem Wasser oder Leitungswasser gefüllt und anschließend autoklaviert werden. Das Wasser muss vor der Verwendung nicht aus der Flasche entfernt werden. Diese Menge kann wegen der erhöhten Hopfenkonzentration in unfiltrierten Bierproben immer in der Flasche verbleiben. Der Bügel der Flasche sollte aus Edelstahl sein, um Korrosion beim Autoklavieren zu vermeiden.

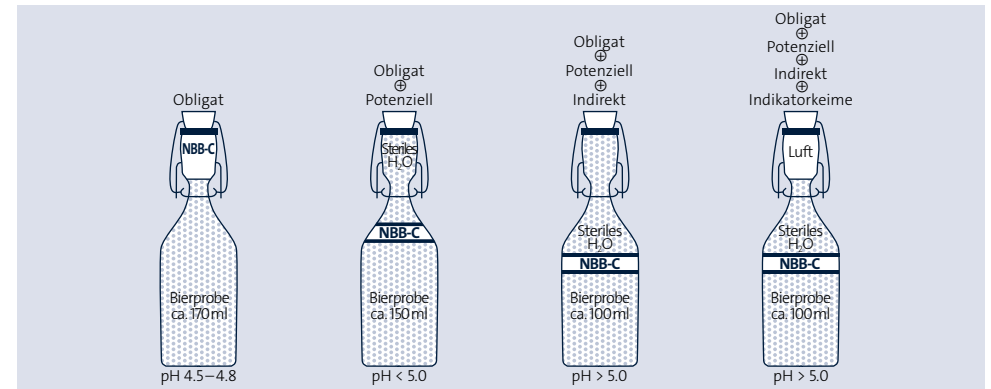


Abbildung 2: Selektiver Nachweis von Bakterien mit **NBB[®]-C** Konzentrat. Die Selektivität der Anreicherung kann durch Zugabe von sterilem Wasser verändert werden. Von obligaten bierschädigenden Bakterien (z. B. *L. brevis*, *Pectinatus* spp. & *Megasphaera* spp.) bis hin zu Indikatormikroorganismen (z. B. Essigsäurebakterien) mit zusätzlicher Luft im Flaschenkopf kann somit die Anreicherung bei Bedarf geführt werden (nach Back, W., 2005). Die angegebenen Volumina beziehen sich auf eine 180 ml Bügelverschlussflasche. Die Volumina müssen ggf. an das verwendete Flaschenvolumen oder -typ angepasst werden.



12.1.2. Ansetzen der Anreicherung mit NBB[®]-C Konzentrat in Bügelverschlussflaschen oder Bierflaschen

A) Anreicherung in Bügelverschlussflaschen

Das zu untersuchende Biervolumen wird unter einer sterilen Werkbank in die zuvor sterilisierte Bügelverschlussflasche vorgelegt.



Anschließend wird **NBB[®]-C** Konzentrat mit einer Menge von 5 % des Gesamtvolumens der Flasche eingefüllt.

Je nach Bedarf kann anhand von Abbildung 2, S. 77 die Selektivität der Anreicherung durch Zugabe von sterilem entionisiertem Wasser oder sterilem Leitungswasser modifiziert werden. Durch Zugabe von z. B. 25 % (v/v) Wasser können auch zusätzlich potenzielle bierschädigende Bakterien angereichert werden. Die Flasche sollte mit Wasser randvoll gefüllt werden, außer bei einem Nachweis von Indikatorkeimen. Hier muss etwas Luft im Flaschenkopfraum belassen werden.

Verschließen Sie die Probenflasche. Bei hefehaltigen Bieren legen sie den Deckel nur lose auf.

Beschriften Sie die Probe.



Der Bügel kann nach drei Tagen Inkubation fest verschlossen werden (siehe 12.1.3., S. 78).



B) Anreicherung in Bierflaschen

Für die Untersuchung von abgefülltem Bier kann die Anreicherung direkt in der Bierflasche erfolgen.

Hierzu entfernen Sie ca. 5% des Flaschenvolumens und füllen die Flasche mit ca. 5% **NBB[®]-C** Konzentrat bis nahe zum Rand auf.



Verschließen Sie die Bierflasche. Bei hefehaltigen Proben (z. B. Hefeweissbier) sollte der Verschluss zunächst nur lose erfolgen.

Beschriften Sie die Probe.

Der Deckel kann nach drei Tagen Inkubation fest verschlossen werden (siehe 12.1.3., S. 78).

12.1.3. Inkubation NBB[®]-C Konzentrat

Inkubieren Sie die Flasche mit **NBB[®]-C** Konzentrat für 7–12 Tage bei 27 °C ± 2 °C in einem Inkubator, Brutschrank oder Inkubationsraum.

Beachten Sie, dass es bei hefehaltigen Bieren durch kurzzeitiges Hefewachstum zur Bildung von CO₂ kommen und die Flasche somit unter Druck stehen kann. Das Hefewachstum wird durch Hemmstoffe aber schnell unterdrückt. Die CO₂-Bildung ersetzt eine anaerobe Inkubation.

Für manche langsam wachsenden, bierschädigenden Bakterien (z. B.: *Lactobacillus lindneri*) muss die Inkubationszeit ggf. verlängert werden.



12.1.4. Evaluation NBB[®]-C Konzentrat

NBB[®]-C Konzentrat enthält keinen Farbindikator.

Eine Trübung kann makroskopisch das Wachstum von typischen bierschädigenden Bakterien in **NBB[®]-C** Proben anzeigen. Während der Bebrütung sollte die Probe kontinuierlich auf das Wachstum von bierschädigenden Bakterien überprüft werden. Bei stark trüben Proben kann das Wachstum von bierschädigenden Bakterien nur durch Mikroskopieren zuverlässig festgestellt werden. In der mikroskopischen Evaluation (z. B. Zählkammer; Neubauer improved) muss die Anzahl an Bakterien in 16 mikroskopischen Feldern (= Gruppenquadrat) bei 600-facher Vergrößerung deutlich größer als 1 sein. Bei einer Schichtdicke der Kammer von 0,1 mm sollten etwa 4 Zellen pro Gruppenquadrat vorhanden sein. Dies entspricht einer Verkeimung von ca. 10⁶ Zellen/ml. Werden nur einzelne Keime in einem Gesichtsfeld gefunden, dann sind diese meist tot oder harmlose Bakterien, die in derartigen Proben fast immer vorhanden sind.

Zur Absicherung können zweifelhafte Proben im Anschluss mit **NBB[®]-B** Bouillon angereichert werden. Hierzu einen Tropfen **NBB[®]-C**-Probenbodensatz mit ca. 20 ml **NBB[®]-B** Bouillon ansetzen und für einen Tag bei 27 °C ± 2 °C inkubieren.

Weiterführende Analysetechniken, wie z. B. PCR-Analyse, können zur Identifizierung der Bakterien verwendet werden.

12.2. NBB[®]-C Konzentrat: Anreicherung von bierschädigenden Bakterien aus Würzeproben

12.2.1. NBB[®]-C Konzentrat: Vorbereitung von Bügelverschlussflaschen

Zur Anreicherung bzw. zum Nachweis von bierschädigenden Bakterien können Würzeproben mit sterilem Bierzusatz in sterilen, transparenten Bügelverschlussflaschen inkubiert werden.



Achtung:

Zur Herstellung steriler Bügelverschlussflaschen sollten diese mit ca. 10 ml entionisiertem Wasser oder Leitungswasser gefüllt und anschließend autoklaviert werden. Das Wasser muss vor der Verwendung nicht aus der Flasche entfernt werden. Diese Menge kann wegen der erhöhten Hopfenkonzentration in Würze- bzw. unfiltrierbaren Bierproben immer in der Flasche verbleiben. Der Bügel der Flasche sollte aus Edelstahl sein, um Korrosion beim Autoklavieren zu vermeiden.



12.2.2. NBB[®]-C Konzentrat: Anreicherung von bierschädigenden Bakterien in Würzeproben in Bügelverschlussflaschen

Für eine 200 ml Bügelverschlussflasche, die bis zum Rand etwa 210 ml fasst, legen Sie ca. 20 ml steriles Wasser in der Bügelverschlussflasche vor.

Befüllen Sie die Bügelverschlussflasche anschließend mit ca. 50 ml Würze und geben Sie ca. 5% NBB[®]-C Konzentrat hinzu (hier: ca. 10 ml).

Zum Schluss füllen Sie mit pasteurisiertem Bier (z. B. stabile Proben vom Haltbarkeitsschrank) die Flasche bis zum Rand auf. Die Biermenge entspricht ungefähr 130 ml.

Verschließen Sie die Probenflasche durch das lose Auflegen des Deckels und beschriften Sie diese.



12.2.3. Inkubation NBB[®]-C Konzentrat

Inkubieren Sie die Flasche mit NBB[®]-C Konzentrat für 7–12 Tage bei 27 °C ± 2 °C in einem Inkubator, Brutschrank oder Inkubationsraum.

Für manche langsam wachsenden, bierschädigenden Bakterien (z. B.: *Lactobacillus lindneri*) muss die Inkubationszeit ggf. verlängert werden.



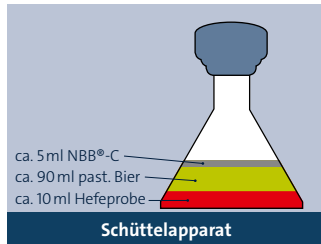
12.2.4. Evaluation NBB[®]-C Konzentrat

NBB[®]-C Konzentrat enthält keinen Farbindikator. Eine Trübung kann makroskopisch das Wachstum von typischen bierschädigenden Bakterien in NBB[®]-C Proben anzeigen. Während der Bebrütung sollte die Probe kontinuierlich auf das Wachstum von bierschädigenden Bakterien überprüft werden. Bei leicht trüben Proben kann das Wachstum von bierschädigenden Bakterien nur durch Mikroskopieren zuverlässig festgestellt werden. In der mikroskopischen Evaluation (z. B. Zählkammer; Neubauer improved) muss die Anzahl an Bakterien in 16 mikroskopischen Feldern (= Gruppenquadrat) bei 600-facher Vergrößerung deutlich größer als 1 sein. Bei einer Schichtdicke der Kammer von 0,1 mm sollten etwa 4 Zellen pro Gruppenquadrat vorhanden sein. Dies entspricht einer Verkeimung von ca. 10⁶ Zellen/ml. Werden nur einzelne Keime in einem Gesichtsfeld gefunden, dann sind diese meist tot oder harmlose Bakterien, die in derartigen Proben fast immer vorhanden sind.

Zur Absicherung können zweifelhafte Proben im Anschluss mit NBB[®]-B Bouillon angereichert werden. Hierzu einen Tropfen NBB[®]-C-Probenbodensatz mit ca. 20 ml NBB[®]-B Bouillon ansetzen und für einen Tag bei 27 °C ± 2 °C inkubieren.

Weiterführende Analysetechniken, wie z. B. PCR-Analyse, können zur Identifizierung der Bakterien verwendet werden.

12.3. NBB®-C Konzentrat: Anreicherung von bierschädigenden Bakterien aus Hefeproben (Alternatives Protokoll)



12.3.1. NBB®-C Konzentrat: Vorbereitung Probenanreicherung

Autoklavieren Sie einen 200 ml Erlenmeyerkolben mit Wattestopfen.

Geben Sie unter einer sterilen Werkbank ca. 10 ml der zu untersuchenden Hefeprobe in den sterilen Kolben.

Anschließend fügen Sie ca. 90 ml steriles Bier hinzu.

Zuletzt pipettieren Sie ca. 5 ml **NBB®-C** Konzentrat in den Kolben.

Verschließen Sie den Kolben mit dem sterilen Wattestopfen.

Mischen Sie die Flüssigkeiten durch leichtes Schwenken des verschlossenen Kolbens.

12.3.2. Inkubation NBB®-C Konzentrat Hefeproben

Inkubieren Sie den Kolben mit der Hefeprobe auf einem Schüttler (langsame Rotation) in einem Inkubator für 5–12 Tage bei $27^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

Aufgrund der kurzzeitigen Hefegärung stellt sich eine anaerobe Atmosphäre im Kolben ein, daher ist eine anaerobe Kultivierung nicht zwingend notwendig.

12.3.3. Evaluation NBB®-C Konzentrat Hefeproben

NBB®-C Konzentrat enthält keinen Farbindikator. Eine Trübung kann makroskopisch das Wachstum von typischen bierschädigenden Bakterien in **NBB®-C** Proben anzeigen. Während der Bebrütung sollte die Probe kontinuierlich auf das Wachstum von bierschädigenden Bakterien überprüft werden. Bei stark trüben Proben kann das Wachstum von bierschädigenden Bakterien nur durch Mikroskopieren zuverlässig festgestellt werden. In der mikroskopischen Evaluation (z. B. Zählkammer; Neubauer improved) muss die Anzahl an Bakterien in 16 mikroskopischen Feldern (= Gruppenquadrat) bei 600-facher Vergrößerung deutlich größer als 1 sein. Bei einer Schichtdicke der Kammer von 0,1 mm sollten etwa 4 Zellen pro Gruppenquadrat vorhanden sein. Dies entspricht einer Verkeimung von ca. 10^6 Zellen/ml. Werden nur einzelne Keime in einem Gesichtsfeld gefunden, dann sind diese meist tot oder harmlose Bakterien, die in derartigen Proben fast immer vorhanden sind.

Zur Absicherung können zweifelhafte Proben im Anschluss mit **NBB®-B** Bouillon angereichert werden. Hierzu einen Tropfen **NBB®-C**-Probenbodensatz mit ca. 20 ml **NBB®-B** Bouillon ansetzen und für einen Tag bei $27^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ inkubieren.

Weiterführende Analysetechniken, wie z. B. PCR-Analyse, können zur Identifizierung der Bakterien verwendet werden.

13. Häufige Fragen zur Anwendung und zur Bewertung von Ergebnissen

13.1. NBB®-A Agar

	Ursache	Lösung
Kein Wachstum von strikt anaeroben Bakterien wie <i>Pectinatus</i> und <i>Megasphaera</i> auf Membranfilter.	Besonders strikt anaerobe bierschädigende Bakterien werden durch das Membranfiltrationsverfahren häufig Sauerstoff ausgesetzt, was das Wachstum hemmt.	Zur Anreicherung von langsamen wachsenden, strikt anaeroben bierschädigenden Bakterien kann man den Membranfilter kurz mit CO ₂ nachspülen oder den Membranfilter in NBB®-B Bouillon geben und im Anaerobiosetopf bebrüten.
NBB®-A Agar verfestigt sich nach Lagerung im Wasserbad nicht mehr oder nur teilweise.	Durch längeres Lagern von flüssigem Agar bei ca. 45 °C oder bei 95 °C im Wasserbad wird die Agarstruktur chemisch geschädigt. Dies verhindert eine Verfestigung des Agars.	Lagern Sie NBB®-A Agar niemals länger als 4 h bei 45 °C im Wasserbad. Vermeiden Sie längere Verflüssigungszeiten bei 95 °C oder mehrfaches Verflüssigen.
Sofortiger Farbumschlag beim Gussplattenverfahren nach Vorlage der Proben.	Sie haben zu viel oder stark saure Proben mit NBB®-A Agar versetzt.	Halten Sie sich an die vorgegebenen maximalen Probenvolumina im Protokoll (siehe Protokoll 10.6, S. 68). Bei stark sauren Proben sollten Sie das Probenvolumen verringern.
Keimwachstum ohne Farbumschlag.	Mikroorganismen, die auf NBB®-A Agar keinen Farbumschlag verursachen, sollten mit dem Mikroskop analysiert werden. Bei mangelhafter Anaerobiose können Indikatorkeime (z. B. <i>Enterobacter</i> spp.) anwachsen.	Für zweifelhafte Proben können Sie eine Keimuntersuchung am Mikroskop oder eine Differenzierung mit PCR-Methoden durchführen. Überprüfen Sie auch ihre Inkubationsbedingungen.

13.2. NBB®-B Bouillon

	Ursache	Lösung
Trübung ohne Farbumschlag.	Tritt nach der Inkubation von fünf Tagen eine Trübung des Kulturmediums ohne Farbumschlag auf, deutet dies auf Kontaminationen mit potenziellen oder indirekten bierschädigenden Bakterien (z. B. <i>Pantoea agglomerans</i>) hin oder auf fehlerhafte Probennahme.	Bitte wiederholen Sie die Beprobung und halten Sie die beschriebenen Arbeitsschritte ein. Achten Sie auf sauberes mikrobiologisches Arbeiten.
Differenzierung oder Identifizierung der bierschädigenden Bakterien.	Eine Differenzierung oder Identifizierung der bierschädigenden Bakterien ist mit NBB®-B Bouillon nicht möglich.	Zur Differenzierung können weitere Analysetechniken wie z. B. PCR-basierende Verfahren verwendet werden.
Beobachtung von Hefewachstum.	Kurz nach der Zugabe von Hefe, besonders in hohen Mengen, kann sich diese möglicherweise kurzzeitig im NBB®-B Bouillon vermehren. Das Wachstum wird nach kurzer Zeit gehemmt. Das Anwachsen der Hefe ist erwünscht, da durch die stattfindende CO ₂ -Bildung eine ideale anaerobe Atmosphäre entsteht. Die Hefemenge kann bereits Trübung hervorrufen.	Bei einer Auswertung nach fünf Tagen werden nur bierschädigende Bakterien detektiert. Bitte halten Sie die genauen Auswertzeiten ein. Bei vorliegender Trübung achten Sie auch auf den Farbumschlag, der bei Anwesenheit von bierschädigenden Bakterien häufig auftritt (Bei Zugabe großer Hefemengen ist kein Farbumschlag möglich). Unklare Befunde können auch mikroskopiert werden. Bei der mikroskopischen Untersuchung sind neben den bierschädigenden Bakterien zahlreiche Hefezellen zu erkennen.

13.3. NBB®-C Konzentrat

	Ursache	Lösung
Farbumschlag nicht sichtbar.	NBB®-C Konzentrat enthält keinen Farbindikator.	Ein Nachweis bierschädigender Bakterien ist mit einem Mikroskop möglich. Nur deutliche Vermehrung spricht für einen Befund.
Anreicherung klarer Bierproben mit NBB®-C Konzentrat.	–	Zur qualitativen Betrachtung können klare Bierproben auch mit NBB®-C Konzentrat angereichert werden. Die Auswertung erfolgt durch Bewertung von Bodensatz und Trübung sowie mittels Mikroskop.

14. Appendix

14.1 Schnellübersicht: NBB®-A Agar Nachweis von bierschädigenden Bakterien

	Membranfiltration (klare Bierproben/Wasser)	Ausplattieren & Ausstrichverfahren	Luftproben	CO ₂ & Druckluft	Gussplattenverfahren	
Probevolumen	Individuelles Volumen (Standard: 300–500 ml)	Max. 150 µl beim Ausplattieren/Ösenvolumen bei Ausstrich	Individuelle Luftvolumen mit Luftkeimsammler oder individuelles Zeitintervall mit Sedimentationsverfahren	Membranfiltration von ca. 50ml sterilem Wasser mit CO ₂ /Druckluft (15 Sekunden)	Petrischalendurchmesser	Maximales Probevolumen
					9 cm	5 ml
					14 cm	10 ml
Inkubationsbedingungen	Temp.: 27±2°C Zeit: 5–7 Tage	Temp.: 27±2°C Zeit: 5 Tage	Temp.: 27±2°C Zeit: 5–7 Tage			
Auswertung	Positiv: Farbumschlag, rot nach gelb, Koloniebildung Negativ: Kein Farbumschlag, keine Koloniebildung					

14.2 Schnellübersicht: NBB®-B Bouillon Nachweis von bierschädigenden Bakterien

	Hefeproben (Röhrchen)	Hefeproben (Bügelverschlussflasche 50 ml)	CO ₂ & Druckluft
Probevolumen	0,1–0,3 ml Hefe oder Tupferprobe	0,25–0,75 ml Hefeprobe	ca. 10 ml NBB®-B Bouillon mit individuellem Volumen an CO ₂ /Druckluft (15 Sekunden)
Inkubationsbedingungen	Temp.: 27 ± 2 °C Zeit: 5 Tage		
Auswertung	Positiv: Farbumschlag, rot nach gelb, deutliche Trübung, (Gasbildung) Negativ: Kein Farbumschlag, keine Trübung		

14.3 Schnellübersicht: NBB®-C Konzentrat Nachweis von bierschädigenden Bakterien

	Trübe Bierproben	Würzproben				Hefeproben (Alternatives Protokoll)
Probevolumen	Variabel (Beispiel: Bei 180 ml Gesamtvolumen ca. 100–170 ml Bierprobe je nach Selektivität.)	Variabel Beispiel für 200 ml Bügelverschlussflasche. Das Volumen muss an das jeweilige Flaschenvolumen angepasst werden:				10 ml Hefesuspension (vgl. S. 82)
		Würze	Steriles Wasser	NBB®-C Konzentrat	Pasteurisiertes Bier	
		ca. 50 ml	ca. 20 ml	ca. 10 ml	ca. 130 ml (randvoll auffüllen)	
Inkubationsbedingungen	Temp.: 27 ± 2 °C Zeit: 7–12 Tage					Temp.: 27 ± 2 °C Zeit: 5–12 Tage
Auswertung	Positiv: Mikroskopischer Nachweis: In 16 mikroskopischen Feldern bei 600-facher Vergrößerung deutlich mehr als 1 bierschädigender Mikroorganismus in jedem Gesichtsfeld. Negativ: Weniger als 1 Bakterienzelle mikroskopisch pro Gesichtsfeld nachweisbar.					

14.4. Glossar (alphabetisch)

Differenzierung	Differenzierung ist die Unterscheidung der Keime aufgrund ihrer biochemischen oder genetischen Eigenschaften bis hin zur Identifikation auf Gattung- und Artenamen: z. B. <i>Lactobacillus brevis</i> .
Inert	Eigenschaft eines Gegenstands, wenn sich dieser unter bestimmten Bedingungen stabil und nicht chemisch reaktiv verhält.
Inkubation	Bebrütung eines Kulturmediums unter definierten Bedingungen und Parametern (z. B. hinsichtlich Zeit und Temperatur).
Peleusball	Gummiball mit Ventilen zum Ansaugen und Auslassen von Flüssigkeiten aus Glas- oder Plastikpipetten.
qualitativer Nachweis	Nachweis, der auf einer Ja-Nein-Aussage beruht, d. h. Mikroorganismen sind in der Probe enthalten oder nicht.
quantitativer Nachweis	Nachweis, der auf einer wertebasierten Auswertung beruht, d. h. die Anzahl an Mikroorganismen in einer Probe kann bestimmt werden.
Serologische Pipette	Pipette (meist Plastik oder Glas), die zum Überführen von Flüssigkeiten verwendet wird. Eine Skalierung auf der Pipette zeigt das Volumen an. Plastikpipetten können meist steril und einzelverpackt bezogen werden.
Steril	Keimfrei, d. h. frei von lebenden Mikroorganismen.

15. Bezugsquellen

Die Firma Döhler bietet Ihnen verschiedene Lösungen für Ihre Qualitätskontrolle:

Art.-Nr.	Produkt	Verpackungseinheit
2.04709.782	NBB®-A Agar	1x Karton (9x 250 ml in Flasche)
2.04710.782	NBB®-B Bouillon	1x Karton (9x 250 ml in Flasche)
2.04723.646	NBB®-B Bouillon (Röhrchen)	1x Styroporbox (20x 10 ml in Röhrchen)
2.04711.782	NBB®-C Konzentrat	1x Karton (9x 250 ml in Flasche)

Ebenfalls können als Zubehör sterile Holztupfer bezogen werden:

Art.-Nr.	Produkt	Verpackungseinheit
2.04725.244	(Holz-)Steriltupfer (einzelverpackt)	100 St./Paket

Alle Laborgegenstände können durch einen Laborhändler bezogen werden.

16. Informationen

16.1. Trademarks

Die Trademarks **NBB®** und **Döhler Microsafety Design®** sind weltweit eingetragene und geschützte Handelsmarken der Döhler GmbH.

16.2. Vertrieb

Auf der Webseite www.doehler-dmd.com finden Sie weitere Informationen zu unserem Döhler Microsafety Design® Produktportfolio.

Email-Kontakt: dmd@doehler.com

16.3. Literaturempfehlung

Back, W.: Colour Atlas and Handbook of Beverage Biology, Fachverlag Hans Carl, Nürnberg, 2005.

Back, W. (Hrsg.): Ausgewählte Kapitel der Brauereitechnologie, 2. Aktualisierte Auflage, S. 319 ff., Fachverlag Hans Carl, Nürnberg, 2008.



DÖHLER GmbH

Riedstr. 7-9 | 64295 Darmstadt | Germany
Phone +49 6151 306-0 | Fax +49 6151 306-278

www.doehler.com | www.we-bring-ideas-to-life.com
mailbox@doehler.com | facebook.com/doehlergroup
twitter.com/doehlergroup