

DOI: 10.18832/kp201804

# Brewing Microbiology – *Kocuria (Micrococcus)* and Cultivation Methods for their Detection – Part 1

## Mikrobiologie pivovarské výroby – bakterie *Kocuria (Micrococcus)* a kultivační metody pro jejich detekci – 1. část

Dagmar MATOULKOVÁ, Petra KUBIZNIAKOVÁ

Mikrobiologické oddělení, Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, a.s., / Department of Microbiology, Research Institute of Brewing and Malting, PLC, Lípová 15, 120 44 Prague, e-mail: matoulkova@beerresearch.cz, kubizniakova@beerresearch.cz

Recenzovaný článek / Reviewed Paper

**Matoulková, D., Kubizniaková, P., 2018: Brewing microbiology – *Kocuria (Micrococcus)* and cultivation methods for their detection – Part 1. Kvasny Prum. 64(1): 10–13**

Significant brewery species of micrococcus were reclassified to the genus *Kocuria*: *Kocuria kristinae* (previously *Micrococcus kristinae*) and *Kocuria varians* (previously *Micrococcus varians*). Bacteria of genus *Kocuria* belong to less risky microbial contaminants of beer and brewery plant. Species *Kocuria kristinae* may exceptionally cause beer spoilage. Significant is their misplacement for pediococci. Here we present an overview of basic morphological and physiological properties of *Kocuria (Micrococcus)* species and describe their harmfulness in the brewing process.

**Matoulková, D., Kubizniaková, P., 2018: Mikrobiologie pivovarské výroby – bakterie *Kocuria (Micrococcus)* a kultivační metody pro jejich detekci – 1. část. Kvasny Prum. 64(1): 10–13**

Pivovarsky významné druhy mikrokoků byly reklasifikovány do rodu *Kocuria*: *Kocuria kristinae* (dříve *Micrococcus kristinae*) a *Kocuria varians* (dříve *Micrococcus varians*). Bakterie rodu *Kocuria* patří k méně rizikovým mikrobiálním kontaminacím piva a pivovarského provozu. Výjimečně může být druh *Kocuria kristinae* původcem kažení piva. Význam těchto bakterií spočívá zejména v možnosti záměny s pediokoky. V publikaci je uveden přehled základních morfologických a fyziologických vlastností těchto bakterií a popsán je jejich význam z hlediska škodlivosti v procesu výroby piva.

**Keywords:** aerobic bacteria, *Kocuria*, contamination of beer, *Micrococcus***Klíčová slova:** aerobní bakterie, *Kocuria*, kontaminace piva, *Micrococcus*

### □ 1 INTRODUCTION

The genus *Kocuria* (previously *Micrococcus*) is not considered to be a serious contaminant in the brewing production. *Kocuria* are gram-positive aerobic bacteria (cocci) with a respiratory type of metabolism. These bacteria are sensitive to bitter products of hops, alcohol and acid pH. Their potential risk for brewing production is not as high as that of lactic acid bacteria (Bokulich and Bamforth, 2013).

Only two species, *Kocuria kristinae* (previously *Micrococcus kristinae*) and *Kocuria varians* („*Micrococcus varians*“), are microbiologically significant in brewery laboratory. *Kocuria kristinae* is exceptional because it is a facultative anaerobe (other species are strictly aerobic). *Kocuria kristinae* breeds only in beer with low concentration of alcohol and low concentration of bitter hops products, and at pH above 4,5. Because of these growth limitations, *Kocuria* is isolated only sporadically as the cause of beer spoilage. Beer damaged by *K. kristinae* has an atypically fruity aroma. *Kocuria varians* is common in the brewing environment and survives for a long time even in beer. However, *K. varians* does not damage beer – it is strictly aerobic and sensitive to bitter substances of hops, alcohol and acid pH, like other species of *Kocuria*. *Kocuria varians* was also isolated from yeast (Back, 1981; Lawrence and Priest, 1981; Vaughan et al., 2005).

The sources of *Kocuria* during the production of beer can be input raw materials (barley, malt, hops), air, water, returnable packaging from the market, polluted operating equipment and operator service (Back, 2005).

The risk of damage to beer by *Kocuria* is relatively negligible. Significant is the misplacement of *Kocuria* for other bacteria during routine microbiological control. Cells of *Kocuria*, which may occur as tetrads in a microscopic sample, can be mistaken for *Pediococcus* that is harmful for beer. Conversely, *Pediococcus* may be falsely determined as harmless *Kocuria (Micrococcus)*. The substitution occurs primarily if yeast sample is checked only microscopically without culture assay or other tests, e.g. catalase reaction, etc. (Priest and Campbell, 2003).

### □ 2 THE GENUS *MICROCOCCUS*

*Micrococcus* species are Gram-positive, mesophilic, nonspore-forming, nonmotile, catalase positive and oxidase positive cocci. Mi-

### □ 1 ÚVOD

Bakterie rodu *Kocuria* (dříve *Micrococcus*) nejsou považovány za závažnou kontaminaci pivovarské výroby. Jsou to gram pozitivní aerobní bakterie (koky) s respiratorním typem metabolismu, jsou citlivé na hořké chmelové látky, alkohol a kyselé pH, a nepředstavují tedy takové riziko jako např. bakterie mléčného kvašení (Bokulich a Bamforth, 2013).

Z hlediska mikrobiologické kontroly v pivovarské laboratoři jsou významné pouze dva druhy, *Kocuria kristinae* (dříve *Micrococcus kristinae*) a *Kocuria varians* („*Micrococcus varians*“). Druh *Kocuria kristinae* je výjimečný tím, že je fakultativně anaerobní (ostatní druhy jsou striktně aerobní). Jako původce kažení piva je *K. kristinae* izolována jen velmi sporadicky – může se množit pouze v pivu s nižší koncentrací alkoholu a hořkých chmelových látek a s pH vyšším než 4,5. Pivo poškozené metabolickou činností *K. kristinae* vykazuje atypické ovocné aroma. Druh *Kocuria varians* je běžně nacházen v pivovarském prostředí a může se vyskytovat i v pivu a přežívat v něm delší dobu. Pivo však nekazí – tento druh je striktně aerobní a jako ostatní kocurie je citlivý na hořké chmelové látky, alkohol a kyselé pH. *Kocuria varians* byla izolována také z kvasnic (Back, 1981; Lawrence a Priest, 1981; Vaughan et al., 2005).

Riziko poškození piva kocuriemi je poměrně zanedbatelné, jejich význam spočívá zejména v možnosti záměny s jinými bakteriemi při rutinní mikrobiologické kontrole. Kocurie se mohou vyskytovat uspořádané v tetradách a při mikroskopii vzorku mohou být nesprávně identifikovány jako pivo škodící bakterie *Pediococcus* a naopak – pediokoky mohou být nesprávně určeny jako neškodné kocurie, zejména pokud je prováděna např. jenom mikroskopie vzorku kvasnic, bez kultivačního stanovení, případně dalších testů, např. na katalasovou reakci apod. (Priest a Campbell, 2003).

### □ 2 ROD *MICROCOCCUS*

Mikrokoky jsou gram pozitivní, mesofilní, nesporulující, nepohyblivé, katalasa-positivní a oxidasa-positivní koky. Ve vztahu ke kyslíku jsou mikrokoky striktně aerobní, mají respiratorní typ metabolismu. Velikost buněk se pohybuje v rozmezí 0,5–1,0 μm. Buňky jsou uspořádané po dvou, ve čtveřicích nebo v nepravidelných balíčcích, ale

crococci are strictly aerobic with a respiratory type of metabolism. Cell size ranges from 0.5 to 1.0 µm. Cocci occur in doublets, four-somes (tetrads) or irregular packs, but never form chains (Fig. 1). The name *Micrococcus* derives from the Greek mikros (small) and kokkos (grain, seed) (Busse, 2015).

Colonies of *Micrococcus* are mostly smooth and convex with a regular border. The colonies are yellow or yellow-orange since micrococci can produce carotenoid pigments. Some strain of *Micrococcus luteus* produce purple pigment, which diffuses into the culture medium. Micrococci grow in a wide range of temperatures depending on the environment from which they were isolated; the temperature optimum of most micrococci is 25–37 °C. Micrococci grow on common cultivation media which contain yeast extract and peptone (pH around 7,0). They produce no or only a small amount of organic acids from sugars. Micrococci are commonly found in the environment and in food (Busse, 2015; Sedláček, 2007).

Many species that were originally described as micrococci, such as *Micrococcus varians*, *Micrococcus kristinae* and *Micrococcus roseus*, were reclassified as *Kocuria*, based on analysis of fatty acids, peptidoglycan, and other constituents (Stackebrandt and Schumann, 2015).

At present, six species of genus *Micrococcus* have been described: *M. luteus*, *M. lylae*, *M. antarcticus*, *M. endophyticus*, *M. yunnanensis*, and *M. flavus*. Representatives of these species are found in various types of environment – water, soil, air, plant surface, mammalian skin including human, active sludge, meat, sausage, cheese or fish (Busse, 2015).

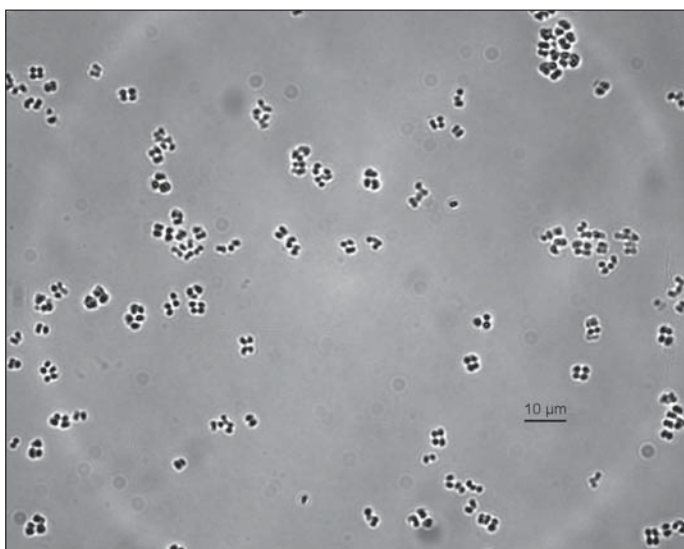


Fig. 1 / Obr. 1 *Micrococcus luteus* CCM 169<sup>T</sup>

### □ 3 THE GENUS *KOCURIA*

Bacteria of genus *Kocuria* include Gram-positive, mesophilic, non-sporeforming, nonmotile, catalase positive and oxidase positive cocci (Table 1). They are strictly aerobic, only one species (*K. kristinae*) being facultatively anaerobic. *Kocuria* has a respiratory type of metabolism. The cell size is about 1–1.5 µm. Cells occur in groups of two, four (tetrads) or irregular packs (Fig. 2). The name of the genus *Kocuria* comes from the surname of Slovak microbiologist Kocur (Stackebrandt and Schumann, 2015).

Their colonies are yellow or pink since some species can produce pigments. Temperature optimum is most often 20–37 °C. *Kocuria* grow on common cultivation media containing yeast extract and peptone (pH about 7.0).

*Kocuria* cells form acids from sugars, which distinguishes them from *Micrococcus*. They are commonly found in the environment and in food (Sedláček, 2007; Stackebrandt and Schumann, 2015).

At present, 10 species are described within the genus *Kocuria*: *K. rosea*, *K. aegyptia*, *K. carniphila*, *K. himachalensis*, *K. kristinae*, *K. marina*, *K. palustris*, *K. polaris*, *K. rhizophila* a *K. varians*. Representatives of these species are found in a variety of environments – water, soil, air, marine sediments, plant surfaces, mammalian skin including human, meat or milk (Stackebrandt and Schumann, 2015). Two species, *Kocuria kristinae* (previously *Micrococcus kristinae*)

nikdy nevytváří řetězky (obr. 1). Název *Micrococcus* pochází z řeckého mikros (malý) a kokkos (zrnko, semínko) (Busse, 2015).

Kolonie mikrokoků jsou většinou hladké, vypouklé, s pravidelným okrajem. Mikrokoky mohou produkovat karotenoidní pigmenty – zbarvení kolonií je pak žluté nebo žluto-oranžové. Některé kmeny *M. luteus* produkují fialové barvivo, které difunduje do kultivačního média. Mikrokoky rostou v širokém rozmezí teplot, v závislosti na prostředí, ze kterého byly izolovány; teplotní optimum většiny zástupců je 25–37 °C. Rostou na běžných kultivačních půdách s obsahem kvasničného extraktu a peptonu (pH kolem 7,0), z cukrů vytváří žádné nebo jen malé množství organických kyselin. Nacházejí se běžně v prostředí a v potravinách (Busse, 2015; Sedláček, 2007).

Řada druhů popsaných původně jako mikrokoky byla přearžena do samostatných druhů, např. druhy *Micrococcus varians*, *Micrococcus kristinae*, a *Micrococcus roseus* byly na základě analýzy mastných kyselin, peptidoglykanu aj. reklasifikovány jako rod *Kocuria*.

V současné době je popsáno 6 druhů rodu *Micrococcus*: *M. luteus*, *M. lylae*, *M. antarcticus*, *M. endophyticus*, *M. yunnanensis*, *M. flavus*. Zástupci těchto druhů jsou nacházeny v rozmanitých typech prostředí – voda, půda, vzduch, povrch rostlin, kůže savců včetně člověka, aktivní kal, maso, uzeniny, sýr, ryby (Busse, 2015).

### □ 3 ROD *KOCURIA*

Bakterie rodu *Kocuria* jsou gram pozitivní, mesofilní, nesporulující, nepohyblivé, katalasa-positivní a oxidasa-positivní koky (tab. 1). Ve vztahu ke kyslíku jsou striktně aerobní, pouze jediný druh (*K. kristinae*) je fakultativně anaerobní. *Kocurie* mají respirační typ metabolismu. Velikost buněk se pohybuje většinou v rozmezí 1–1,5 µm. Buňky jsou uspořádané po dvou, ve čtveřicích nebo v nepravidelných shlucích (obr. 2). Název rodu je odvozen od příjmení slovenského mikrobiologa Kocura (Stackebrandt a Schumann, 2015).

Některé kmeny mohou produkovat karotenoidní pigmenty – zbarvení kolonií je pak růžové či žluté. Teplotní optimum většiny zástupců je 20–37 °C. Rostou na běžných kultivačních půdách obsahujících kvasničný extrakt a pepton (pH kolem 7,0). Z cukrů vytváří kyseliny, čímž se odlišují od rodu *Micrococcus*. *Kocurie* se běžně nacházejí v prostředí a v potravinách (Sedláček, 2006; Stackebrandt a Schumann, 2015).

V současné době je v rámci rodu *Kocuria* popsáno 10 druhů: *K. rosea*, *K. aegyptia*, *K. carniphila*, *K. himachalensis*, *K. kristinae*, *K. marina*, *K. palustris*, *K. polaris*, *K. rhizophila* a *K. varians*. Zástupci těchto druhů jsou nacházeny v rozmanitých typech prostředí – voda, půda, vzduch, mořské sedimenty, povrch rostlin, kůže savců včetně člověka, maso, mléko (Stackebrandt a Schumann, 2015). V prostředí pivovarského provozu se běžně vyskytují dva druhy – *Kocuria kristinae* (dříve *Micrococcus kristinae*) a *Kocuria varians* („*Micrococcus varians*“).

#### 3.1 *Kocuria kristinae*

Druh atypický v rámci rodu *Kocuria* svou schopností růst a množit se i bez přístupu kyslíku. Kokovitě buňky, velké 0,7–1,2 µm, bývají

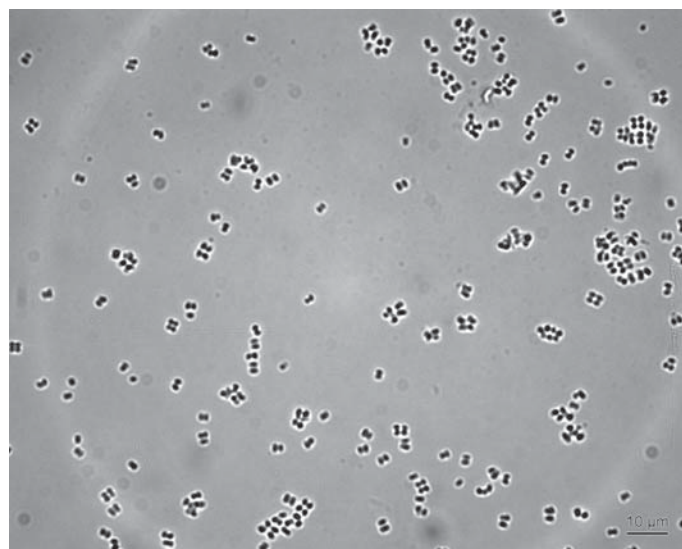


Fig. 2 / Obr. 2 *Kocuria kristinae* CCM 2690<sup>T</sup>

Table 1 Basic characteristics of *Kocuria* and its comparison with *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Pediococcus* and *Leuconostoc*

	<i>Kocuria kristinae</i>	<i>Kocuria varians</i>	<i>Micrococcus</i>	<i>Staphylococcus</i>	<i>Pediococcus</i>	<i>Leuconostoc</i>
Cell shape	cocci	cocci	cocci	cocci	cocci	cocco bacilli
Cell arrangement	single, pairs, tetrads	tetrads	single, pairs, tetrads	single, pairs, irregular clumps	single, pairs, tetrads	pairs, chains
Cell size (µm)	0.7–1.2	0.9–1.5	0.5–1.0	0.5–1.0	0.5–1.0	0.5–1.2
Relationship to oxygen	facultative anaerobic	aerobic	aerobic	facultative anaerobic	microaerophilic	facultative anaerobic
Metabolism	respiratory	respiratory	respiratory	respiratory, fermentative	fermentative	fermentative
Production of acids	+	+	-	+	+	+
Production of pigments	+	+	+	+/-	-	+/-
Catalase reaction	+	+	+	+	-	-
Oxidase reaction	+	-	+	-	-	-

Tab. 1 Základní charakteristiky bakterií *Kocuria* a jejich srovnání s rody *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Pediococcus* a *Leuconostoc*

	<i>Kocuria kristinae</i>	<i>Kocuria varians</i>	<i>Micrococcus</i>	<i>Staphylococcus</i>	<i>Pediococcus</i>	<i>Leuconostoc</i>
Tvar buněk	koky	koky	koky	koky	koky	koko tyčky
Uspořádání buněk	jednotlivě, dvojice, tetrády	tetrády	jednotlivě, dvojice, tetrády	jednotlivě, dvojice, nepravidelné shluky	jednotlivě, dvojice, tetrády	dvojice, řetízky
Velikost buněk (µm)	0,7–1,2	0,9–1,5	0,5–1,0	0,5–1,0	0,5–1,0	0,5–1,2
Vztah ke kyslíku	fakultativně anaerobní	aerobní	aerobní	fakultativně anaerobní	mikroaerofilní	fakultativně anaerobní
Metabolismus	respiratorní	respiratorní	respiratorní	respiratorní, fermentatorní	fermentatorní	fermentatorní
Produkce kyselin	+	+	-	+	+	+
Produkce pigmentů	+	+	+	+/-	-	+/-
Katalasová reakce	+	+	+	+	-	-
Oxidasová reakce	+	-	+	-	-	-

and *Kocuria varians* (previously “*Micrococcus varians*”) are commonly found in the brewing environment.

### 3.1 *Kocuria kristinae*

*Kocuria kristinae* (Fig. 2) is an atypical species within the genus *Kocuria*. It can grow and reproduce without oxygen. Its cells are cocci sized 0.7–1.2 µm. The cocci are arranged individually, in pairs, in tetrads or in clusters. Colonies are bulging with smooth or wrinkled surface, usually sized up to 2 mm. The color is from light creamy to orange. If the incubation is prolonged, the color may be more intense, especially the central part (Stackebrandt and Schumann, 2015). *K. kristinae* does not melt at temperatures below 12 °C. Some strains may be less susceptible to acid pH and bitter acids. The intensity of growth is affected by pH, the content of dissolved oxygen and hop substances. Even a small amount of *K. kristinae* can significantly affect beer aroma and taste (Back, 1981; Boulton and Quain, 2001).

### 3.2 *Kocuria varians*

Cocci cells of *K. varians* are sized 0.9–1.5 µm. *K. varians* occurs mostly in tetrads and clusters of tetrads, and exceptionally in packages or individually. Colonies are yellow, slightly convex with a smooth and glossy surface. Some strains can form wrinkled colonies with a matte surface. The size of the colonies is up to 4 mm. The name of the species is derived from the Latin *varians* (changing, variable). They can produce acids and reduce the pH of growth medium to 4.3–5.9. Due to microbiological control in the brewery, *K. varians* is a harmless bacterium, but important is its distinction from the riskier *K. kristinae* (Priest and Campbell, 2003; Stackebrandt and Schumann, 2015).

### ACKNOWLEDGMENTS

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

uspořádány jednotlivě, po dvojicích, v tetradách či shlucích tetrad. Kolonie jsou vypouklé, mohou mít hladký i vrásčitý povrch, s velikostí zpravidla do 2 mm. Zbarvení kolonií bývá světle krémové až oranžové, při prodloužené inkubaci může být zbarvení kolonií intenzivnější, zejména jejich středové části (Stackebrandt a Schumann, 2015). Nemnoží se při teplotách pod 12 °C. Některé kmeny mohou být méně citlivé ke kyselému pH a hořkým kyselinám. Intenzita jejich růstu v pivo je dána zejména obsahem rozpuštěného kyslíku, pH a obsahem hořkých chmelových látek. I slabý nárůst bakterií *K. kristinae* v pivo může výrazně ovlivnit jeho aroma a chuť (Back, 1981; Boulton a Quain, 2001).

### 3.2 *Kocuria varians*

Kokovité buňky mají velikost v rozmezí 0,9-1,5 µm, uspořádané jsou většinou v tetradách a shlucích tetrad a jen výjimečně v balíčcích nebo jednotlivě. Kolonie bývají žluté, mírně vypouklé s hladkým a lesklým povrchem, některé kmeny mohou vytvářet kolonie zvrásněné s matným povrchem. Velikost kolonií dosahuje až 4 mm. Název druhu je odvozen z latinského *varians* (měnící se, proměnlivý). Produkci kyselin může snížit pH média až na 4,3-5,9. Z hlediska mikrobiologické kontroly v pivovaru jde o neškodnou bakterii, důležité je její odlišení od více rizikové *K. kristinae* (Priest a Campbell, 2003; Stackebrandt a Schumann, 2015).

### PODĚKOVÁNÍ

Výsledky byly získány s podporou Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy ČR - Výzkumné senzorní centrum v Praze a Výzkumná a vývojová varna - udržitelnost a rozvoj (LO1312).

## REFERENCES / LITERATURA

- Back, W., 1981: Beer spoilage bacteria. Taxonomy of beer spoilage bacteria. Gram positive species. *Monatsschr. Brauwiss.*, 34: 267–276.
- Back, W., 2005: Brewery. In: Back W. (Ed.), *Colour atlas and handbook of beverage biology*. Verlag Hans Carl, Nürnberg, Germany, pp. 10–112.
- Bokulich, N. A., Bamforth, C.W., 2013: The microbiology of malting and brewing. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 77, 157–172.
- Boulton, C., Quain, D., 2001: *Brewing yeast and fermentation*. 1st edition, Blackwell Science Ltd., London, England.
- Brewery Convention of Japan, 1999: Detection methods for contaminants in wort and beer. In *BCOJ Microbiology Methods*, ed. BCOJ Analysis Committee. Tokyo: Brewers Association of Japan.
- Busse, H. J., 2015: *Micrococcus*. In: Whitman, W.B., editor, *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. John Wiley & Sons, Inc., in association with Bergey's Manual Trust.
- European Brewery Convention, 2011: Detection of contaminants, Section 4. In *Analytica-Microbiologica-EBC 2nd edn.* ed. EBC Microbiology Subcommittee. Verlag Hans Carl, Nürnberg.
- Jespersen, L., Jakobsen, M., 1996: Specific spoilage organisms in breweries and laboratory media for their detection. *Int. J. Food Microbiol.*, 33: 139–155.
- Priest, F. G., Campbell, I., 2003: *Brewing Microbiology 3rd ed.*, Kluwer Academic/Plenum Publishers: New York.
- Sedláček, I., 2007: *Taxonomie prokaryot*. 1. vydání, Masarykova univerzita, Brno.
- Stackebrandt, E., Schumann, P., 2015: *Kocuria*. In: Whitman, W.B., editor, *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. John Wiley & Sons, Inc., in association with Bergey's Manual Trust.
- Vaughan, A., O'Sullivan, T., van Sinderen, D., 2005: Enhancing the microbiological stability of malt and beer—a review. *J. Inst. Brew.*, 111: 355–371.

Manuscript received / Do redakce došlo: 30/11/2017  
Accepted for publication / Přijato k publikování: 22/12/2017