

DOI: 10.18832/kp201820

Brewing microbiology – *Kocuria (Micrococcus)* and cultivation methods for their detection – part 2

Mikrobiologie pivovarské výroby – bakterie *Kocuria (Micrococcus)* a kultivační metody pro jejich detekci – 2. část

Petra KUBIZNIAKOVÁ, Martina BROŽOVÁ, Dagmar MATOULKOVÁ

Research Institute of Brewing and Malting, Department of Microbiology, Lípová 15, 120 44 Praha 2, Czech Republic

Mikrobiologické oddělení, Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, a. s., Mikrobiologické oddělení, Lípová 15, 120 44 Praha 2

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

Reviewed paper / Recenzovaný článek

Kubizniaková, P., Brožová, M., Matoulková, D., 2018: Brewing microbiology – *Kocuria (Micrococcus)* and cultivation methods for their detection – part 2. Kvasny Prum. 64(4): 156–160

This publication is a sequel to the study Microbiology of brewing – *Kocuria (Micrococcus)* and cultivation methods for their detection – part 1 (Matoulková and Kubizniaková, Kvasny Průmysl 64(1): 10–13, 2018). Growth was monitored in a set of 8 strains of *Kocuria* and *Micrococcus* on solidified culture media, e.g. MRS agar and its various modifications, the media Raka-Ray, NBB, UBA, etc. Under aerobic conditions, most strains of *Kocuria* were able to grow on UBA agar, which is designed to detect beer harmful microorganisms. Thus there is a higher likelihood of confusion of *Kocuria* with more risky *Pediococcus* and vice versa in laboratories, which do not apply anaerobic incubation conditions to detect lactic acid bacteria.

Kubizniaková, P., Brožová, M., Matoulková, D., 2018: Mikrobiologie pivovarské výroby – bakterie *Kocuria (Micrococcus)* a kultivační metody pro jejich detekci – 2. část. Kvasny Prum. 64(4): 156–160

Publikace navazuje na rešeršní článek Mikrobiologie pivovarské výroby – bakterie *Kocuria (Micrococcus)* a kultivační metody pro jejich detekci – 1. část (Matoulková a Kubizniaková, Kvasný Průmysl 64(1): 10–13, 2018). Sledován byl růst 8 kmenů bakterií rodů *Kocuria* a *Micrococcus* na ztužených kultivačních půdách, např. MRS agaru a jeho různých modifikacích, na půdě Raka-Ray, NBB, UBA atd. Za aerobních podmínek byla většina kmenů kocurií schopna růstu na UBA agaru, který je primárně určen pro detekci piva škodících mikroorganismů. V laboratořích, které neaplikují anaerobní podmínky inkubace pro detekci bakterií mléčného kvašení, existuje tedy vyšší pravděpodobnost záměny kocurií s více rizikovými pediokoky a naopak.

Keywords: aerobic bacteria, *Kocuria*, beer contamination, *Micrococcus*, *Pediococcus*

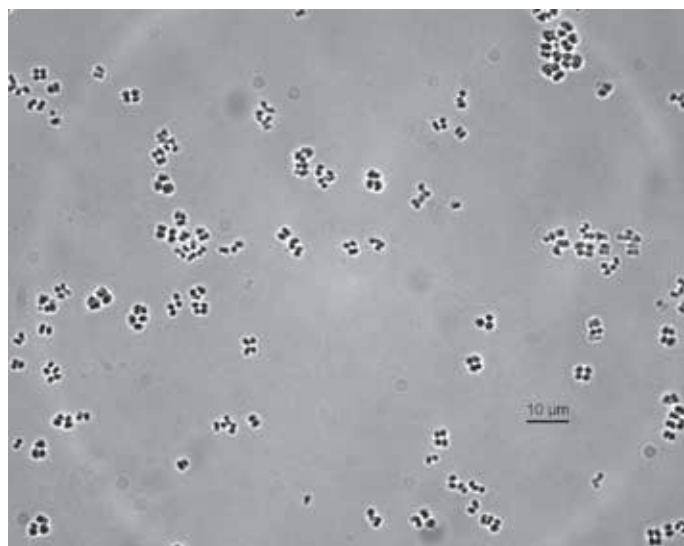
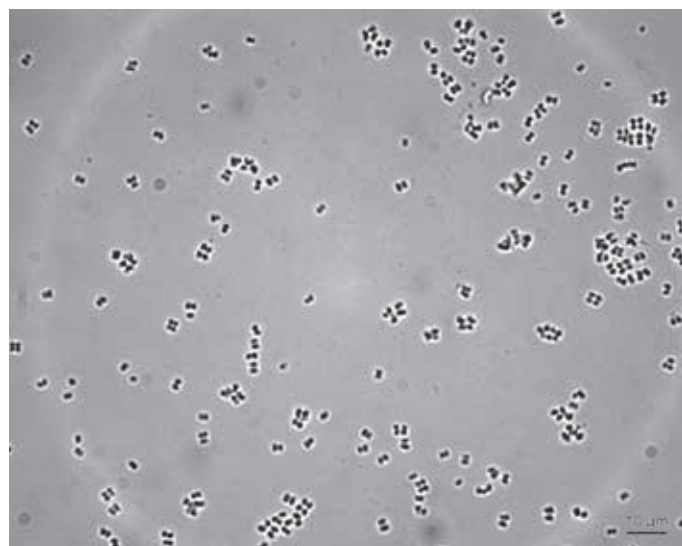
Klíčová slova: aerobní bakterie, *Kocuria*, kontaminace piva, *Micrococcus*, *Pediococcus*

1 INTRODUCTION

Bacteria of the genus *Kocuria* (formerly *Micrococcus*) are not considered to be a serious contamination of brewing production. They are Gram-positive aerobic bacteria (cocci) with respiratory type of metabolism, sensitive to bitter hop substances, alcohol and acid pH (Bokulich and Bamforth, 2013). The risk of damage to beer by *Kocuria* is relatively negligible. Significant is the misplacement of *Kocuria* for other bacteria during routine microbiological control (Vaughan et al., 2005). Cells of *Kocuria* may occur as tetrads in a microscopic sample and may be misidentified as a beer-spoiling *Pediococcus* (Fig. 1A, B). Conversely – *Pediococcus* may be falsely determined as harmless *Kocuria (Micrococcus)*. The substitution of *Kocuria* and

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, citlivé na hořké chmelové látky, alkohol a kyselý pH (Bokulich a Bamforth, 2013). Riziko poškození piva kocuriemi je poměrně zanedbatelné, jejich význam spočívá zejména v možnosti záměny s jinými bakteriemi při rutinní mikrobiologické kontrole (Vaughan et al., 2005). Kocurie se mohou vyskytovat uspořádané v tetrádách a při mikroskopii vzorku mohou být nesprávně identifikovány jako piva škodící bakterie *Pediococcus* (obr. 1A, B) a naopak – pediokoky mohou být nesprávně určeny jako neškodné kocurie (mikrokoky), zejména pokud

Fig. 1A / Obr. 1A, *Kocuria kristinae* CCM 2690^TFig. 1B / Obr. 1B *Pediococcus damnosus* CCM 3453

Pediococcus occurs especially if yeast sample is checked only microscopically without culture assay or other tests, e.g. catalase reaction, etc. (Priest and Campbell, 2003).

The identification of *Kocuria* is not done routinely in the operating brewing laboratories. Specific culture media for their diagnostics are not available. Bacteria of the genus *Kocuria* grow on common non-selective cultivation solid media such as meat-peptone agar (MPA) or plate count agar (PCA). Only two species, *Kocuria kristinae* (formerly *Micrococcus kristinae*) and *Kocuria varians* (formerly *Micrococcus varians*), are significant for microbiological control in brewing laboratories. The genus *Micrococcus* includes species which occur in various types of environment – water, soil, air, plant surface, mammalian skin including human, active sludge, meat, sausage, cheese or fish (Busse, 2015; Stackebrandt and Schumann, 2015). Due to the possibility of mistaking *Kocuria* for significantly more risky *Pediococci*, in this study we monitored their growth on different cultivation media (which are used for the detection of lactic bacteria – MRS, NBB, UBA). This study was also supplemented with media that are used for the detection of coliform bacteria – Chromocult Coliform agar, Endo agar, MacConkey agar and WLN agar.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 Composition and preparation of solid culture media

a) **PC agar** (Plate-Count-agar) (**PCA**): was prepared from dehydrated medium according to manufacturer's instructions (Merck): by dissolving 22.5g of dehydrated medium in 1000 ml of distilled water and sterilizing it for 20 minutes at 121 °C. Finished medium has a light yellow color.

b) **Meat-peptone agar** (nutrient agar) (**MPA**): was prepared from dehydrated medium according to manufacturer's instructions (Merck): by dissolving 20g of dehydrated medium in 1000 ml of distilled water and sterilizing it for 20 minutes at 121 °C. Finished medium has a light yellow color.

c) **MRS agar** (**MRS**): was prepared from dehydrated medium according to manufacturer's instructions (Merck): by dissolving 68.2g of dehydrated medium in 1000 ml of distilled water and sterilizing it for 20 minutes at 121 °C. Before pouring onto plates: to 1 liter of finished medium cooled to about 45 °C, actidione was added as an aseptically prepared solution (0.025g of actidione in 10 ml of distilled water) and β -phenylethanol at a final concentration of 0.3% vol. (3 ml per 1000 ml). Finished medium has a yellowish-brown color.

d) **NBB** (Nachweismedium für Bierschädliche Bakterien) **agar** (**NBB-A**): was prepared from commercially available dehydrated medium (NBB-P) according to the manufacturer's instructions (Döhler): by dissolving 120g of dehydrated medium and 15g bacteriological agar (Oxoid) in 1000 ml distilled water and sterilizing it for 10 minutes at 115 °C. Finished medium has a red color.

e) **UBA** (Universal Beer Agar) **agar** (**UBA**): was prepared from dehydrated medium according to the manufacturer's instructions (Oxoid): by dissolving 62g of dehydrated medium in 750 ml of distilled water and 250 ml of light draft beer. The medium was sterilized for 10 minutes at 121 °C and finished medium has a yellowish-brown color.

f) **WLN** (Wallerstein Laboratories Nutrient) **agar** (**WLN**): was prepared from dehydrated medium WLN according to the manufacturer's instructions (Oxoid): by dissolving 75g of dehydrated medium in 1000 ml of distilled water and sterilizing it for 15 minutes at 121 °C. Finished medium has a blue-green color.

g) **Chromocult Coliform agar** (**Coli**): was prepared from dehydrated medium according to the manufacturer's instructions (Merck): by dissolving 26.5g of dehydrated medium in 1000 ml of distilled water and sterilizing it for 20 minutes at 121 °C. Finished medium has a light slightly yellowish color.

h) **Endo agar** (**Endo**): was prepared from dehydrated medium according to the manufacturer's instructions (Merck): by dissolving 39g of dehydrated medium in 1000 ml of distilled water and sterilizing it for 20 minutes at 121 °C. Finished medium has a dark pink color.

i) **MacConkey agar** (**Mac**): was prepared from dehydrated medium according to the manufacturer's instructions (Merck): by dissolving 50g of dehydrated medium in 1000 ml of distilled water and sterilizing it for 20 minutes at 121 °C. Finished medium has a light pink color.

2.2 Microorganisms and culture conditions

Strains of bacteria that were used in this study originate from the Czech Collection of Microorganisms (CCM) in Brno and from the

je prováděna jenom mikroskopie vzorku kvasnic, bez kulturačního stanovení, případně dalších testů, např. na katalasovou reakci apod. (Priest a Campbell, 2003).

Průkaz kocurií není v provozních pivovarských laboratořích prováděn rutinně, pro jejich diagnostiku není k dispozici specifické kulturační médium. Rostou na běžných neselektivních kulturačních půdách, jako je masopeptonový agar (MPA) nebo tzv. plate count agar (PCA). Z hlediska mikrobiologické kontroly v pivovarské laboratoři jsou v rámci rodu *Kocuria* významné pouze dva druhy, *Kocuria kristinae* (dříve *Micrococcus kristinae*) a *Kocuria varians* („*Micrococcus varians*“). Rod *Micrococcus* zahrnuje druhy nacházející se v rozmanitých typech prostředí – voda, půda, vzduch, povrch rostlin, kůže savců včetně člověka, aktivní kal, maso, uzeniny, sýr, ryby (Busse, 2015; Stackebrandt a Schumann, 2015).

S ohledem na možnou záměnu kocurií s podstatně rizikovějšími pediokoky jsme v této studii sledovali jejich růst na různých kulturačních půdách pro detekci mléčných bakterií – MRS, NBB, UBA. Studie byla doplněna půdami pro stanovení koliformních bakterií – Chromocult Coliform agarem, Endovým agarem a MacConkey agarem, a WLN agarem.

2 MATERIÁL A METODY

2.1 Složení a příprava ztužených kulturačních médií

a) **PC agar** (Plate-Count-agar) (**PCA**): byl připraven z dehydratované půdy dle návodu výrobce (Merck): rozpuštěním 22,5g dehydratované půdy v 1000 ml destilované vody a sterilizací 20 minut při 121 °C. Hotová půda má světle žlutou barvu.

b) **Masopeptonový agar** (nutrient agar) (**MPA**): byl připraven z dehydratované půdy dle návodu výrobce (Merck): rozpuštěním 20g dehydratované půdy v 1000 ml destilované vody a sterilizací 20 minut při 121 °C. Hotová půda má světle žlutou barvu.

c) **MRS agar** (**MRS**): byl připraven z dehydratované půdy dle návodu výrobce (Merck): rozpuštěním 68,2g dehydratované půdy v 1000 ml destilované vody a sterilizací 20 minut při 121 °C. Do 1 litru hotové půdy, ochlazené na teplotu přibližně 45 °C je před jejím nalitím na misky přidán aktidion ve formě asepticky připraveného roztoku (0,025g aktidionu v 10 ml destilované vody) a β -fenylethanol v konečné koncentraci 0,3% obj. (3 ml na 1000 ml). Hotová půda má žlutohnědou barvu.

d) **NBB** (Nachweismedium für Bierschädliche Bakterien) **agar** (**NBB-P**) dle návodu výrobce (Döhler): rozpuštěním 120g dehydratované půdy a 15g bakteriologického agaru (Oxoid) v 1000 ml destilované vody a sterilizací 10 minut při 115 °C. Hotová půda má červené zbarvení.

e) **UBA** (Universální pивní agar; Universal Beer Agar) **agar** (**UBA**): byl připraven z dehydratované půdy dle návodu výrobce (Oxoid): rozpuštěním 62g dehydratované půdy v 750 ml destilované vody a přidáním 250 ml světlého výčepního piva. Půda se sterilizuje 10 minut při 121 °C a hotová má žlutohnědou barvu.

f) **WLN** (Wallerstein Laboratories Nutrient) **agar** (**WLN**): byl připraven z komerčně dostupné dehydratované půdy WLN dle návodu výrobce (Oxoid): rozpuštěním 75g dehydratované půdy v 1000 ml destilované vody a sterilizací 15 minut při 121 °C. Hotová půda má modrozelené zbarvení.

g) **Chromocult Coliform agar** (**Coli**): byl připraven z dehydratované půdy dle návodu výrobce (Merck): rozpuštěním 26,5g dehydratované půdy v 1000 ml destilované vody a sterilizací 20 minut při 121 °C. Hotová půda má světlou lehce nažloutlou barvu.

h) **Endo agar** (**Endo**): byl připraven z dehydratované půdy dle návodu výrobce (Merck): rozpuštěním 39g dehydratované půdy v 1000 ml destilované vody a sterilizací 20 minut při 121 °C. Hotová půda má tmavě růžovou barvu.

i) **MacConkey agar** (**Mac**): byl připraven z dehydratované půdy dle návodu výrobce (Merck): rozpuštěním 50g dehydratované půdy v 1000 ml destilované vody a sterilizací 20 minut při 121 °C. Hotová půda má světle růžovou barvu.

2.2 Mikroorganismy a kulturační podmínky

Kmeny bakterií, které byly použity v této práci, pocházejí z České sbírky mikroorganismů (CCM) v Brně a ze Sbírký pivovarských mikroorganismů VÚPS (RIBM). Seznam kmenů, jejich označení a původ jsou uvedeny v tab. 1. Před vyočkováním na testované půdy byly kmeny inkubovány na PC agaru (PCA) při teplotě 28 °C po dobu 72 hodin.

Table 1 The strains, their designations and origin
Tab. 1 Seznam kmenů, jejich označení a původ

Species Druh	Strain* Kmen*	Origin Původ	Optimal growth temperature Optimální teplota růstu	Colony pigment Pigment kolonií
<i>Kocuria kristinae</i>	CCM 2690 ^T	Human skin <i>Lidská kůže</i>	37 °C	Creamy to light yellow <i>Krémový až sv. žlutý</i>
<i>Kocuria kristinae</i>	CCM 2691	Human skin <i>Lidská kůže</i>	37 °C	Creamy to light yellow <i>Krémový až sv. žlutý</i>
<i>Kocuria kristinae</i>	CCM 2692	Human skin <i>Lidská kůže</i>	37 °C	Creamy to light yellow <i>Krémový až sv. žlutý</i>
<i>Kocuria varians</i>	CCM 884	Milk <i>Mléko</i>	37 °C	Yellow <i>Žlutý</i>
<i>Kocuria rosea</i>	CCM 679	Unknown <i>Neznámý</i>	30 °C	Pink <i>Růžový</i>
<i>Micrococcus luteus</i>	CCM 169 ^T	Unknown <i>Neznámý</i>	30 °C	Yellow <i>Žlutý</i>
<i>Micrococcus luteus</i>	CCM 851	Unknown <i>Neznámý</i>	30 °C	Yellow-green <i>Žlutozelený</i>
<i>Micrococcus luteus</i>	RIBM 2-115	Brewery plant – water <i>Pivovarský provoz – voda</i>	30 °C	Yellow <i>Žlutý</i>

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

RIBM – Collection of Brewery Microorganisms, Research Institute of Brewing and Malting, Prague, Czech Republic
Sbírka pivovarských mikroorganismů, Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, a. s.

Collection of Brewing Microorganisms of the RIBM. The strains, their designations and origin are listed in *Table 1*. Prior to inoculation to test media, the strains were incubated on PC agar (PCA) at 28 °C for 72 hours.

2.3 Preparation of bacterial suspensions and culture conditions

Suspensions of bacteria were prepared by stirring one colony in sterile saline, with a final concentration of approximately 3×10^8 cells/ml. The suspension was diluted so as to give a countable number (i.e. 10–50) of grown colonies on Petri dishes. Incubation was conducted for 72 hours at 28 and 37 °C. All variants were prepared in duplicate – for aerobic and anaerobic incubation using the Anaerocult system (Merck). Bacterial growth was evaluated and documented after completion of cultivation.

3 RESULTS AND DISCUSSION

During anaerobic cultivation, *Kocuria* and *M. luteus* did not grow on any of the tested media. The results of aerobic cultivation of *Kocuria* on different cultivation media at 28 and 37 °C are presented in *Tables 2* and *3*. Most strains grew on common non-selective media at both temperatures with a similar rate of growth and they provided the same large colonies. The exception were strains *M. luteus* RIBM 2-115 (it did not grow at 37 °C on PCA) and *K. kristinae* CCM 2691 (grew only at 37 °C on Chromocult Coliform) and strains *K. rosea* CCM 679 a *M. luteus* CCM 851 (they did not grow at 37 °C on UBA).

3.1 Growth and appearance of colonies

All strains grew on the basic cultivation media MPA and PCA. The appearance of the colonies is documented in *Fig. 2*. *Kocuria* and

2.3 Příprava bakteriální suspence a kultivační podmínky

Suspence bakterií byly připraveny rozmícháním 1 kolonie ve sterilním fyziologickém roztoku, s výslednou koncentrací buněk přibližně 3×10^8 /ml. Suspence byly naředěny tak, aby na Petriho miskách narostlo počítatelné množství kolonií (tj. 10-50). Inkubace probíhala při teplotě 28 a 37 °C po dobu 72 hodin. Všechny varianty byly připraveny dvojmo – pro inkubaci aerobně a anaerobně s použitím systému Anaerostat – Anaerocult (Merck). Po ukončení kultivace byl vyhodnocen a dokumentován růst bakterií.

3 VÝSLEDKY A DISKUZE

Při anaerobní kultivaci nedošlo k nárůstu kocurií a *M. luteus* na žádné z testovaných půd. Výsledky aerobních kultivací kocurií na různých kultivačních půdách při teplotách 28 a 37 °C jsou prezentovány v *tab. 2* a *3*. Většina kmenů rostla na základních neselektivních půdách při obou teplotách obdobnou rychlostí a poskytovala stejně veliké kolonie. Výjimku tvořily kmeny *M. luteus* RIBM 2-115 (nerostl při teplotě 37 °C na PCA agaru), *K. kristinae* CCM 2691 (na půdě Chromocult Coliform rostl pouze při teplotě 37 °C) a kmeny *K. rosea* CCM 679 a *M. luteus* CCM 851 (nenarostly při 37 °C na UBA agaru).

3.1 Růst a vzhled kolonií

Na základních kultivačních půdách MPA a PCA rostly všechny kmeny, vzhled kolonií je dokumentován na *obr. 2*. Kocurie a mikrokoky rostou ve formě plochých, různě zbarvených hladkých lesklých kolonií s hladkým okrajem. Kolonie bakterií *K. kristinae* měly světle krémové zbarvení (*obr. 2A*) ve shodě s Backovým Atlasem mikroorganismů, což odpovídá charakteristice druhu (Back, 2005; Matoul-

Table 2 Aerobic growth of bacteria at 28 °C
Tab. 2 Růst bakterií aerobně při 28 °C

Species Druh	Strain Kmen	Culture medium Kultivační médium								
		MPA	PCA	MRS	NBB	UBA	WLN	Coli	Endo	Mac
<i>K. kristinae</i>	CCM 2690 ^T	+	+	–	–	+	–	+	–	–
	CCM 2691	+	+	–	–	+	–	–	–	–
	CCM 2692	+	+	–	–	+	–	+	–	–
<i>K. rosea</i>	CCM 679	+	+	–	–	+	–	–	–	–
<i>K. varians</i>	CCM 884	+	+	–	–	+	–	–	–	–
<i>M. luteus</i>	CCM 169 ^T	+	+	–	–	–	–	–	–	–
	CCM 851	+	+	–	–	+	–	–	–	–
	RIBM 2-115	+	+	–	–	+	–	–	–	–

Table 3 Aerobic growth of bacteria at 37 °C
Tab. 3. Růst bakterií aerobně při 37 °C

Species Druh	Strain Kmen	Culture medium Kultivační médium								
		MPA	PCA	MRS	NBB	UBA	WLN	Coli	Endo	Mac
<i>K. kristinae</i>	CCM 2690 ^T	+	+	–	–	+	–	+	–	–
	CCM 2691	+	+	–	–	+	–	+	–	–
	CCM 2692	+	+	–	–	+	–	+	–	–
<i>K. rosea</i>	CCM 679	+	+	–	–	–	–	–	–	–
<i>K. varians</i>	CCM 884	+	+	–	–	+	–	–	–	–
<i>M. luteus</i>	CCM 169 ^T	+	+	–	–	–	–	–	–	–
	CCM 851	+	+	–	–	–	–	–	–	–
	RIBM 2-115	+	–	–	–	+	–	–	–	–

Micrococcus grow in the form of flat, colorless, smooth shiny colonies with a smooth rim. The colonies of *K. kristinae* had a light creamy color (Fig. 2A), which is in agreement with the Back Atlas of microorganisms and it corresponds to the characteristics of the species (Back, 2005; Matoulková and Kubizniaková, 2018). The colonies of *K. varians* and *M. luteus* were bright yellow (Fig. 2B, D). Typically, the *K. rosea* colonies had a pink color (Sedláček, 2007) (Fig. 2C).

None of the *Kocuria* and *Micrococcus* strains grew on the MRS and NBB media which are primarily intended for the detection of lactic acid bacteria. Most of the strains grew at 28 °C on beer agar (UBA), which is designed to detect beer harmful microorganisms. Only strain *M. luteus* CCM 169^T did not grow. According to the authors of UBA agar (Kozulis and Page, 1968), this medium allows (depending on the actidione content and the incubation conditions) detection of various beer harmful microorganisms - addition of actidione can eliminate yeast growth and anaerobic culture conditions suppress the growth of acetic acid bacteria - the medium then allows

ková a Kubizniaková, 2018). Kolonie *K. varians* a *M. luteus* byly jasně žluté (obr. 2B, D). Typicky růžové zbarvení (Sedláček, 2007) měly kolonie *K. rosea* (obr. 2C).

Na půdách MRS a NBB, určených primárně pro detekci mléčných bakterií, nenarostl žádný z kmenů *Kocuria* a *Micrococcus*. Na pivním agaru (UBA), určeném pro detekci piva škodících mikroorganismů, narostly při teplotě 28 °C všechny kmeny kromě *M. luteus* CCM 169^T. Podle autorů UBA agaru (Kozulis a Page, 1968) umožňuje tato půda, v závislosti na obsahu aktidionu a inkubačních podmínkách, detekci různých piva škodících mikroorganismů – přidávkem aktidionu lze eliminovat růst kvasinek a anaerobní podmínky kultivace potlačí růst octových bakterií – půda pak umožní stanovení mléčných bakterií adaptovaných na růst v pivu. Z našich výsledků však vyplývá, že při použití UBA agaru může docházet k záměně kocurií / mikrokoků s podstatně rizikovějšími pediokoky.

Na Endové a MacConkeyho agaru nerostl žádný kmen kocurií ani mikrokoků. Na půdě Chromocult Coliform rostla při obou teplotách *K. kristinae* CCM 2690^T a CCM 2692. Při teplotě 37 °C navíc i *K. kris-*

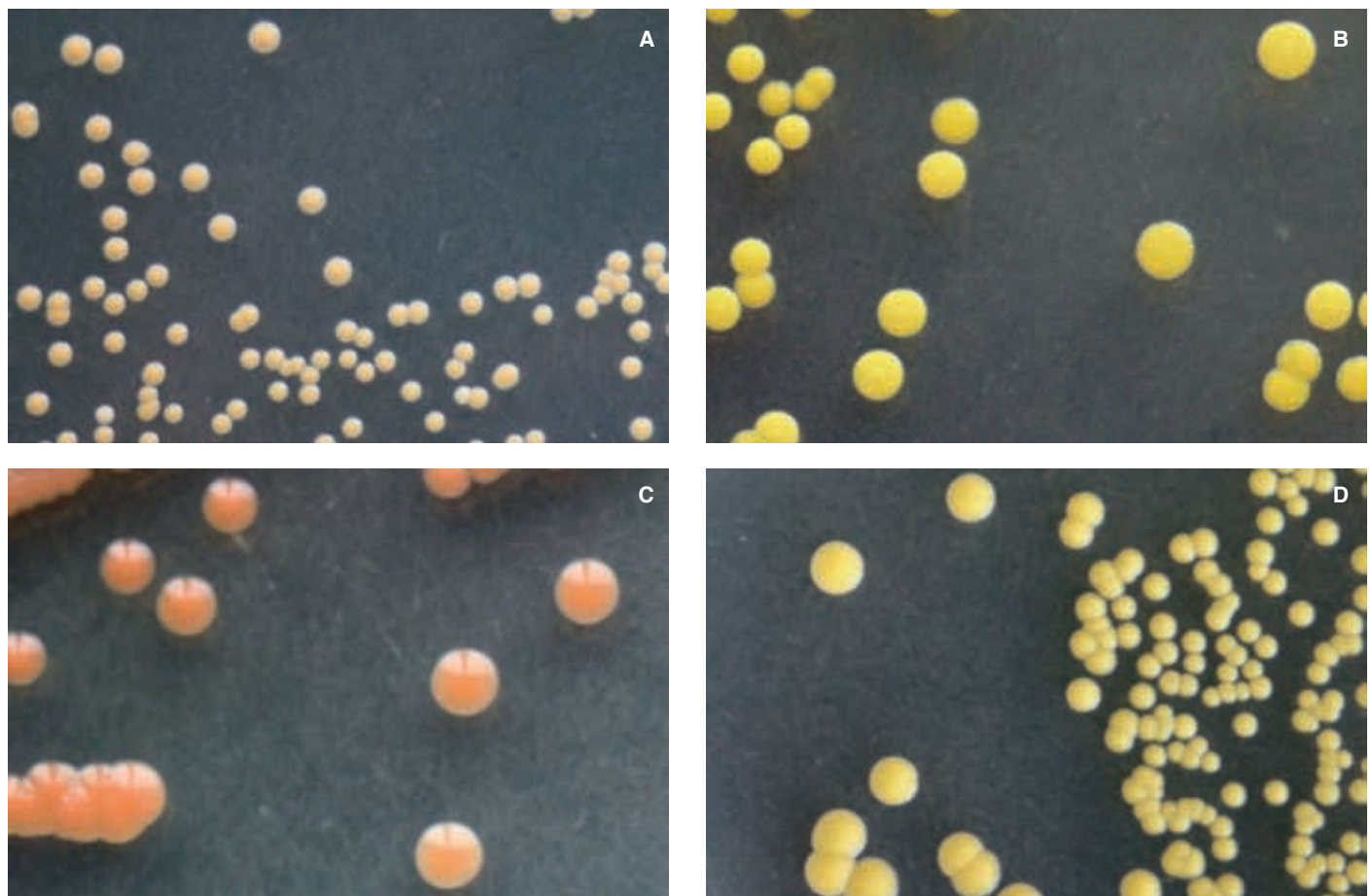
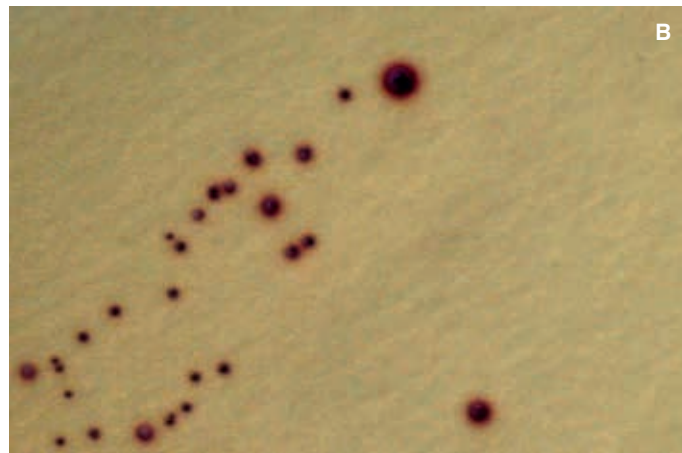


Fig. 2 Colonies of bacteria on nutrient agar (MPA) after 3 days of incubation at 28 °C
A – *Kocuria kristinae* CCM 2690^T; B – *Kocuria varians* CCM 884; C – *Kocuria rosea* CCM 679; D – *Micrococcus luteus* CCM 169^T
Obr. 2 Kolonie bakterií na masopeptonovém agaru (MPA) po 3 dnech inkubace při teplotě 28 °C
A – *Kocuria kristinae* CCM 2690^T; B – *Kocuria varians* CCM 884; C – *Kocuria rosea* CCM 679; D – *Micrococcus luteus* CCM 169^T

Fig. 3 Colonies of bacteria on Chromocult Coliform agar after 2 days of incubation at 37 °C

A – *Kocuria kristinae* CCM 2690^T; B – *Kocuria kristinae* CCM 2692

Obr. 3 Kolonie bakterií na Chromocult Coliform agaru po 2 dnech inkubace při 37 °C

A – *Kocuria kristinae* CCM 2690^T; B – *Kocuria kristinae* CCM 2692

the determination of lactic acid bacteria that are adapted to growth in beer. However, our results show that while using UBA agar, *Kocuria*/micrococci may be confused with significantly more risky *Pediococcus*.

None of the *Kocuria* and *Micrococcus* strains grew on the Endo agar and MacConkey agar. *K. kristinae* CCM 2690^T grew on Chromocult Coliform at 28 °C and also at 37 °C. *K. kristinae* CCM 2691 grew on Chromocult Coliform only at 37 °C. The strains *K. kristinae* CCM 2690^T and CCM 2691 retain their light yellow pigment on this medium (Fig. 3A). However, the strain *K. kristinae* CCM 2692 produces purple-pink colonies on Chromocult Coliform (Fig. 3B) and may be confused with coliform bacteria. A simple KOH test could provide a reliable differentiation of this strain.

The monitored group of bacteria did not grow on the WLN medium.

4 CONCLUSIONS

Bacteria of the genus *Kocuria* (formerly *Micrococcus*) are less severe microbial contaminants of brewing operations and they are not specifically monitored. However, they may be mistaken for more risky pediococci, or vice versa. Anaerobic incubation did not show their growth on solid culture media, which are intended for detection of lactic acid bacteria. Under aerobic conditions, most strains of *Kocuria* were able to grow on UBA agar. There is a higher likelihood of confusion of *Kocuria* with *Pediococcus* and vice versa in laboratories, which do not apply anaerobic incubation conditions to detect lactic acid bacteria.

ACKNOWLEDGEMENTS

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

REFERENCES / LITERATURA

- Back, W., 2005: Brewery. In: Back W. (Ed.), Colour atlas and handbook of beverage biology. Verlag Hans Carl, Nürnberg, Germany: 10–112.
- Bokulich, N. A., Bamforth, C.W., 2013: The microbiology of malting and brewing. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 77: 157–172.
- 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. DOI: 10.1002/9781118960608
- Kozulis, J. A., Page, M. E., 1968: A new universal beer agar medium for the enumeration of wort and beer microorganisms. *Proc. Am. Soc. Brew. Chem.*: 52–58.
- Matoulková, D., Kubizniaková, P., 2018: Brewing microbiology – *Kocuria (Micrococcus)* and cultivation methods for their detection – part I. *Kvasný Prum.*, 64(1): 10–13.

tinae CCM 2691. Kmeny *K. kristinae* CCM 2690^T a CCM 2691 si i na této půdě zachovávají svůj světle žlutý pigment (obr. 3A). Kmen *K. kristinae* CCM 2692 však na půdě Chromocult Coliform vytváří fialovorůžové kolonie (obr. 3B) a může být zaměněn za koliformní bakterie. Jeho spolehlivé odlišení by v takovém případě umožnil např. jednoduchý KOH test.

Na půdě WLN sledovaná skupina bakterií nerostla.

4 ZÁVĚR

Bakterie rodu *Kocuria* (dříve *Micrococcus*) jsou méně závažnou mikrobiální kontaminací pivovarského provozu a jako takové nejsou cíleně sledovány. Mohou však být zaměněny za více rizikové pedio-koky, případně naopak. Při anaerobní inkubaci nebyl pozorován jejich růst na půdách určených pro detekci bakterií mléčného kvašení. Za aerobních podmínek byla většina kmenů kocurií schopna růstu na UBA agaru. V laboratořích, které neaplikují anaerobní podmínky inkubace pro detekci bakterií mléčného kvašení, existuje tedy vyšší pravděpodobnost záměny kocurií s pedio-koky a naopak.

PODĚKOVÁNÍ

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

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, DOI: 10.1002/9781118960608

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: 10/05/2018
Accepted for publication / Přijato k publikování: 06/06/2018