

Divoké kvasinky a metody jejich detekce – II. část

Wild Yeasts and Methods for Their Detection – Part II

Petra KUBIZNIAKOVÁ¹, Jana KOPECKÁ², Dagmar MATOULKOVÁ¹

¹ Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, a.s., / *Research Institute of Brewing and Malting, PLC, Lípová 15, 120 44 Prague, Czech Republic*

² Ústav experimentální biologie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova Univerzita Brno, Tvrdého 14, 602 00 Brno / *Institute of Experimental Biology, Faculty of Science, Masaryk University Brno, Tvrdého 14, 602 00 Brno, Czech Republic*
e-mail: kubizniakova@beerresearch.cz

Recenzovaný článek / *Reviewed paper*

Kubizniaková, P. – Kopecká, J. – Matoulková, D.: Divoké kvasinky a metody jejich detekce – II. část. Kvasny Prum. 60, 2014, č. 4, s. 78–87

Publikace navazuje na úvodní článek Mikrobiologie pivovarské výroby – Divoké kvasinky a metody jejich detekce (Matoulková et al., Kvasný Průmysl 59(9): 246–257, 2013). V práci byl sledován růst souboru 143 kmenů kulturních (pivovarských a vinařských) a divokých kvasinek na vybraných selektivních půdách určených pro detekci divokých kvasinek: WLN agar, mladinový agar obsahující kyselinu monoiodoaceticovou, lysinový agar, agar s krystalovou violetí, agar se síranem měďnatým. Sledován byl dále růst kvasinek na MYGP agaru obsahující antibiotikum aktidion a na YPD agaru při teplotě 37 °C. Vyhodnocena byla využitelnost půd v provozní pivovarské laboratoři.

Kubizniaková, P. – Kopecká, J. – Matoulková, D.: Wild yeasts and methods for their detection – Part II. Kvasny Prum. 60, 2014, No. 4, pp. 78–87

This study is a sequel to the preceding article “Microbiology of brewing – Wild yeasts and methods for their detection” (Matoulková et al., Kvasný Průmysl 59(9): 246–257, 2013). The growth was monitored of a set of 143 strains of culture (brewing and wine) and wild yeasts in selected selective media designed for the detection of wild yeasts: WLN agar, wort agar containing monoiodoacetic acid, lysine agar, agar with crystal violet and agar with copper sulphate. Yeast growth was further studied on MYGP agar plates containing the antibiotic actidione and on YPD agar medium at 37 °C. The usefulness of the media in the brewery laboratory was evaluated.

Kubizniaková, P. – Kopecká, J. – Matoulková, D.: Die Wildhefe und Methoden ihrer Detektion – II. Teil. Kvasny Prum. 60, 2014, Nr. 4, S. 78–87

Diese Publikation ist eine Fortsetzung des Leitartikels „Mikrobiologie der Brauproduktion – wilde Hefe und ihre Detektion“ (Matoulková et al., Kvasný Průmysl 59(9): 246–257, 2013). Im Artikel wurde ein Wachstum einer Datei von 143 Kulturhefen (Brau und Weinhefe) und Wildhefen auf den folgenden für die Kultivierung der Wildhefe ausgewählten selektiven Böden verfolgt: : WLN Agar, Würzeagar, mit der Mono Iodessigsäure, Lysin-Agar, Agar mit Kristallviolett und Agar mit Kupfersulfat. Weiterhin wurde bei der Temperatur 37 °C ein Wachstum der Hefe am Antibiotikum Aktidion enthaltend MYGP Agar und am YPD Agar verfolgt. Es wurde auch die Anwendbarkeit von den Böden im Brauereilabor ausgewertet..

Klíčová slova: mikrobiální kontaminace piva, divoké kvasinky, cizí kvasinky, *Saccharomyces*, non-*Saccharomyces*, kultivační půdy

Keywords: microbial contamination of beer, wild yeast, foreign yeast, *Saccharomyces*, non-*Saccharomyces*, culture media

1 ÚVOD

Tato studie navazuje na úvodní článek týkající se problematiky detekce divokých kvasinek (Matoulková et al., 2013). Původní studie byla provedena na souboru 19 kulturních a divokých kvasinek. V této práci byl rozšířen soubor testovaných kmenů kvasinek, a to jak kulturních (30 kmenů), tak kvasinek vinařských (26 kmenů), a divokých kvasinek rodu *Saccharomyces* (36 kmenů) i non-*Saccharomyces* (51 kmenů). Termínem „divoké kvasinky“ máme na mysli kvasinky jiné než kulturní, i přesto, že záměna kmene v provozech, kde je používáno více kmenů (zejména současně spodní a svrchní kmen), může mít pro výsledný produkt stejné nebo horší následky než náhodná kontaminace divokými kvasinkami.

Některé kmeny kulturních kvasinek rostou na půdách určených pro detekci divokých kvasinek. Je to dáno různou mírou tolerance k selektivní složce půd – např. půda s krystalovou violetí v koncentraci 0,02 g/l umožnila růst některých kulturních kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* a kvasinek *Torulaspora*, za současného potlačení růstu spodních pivovarských kvasinek a většiny divokých kvasinek skupiny non-*Saccharomyces*. Na půdě obsahující síran měďnatý bylo dosaženo největšího záchytu divokých kvasinek skupiny non-*Saccharomyces* a rostly na ní i některé svrchní pivovarské kvasinky (Matoulková et al., 2013).

Spolehlivé odlišení spodních a svrchních pivovarských kvasinek je také stále problematické. Pivovarské kvasinky zahrnují dva taxonomicky i technologicky odlišné druhy, spodní kvasinky *Saccharomyces pastorianus* a svrchní kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*. Allopolyploidní genom *S. pastorianus* vznikl křížením mezi druhy, pravděpodobně svrchním kmenem *S. cerevisiae* a nedávno objeveným kryotolerantním *S. eubayanus* (Libkind et al. 2011; Pengelly et al. 2013). Hybridní původ spodních kvasinek značně ztěžuje jejich odlišení, a to nejen na základě fenotypových vlastností, ale i na základě analýz DNA (Kopecká et al., 2013).

1 INTRODUCTION

This study is a continuation of a preceding article on the detection of wild yeasts (Matoulková et al., 2013), which was conducted on a set of 19 culture and wild yeasts. The present work extended the set of yeast strains under study to include culture (30 strains), wine (26 strains), wild *Saccharomyces* (36 strains) and non-*Saccharomyces* (51 strains) yeast. The term „wild yeast“ denotes yeast other than culture, even though an inadvertent substitution of a strain in brewery plants where more strains are used (especially when top- and bottom-fermenting strains are used simultaneously) may affect the final product in the same or worse manner than an accidental contamination by wild yeasts.

Some strains of culture yeast grow on media intended for the detection of wild yeasts. This is due to different degrees of tolerance to a selective component of the media – for example, medium with crystal violet at a concentration of 0.02 g/l has supported the growth of certain culture yeasts of *Saccharomyces cerevisiae* and *Torulaspora* yeast while suppressing the growth of the bottom-fermenting brewing yeast and most wild yeasts of non-*Saccharomyces* group. The medium containing copper sulphate supported the largest capture of non-*Saccharomyces* wild yeast while some top brewer's yeast grew on it (Matoulková et al., 2013).

Reliable differentiation of bottom and top brewer's yeast is still a problem. Brewer's yeast includes two taxonomically and technologically distinct species, the bottom-fermenting yeast *Saccharomyces pastorianus* and top-fermenting yeast *Saccharomyces cerevisiae*. The allopolyploid genome of *S. pastorianus* has originated from inter-species crosses, probably a top strain of *S. cerevisiae* and the recently discovered cryotolerant *S. eubayanus* (Libkind et al., 2011; Pengelly and Wheals, 2013). The hybrid origin of bottom yeast makes it more difficult to distinguish it not only on the basis of phenotypic characteristics but also on the basis of DNA analysis (Kopecká et al., 2013).

Cílem naší práce bylo rozšíření souboru testovaných kmenů kulturních a divokých kvasinek a vyhodnocení různých kultivačních půd pro stanovení divokých kvasinek s přihlédnutím na jejich reálnou využitelnost v provozní pivovarské laboratoři.

2 MATERIÁL A METODY

2.1 Složení a příprava kultivačních médií

Základním médiem pro kultivaci kvasinek před vyočkováním na selektivní půdy byl sladinný agar, který lze připravit z provozní sladiny nebo z dehydratované půdy dodávané komerčně (např. od firmy Oxoid). Jako kontrolní médium pro porovnání růstu kvasinek na různých půdách byl použit Wallerstein Laboratory nutrient agar (WLN). Selektivní půdy: mladinný agar s kyselinou monoiodoaceticou (KJO), lysinový agar (LYS), mladinný agar s krystalovou violetí (KV), mladinný agar se síranem měďnatým (CuA), MYGP agar s aktidionem (ACT). Složení a postup přípravy půd je uveden v úvodním článku (Matoulková et al., 2013). Pro půdy ke kultivaci vinařských kvasinek byla místo mladiny použita sladina. Na některých půdách (sladinný a mladinný agar, WLN atd.) mohou růst i bakterie. Pro jejich inhibici se běžně využívá tetracyklin (Šavel, 1980). V naší studii jsme pracovali s čistými kulturami kvasinek a média proto tetracyklin neobsahovala. Při přípravě půd pro detekci divokých kvasinek v reálných vzorcích je přidavek tetracyklinu nutný.

2.2 Mikroorganismy a růstové podmínky

Kulturní a divoké kmeny kvasinek, které byly použity v této práci, pocházejí ze Sbírký pivovarských mikroorganismů RIBM VÚPS, a.s., sbírký DSMZ v Braunschweigu (Německo) a České sbírký mikroorganismů CCM v Brně. Seznam kmenů, jejich označení a bližší specifikace jsou uvedeny v tab. 1, 2, 3 a 4. Použito bylo 15 kmenů spodních pivovarských kvasinek *Saccharomyces pastorianus* a 15 kmenů svrchního kvašení *Saccharomyces cerevisiae* (tab. 1). Součástí souboru kvasinek bylo 26 kmenů kulturních vinařských kvasinek druhu *Saccharomyces cerevisiae* (tab. 2), 36 kmenů divokých kvasinek rodu *Saccharomyces* (tab. 3) a 51 kmenů divokých kvasinek skupiny *non-Saccharomyces* (tab. 4). Součástí souboru kvasinek jsou i kmeny použité v předcházející studii (Matoulková et al., 2013). V tabulkách i v textu je použito platné názvosloví kvasinek (Kurtzman 2011). Vzhledem k tomu, že některé z aktuálních názvů nejsou v praxi běžně využívány, uvádíme pro přehlednost v závorce i jejich již neplatná, ale stále používaná synonyma, např. *Meyerozyma guilliermondii* („*Pichia guilliermondii*“), *Wickerhamomyces anomalus* („*Pichia anomala*“) apod.

Před vyočkováním na testované půdy byly kvasinky inkubovány na sladinném agaru při teplotě 26 °C po dobu 48 h. Suspense kvasinek byla následně připravena rozmícháním 1 kolonie ve sterilním fyziologickém roztoku, s výslednou koncentrací buněk přibližně 5 mil/ml. Pomocí desítkového ředění byly suspence naředěny tak, aby na Petriho miskách s testovanými půdami narostlo 10–50 kolonií. Po 96 hodinách inkubace při teplotě 26 °C byl vyhodnocen a zdokumentován nárůst kultur. Pro rozdělení kvasinek na základě maximální růstové teploty byly kmeny inkubovány na YPD agaru při teplotě 37 °C po dobu 96 hodin.

3 VÝSLEDKY A DISKUSE

3.1 Růst spodních a svrchních pivovarských kvasinek

V první části práce byl sledován růst kulturních pivovarských kvasinek na selektivních půdách určených pro detekci divokých kvasinek. Cílem bylo zjistit, do jaké míry jsou různé půdy použitelné pro odlišení spodních a svrchních kvasinek, a zároveň, jakým způsobem může přítomnost kulturních kvasinek obou druhů ve vyšetřovaném vzorku ovlivnit stanovení divokých kvasinek. Výsledky jsou uvedeny v tab. 1 a na obr. 1.

Spodní a svrchní kvasinky lze do jisté míry odlišit pomocí půdy WLN. Kvasinky spodního kvašení *S. pastorianus* redukují bromkresolovou zeleně obsaženou v půdě a vytvářejí hladké světlé krémové kolonie, zatímco růst svrchních kvasinek není doprovázen redukcí bromkresolové zeleně a jejich kolonie jsou zelené (Hall, 1970; Hall, 1971; Jespersen a Jakobsen, 1996). Z testovaného souboru spodních kvasinek pouze kmen RIBM 11 vytvářel zelené kolonie, ostatní kmeny vytvářely krémově zbarvené kolonie. Svrchní kvasinky rostly ve formě zelených kolonií s výjimkou 2 kmenů (*S. cerevisiae* RIBM 140 a RIBM 154), jejichž kolonie se svým zbarvením nelišily od spodních pivovarských kvasinek

The aim of our study was to broaden the range of tested strains of culture and wild yeasts and evaluate different laboratory media used for the determination of wild yeasts with regard to their applicability in real brewery laboratory.

2 MATERIAL AND METHODS

2.1 Composition and preparation of culture media

The basic medium for culturing yeast before inoculation on selective medium was wort agar, which can be prepared from brewery wort or from commercially supplied dehydrated medium (e.g., from Oxoid). The control medium used for comparing the growth of yeast on different media was Wallerstein Laboratory nutrient agar (WLN). Selective media: wort agar with monoiodoacetic acid (KIO), lysine agar (LYS), wort agar with crystal violet (CV), wort agar with copper sulphate (CuA), and MYGP agar with actidione (ACT). Composition and preparation of the media was given in Matoulková et al. (2013). The medium for the cultivation of wine yeast contained sweet-wort instead of wort. Bacteria can also grow on some media (wort and sweet-wort agar, WLN, etc.). Tetracycline is commonly used for their inhibition (Šavel, 1980). In our study we worked with pure cultures of yeast and the media therefore did not contain tetracycline. The addition of tetracycline was necessary when preparing the media for the detection of wild yeasts in real samples.

2.2 Microorganisms and growth conditions

Culture and wild yeast strains that were used in this study come from the collection of brewery microorganisms of the RIBM, the DSMZ collection in Braunschweig (Germany) and the Czech Collection of Microorganisms (CCM) in Brno. The list of the strains, their designation and further specifications are given in Tables 1, 2, 3 and 4. We used 15 strains of bottom brewer's yeast *Saccharomyces pastorianus* and 15 top-fermenting strains of *Saccharomyces cerevisiae* (Table 1). The set of culture yeast also included 26 strains of wine yeast *Saccharomyces cerevisiae* (Table 2), 36 strains of wild yeasts of *Saccharomyces* genus (Table 3) and 51 strains of the wild yeast of the *non-Saccharomyces* group (Table 4). The set of yeast strains also included those employed in a previous study (Matoulková et al., 2013). The tables and the text make use of a valid yeast nomenclature (Kurtzman, 2011). Given that some of the current names are not commonly used in practice, we use for clarity in parentheses their synonyms which are no longer valid but still used, e.g. *Meyerozyma guilliermondii* („*Pichia guilliermondii*“) *Wickerhamomyces anomalus* („*Pichia anomala*“), etc.

Prior to inoculation on the test medium the yeast were incubated on wort agar at 26 °C for 48 hours. Yeast suspension was then prepared by stirring 1 colony in sterile saline, with a final cell concentration of approximately 5x10⁶/ml. The suspensions were diluted by serial 10-fold dilutions such that 10–50 colonies grew on the Petri dishes with the test media. The growth of the cultures was evaluated and documented after 96 hours of incubation at 26 °C. The strains were incubated on YPD agar medium at 37 °C for 96 hours in order to distinguish the yeast according to the maximum growth temperature.

3 RESULTS AND DISCUSSION

3.1 The growth of bottom and top brewer's yeast

In the first part of the study, the growth of brewer's yeast was monitored on selective media designed for the detection of wild yeasts. The aim was to determine the extent to which different media can be used to distinguish the bottom and top yeast and, at the same time, how can the presence of both culture yeast species in the sample affect the determination of wild yeasts. The results are shown in Table 1 and Fig. 1.

Bottom and top yeast can to some extent be distinguished using WLN medium. Bottom-fermenting yeast *S. pastorianus* reduces bromocresol green contained in the medium and forms smooth creamy pale colonies, while the growth of top yeast is not accompanied by reduction of bromocresol green and the colonies are green (Hall, 1970; Hall, 1971; Jespersen and Jakobsen, 1996). In the set of bottom yeast strains, only strain RIBM 11 formed green colonies, other tribes forming cream-colored colonies. Top yeast grew as green colonies with the exception of two strains

Tab. 1 Růst kulturních pivovarských kvasinek na různých kultivačních půdách / Table 1 Growth of culture brewer's yeast strains on various culture media

Druh / Species	Kmen / Strain	Kultivační půdy / Culture media*						
		WLN	KOJ	LYS	KV	CuA	ACT	37 °C
<i>S. pastorianus</i>	RIBM 1	k	-	-	-	-	-	~
	RIBM 2	k	-	~	-	-	-	-
	RIBM 3	k	-	-	+	-	-	-
	RIBM 6	k	-	~	-	-	-	-
	RIBM 9	k	-	~	+	-	-	-
	RIBM 10	k	-	~	+	-	-	-
	RIBM 11	z	-	~	~	+	-	-
	RIBM 15	k	-	-	+	-	-	-
	RIBM 18	k	-	-	-	-	-	-
	RIBM 32	k	-	-	~	-	-	-
	RIBM 95	k	-	~	-	-	-	-
	RIBM 96	k	-	-	-	-	-	-
	RIBM 111	k	-	-	+	~	-	-
	RIBM 112	k	-	-	+	-	-	~
	RIBM 143	k	-	-	+	+	-	~
<i>S. cerevisiae</i>	RIBM 138	z	-	~	+	+	-	+
	RIBM 139	z	-	~	+	+	-	+
	RIBM 140	k	-	~	-	-	-	+
	RIBM 145	z	-	~	+	-	-	+
	RIBM 146	z	-	-	+	-	-	+
	RIBM 147	z	-	-	+	~	-	+
	RIBM 148	z	-	~	-	-	-	+
	RIBM 149	z	-	-	-	-	-	+
	RIBM 150	z	-	-	+	+	-	+
	RIBM 151	z	-	-	+	-	-	+
	RIBM 152	z	-	~	~	-	-	+
	RIBM 153	z	-	~	+	+	-	+
	RIBM 154	k	-	~	+	+	-	+
	RIBM 155	z	-	-	+	+	-	+
	RIBM 156	z	-	-	+	+	-	+

* WLN, Wallerstein Laboratory Nutrient agar; KOJ, mladinový agar s kyselinou monoiodoctovou / wort agar with monoiodoacetic acid; LYS, lysinový agar / Lysine agar; KV, agar s krystalovou violetí / agar with crystal violet; CuA, agar s CuSO_4 / agar with CuSO_4 ; ACT, agar s aktidionem / actidione agar; 37 °C, kultivace při 37 °C / incubation at 37 °C; +, velikost kolonií srovnatelná s kontrolou (sladinový agar) / growth comparable to control (wort agar); ~, drobné kolonie / small colonies; b, bílé kolonie / white colonies; k, krémové kolonie / creamy colonies; z, zelené kolonie / green colonies; -, bez nárůstu růstu / no growth

(fotografie uvedeny v práci Matoulková et al., 2013). V kombinaci s kultivací při teplotě 37 °C jsou však i tyto dva kmeny odlišitelné od kmenů spodního kvašení. Kvasinky svrchního kvašení *S. cerevisiae* vytváří kolonie v různých odstínech zelené barvy, od nazelenalé, přes světle zelenou až po zelenou barvu (obr. 2B,C). Ze souboru testovaných kulturních kvasinek jich 14 (tj. 93,3 %) spodních na půdě WLN tvoří krémově zbarvené kolonie, 13 kmenů (86,7 %) svrchních pivovarských kvasinek tvoří kolonie zelené barvy (obr. 3).

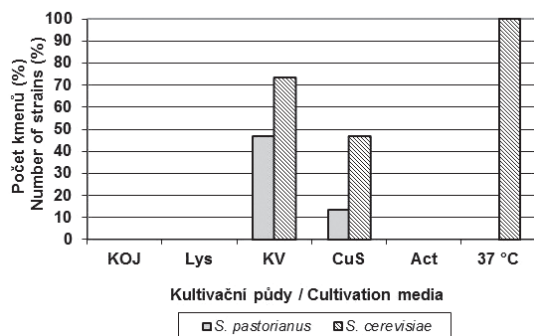
Na půdě s kyselinou monoiodoctovou a na lysinovém agaru nebyl pozorován růst žádného z kulturních kmenů kvasinek. Na lysinovém agaru kulturní kmeny (a většina divokých kvasinek rodu *Saccharomyces*) nerostou anebo narostou ve formě velmi drobných kolonií. Selektivita lysinového agaru je dána přítomností L-lysinu jako výhradního zdroje dusíku – kulturní kvasinky a většina divokých kvasinek rodu *Saccharomyces* není schopna tuto aminokyselinu využívat a na lysinové půdě tedy neroste (Walters a Thiselton, 1953). Nárůst kvasinek *Saccharomyces* na lysinovém agaru ve formě drobných kolonií je způsoben tím, že kvasinky očkované na misky nejsou úplně vyhladovělé, a nějaké malé množství živin (včetně zdroje dusíku) si přinášejí v buňkách nebo na jejich povrchu a do doby jejich vyčerpání se mohou na půdě množit (Campbell, 2003).

Mladinový agar s krystalovou violetí je méně vhodný pro průkaz divokých kvasinek. Půda s krystalovou violetí v koncentraci 0,02 g/l v naší předchozí studii umožnila růst některých kulturních kvasinek

(*S. cerevisiae* RIBM 140 and RIBM 154), the colonies of which did not differ in color from the bottom brewer's yeast (see the photo in Matoulková et al., 2013). In combination with the cultivation at 37 °C, however, even these two strains are distinguishable from bottom-fermenting strains. Top fermenting yeast *S. cerevisiae* produces colonies in various shades of green, from greenish over light green to green (Fig. 2B, C). From the set of test culture yeast strains, 14 (i.e. 93.3%) of bottom strains formed cream colonies on WLN medium, 13 strains (86.7%) of the top brewing yeast forming green colonies (Fig. 3).

No growth was observed in any of the culture yeast strains on the medium with monoiodoacetic acid and on lysine agar. On lysine agar both culture strains and most *Saccharomyces* wild yeasts do not grow or grow in the form of very small colonies. The selectivity of lysine agar is given by the presence of L-lysine as the sole nitrogen source; culture yeast and most *Saccharomyces* wild yeasts are not able to use the amino acid lysine and thus do not grow on the medium (Walters and Thiselton, 1953). The growth of *Saccharomyces* yeast on lysine agar in the form of tiny colonies is caused by the fact that yeast inoculated onto plates is not completely starved, and some amount of nutrients (including nitrogen sources) is brought in the cells or on their surface. The cells can then reproduce until an exhaustion of the sources (Campbell, 2003).

Wort agar with crystal violet is less suitable for the detection of wild yeasts. In our previous study, medium with crystal violet



Obr. 1 Růst kulturních pivovarských kvasinek na různých kultivačních půdách / Fig. 1 Growth of brewer's yeast strains on various culture media



Obr. 2 Vzhled kolonií kulturních kvasinek na půdě WLN / Fig. 2 Culture yeast colonies on WLN agar; A – *S. pastorianus* RIBM 143; B – *S. cerevisiae* RIBM 147; C – *S. cerevisiae* RIBM 151

Saccharomyces cerevisiae (3 z 5 testovaných kmenů) a kvasinek *Torulaspora*, za současného potlačení růstu spodních pivovarských kvasinek (kmenů *S. pastorianus* RIBM 2, RIBM 6, RIBM 95 a DSM 6580^T) a většiny testovaných divokých kvasinek skupiny non-*Saccharomyces* (Matoulková et al., 2013). Rozšíření souboru kmenů kulturních kvasinek v této navazující práci prokázalo, že půda s krystalovou violetí není univerzálně použitelná pro detekci divokých kvasinek. Na půdě narostlo 7 kmenů *S. pastorianus* (tedy 46,7 %) a většina svrchních kmenů (tab. 1, obr. 1). Je to dáno různou citlivostí různých kulturních i divokých kvasinek *Saccharomyces* i divokých kvasinek non-*Saccharomyces* na různé koncentrace krystalové violeti (Haikara a Enari, 1975).

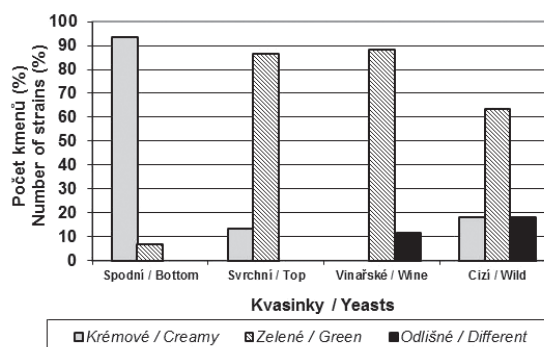
Na mladinovém agaru se síranem měďnatým narostly 2 kmeny spodního kvašení *S. pastorianus* RIBM 11 a 143 – tyto kmeny nejsou typické – kmen RIBM 11 pochází z Německa a do Sbírký VÚPS byl zařazen v roce 1963. Kmen RIBM 143 je také německého původu a je používán pro výrobu piva typu Bock, Doppelbock, Oktoberfest a Helles. Svrchních kmenů na této půdě rostlo 7, tedy přibližně polovina. V literatuře jsou uváděny různé koncentrace síranu měďnatého v médiu. Původně používaná koncentrace CuSO_4 0,55 g/l umožňovala růst pouze kvasinek skupiny non-*Saccharomyces* (Lin, 1981). Snížením koncentrace CuSO_4 na 0,2 g/l podle Taylora a Marshe (1984) je možné detekovat i některé divoké kvasinky rodu *Saccharomyces*.

Antibiotikum aktidion inhibuje syntézu proteinů u většiny eukaryot. Citlivost nebo rezistence kvasinek k různým koncentracím aktidionu je využívána jako taxonomický marker (Campbell, 2003; Harris a Watson, 1968; Kurtzman, 2011). Aktidion je běžně používán pro potlačení růstu kvasinek a plísní při stanovení přítomnosti bakterií mléčného kvašení ve vzorku (Šavel, 1980). Při použití koncentrace aktidionu 10 mg/ml je růst kulturních kvasinek stále inhibován, ale některé rezistentní divoké kvasinky mohou na půdě růst, např. *Hanseniaspora uvarum* (dříve „*Kloeckera apiculata*“), kvasinky rodu *Dekkera*, *Brettanomyces*, *Kluyveromyces*, *Candida*, *Rhodotorula* atd. (Ingledew a Casey, 1982).

Inkubace kulturních pivovarských kvasinek při teplotě 37 °C umožnila rozlišení spodních a svrchních kmenů – všechny testované kmeny *S. cerevisiae* byly schopny růstu při teplotě 37 °C, zatímco růst kvasinek *S. pastorianus* byl zcela inhibován. Spolehlivost této metody byla rozporována např. v práci Kopecké et al. (2012), kde byl prokázán inhibiční účinek teploty 37 °C na některé kmeny svrchních kvasinek.

(0.02 g/l) has allowed the growth of some strains of *Saccharomyces cerevisiae* (3 of 5 strains tested) and *Torulaspora* while suppressing the growth of bottom brewer's yeast (strains *S. pastorianus* RIBM 2, RIBM 6, RIBM 95 and DSM 6580^T) and most of the tested group of non-*Saccharomyces* wild yeasts (Matoulková et al., 2013). The extension of the number of culture yeast strains in this follow-up study has shown that medium with crystal violet is not universally applicable for detection of wild yeasts. Seven strains of *S. pastorianus* (i.e. 46.7 %) and most of the top strains (Table 1, Fig. 1) grew on this medium. This is caused by different sensitivities of various culture and wild *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* yeast to various concentrations of crystal violet (Hiker and Near, 1975).

The wort agar with copper sulphate supported the growth of 2 strains of *S. pastorianus* RIBM 11 and 143. These tribes are not typical since RIBM 11 strain comes from Germany and was added to the RIBM Collection in 1963; strain RIBM 143 is also of German origin and is used for producing beer of the types Bock, Doppelbock, Oktoberfest and Helles. Seven top strains, i.e. about



Obr. 3 Růst kulturních a divokých kvasinek na půdě WLN / Fig. 3 Growth of culture and wild yeast on WLN agar

half, grew on this medium. The literature gives different concentrations of copper sulphate in the medium. The originally used CuSO_4 concentration of 0.55 g/l allowed the growth of only non-*Saccharomyces* yeast (Lin, 1981). Some wild *Saccharomyces* yeast can be detected by reducing the concentration of CuSO_4 to 0.2 g/l (Taylor and Marsh, 1984).

Actidione is an antibiotic inhibiting protein synthesis in most eukaryotes. Sensitivity or resistance of yeast to various concentrations of actidione is used as a taxonomic marker (Campbell, 2003; Harris and Watson, 1968; Kurtzman, 2011). Actidione is commonly used to suppress the growth of yeasts and molds when determining the presence of lactic acid bacteria in a sample (Saul, 1980). When using actidione in concentration of 10 mg/ml, the growth of culture yeast is inhibited while some resistant wild yeast, e.g. *Hanseniaspora uvarum* (formerly „*Kloeckera apiculata*“), yeast of the genera *Dekkera*, *Brettanomyces*, *Kluyveromyces*, *Candida*, *Rhodotorula*, etc., can grow on the medium (Ingledew and Casey, 1982).

Incubation of culture brewing yeast at 37 °C allowed us to distinguish bottom and top strains since all tested strains of *S. cerevisiae* were able to grow at 37 °C, while the growth of *S. pastorianus* was completely inhibited. The reliability of this method was put to question by, e.g., Kopecká et al. (2012) who was reported an inhibitory effect of cultivation at 37 °C on some top yeast strains.

Tab. 2 Růst vinařských kvasinek *S. cerevisiae* na různých kultivačních půdách / Table 2 Growth of *S. cerevisiae* wine yeast on various culture media

Kmen / Strain	Kultivační půdy / Culture media*						
	WLN	KOJ	LYS	KV	CuA	ACT	37 °C
RIBM V5	b	-	-	+	+	-	+
RIBM V6	b	-	-	+	+	-	+
RIBM V7	z	-	+	+	+	-	+
RIBM V11	z	-	-	+	+	-	+
RIBM V12	z	-	-	+	+	-	+
RIBM V212	z	-	-	+	+	-	+
RIBM V14	z	-	-	+	+	-	+
RIBM V214	z	-	-	+	+	-	+
RIBM V16	z	-	-	+	+	-	+
RIBM V17	b	-	-	+	+	-	+
RIBM V24	z	-	-	~	+	-	-
RIBM V25	z	-	-	-	+	-	+
RIBM V26	z	-	-	-	+	-	+
RIBM V226	z	-	-	+	+	-	+
RIBM V27	z	-	-	+	+	-	+
RIBM V227	z	-	-	+	+	-	+
RIBM V31	z	-	-	+	+	-	+
RIBM V231	z	-	-	+	+	-	+
RIBM KS1	z	-	-	+	+	-	+
RIBM G1	z	-	~	+	-	-	+
RIBM G2	z	-	~	+	+	-	+
RIBM D1	z	-	-	+	-	-	+
RIBM A26	z	-	-	+	+	-	-
RIBM A27	z	-	-	+	+	-	+
RIBM A28	z	-	-	+	+	-	+
RIBM T.d. C	z	-	-	+	+	-	+

* WLN, Wallerstein Laboratory Nutrient agar; KOJ, mladinový agar s kyselinou monoiodoacetic / wort agar with monoiodoacetic acid; LYS, lysinový agar / Lysine agar; KV, agar s krystalovou violetí / agar with crystal violet; CuA, agar s CuSO_4 / agar with CuSO_4 ; ACT, agar s aktidionem / actidione agar; 37 °C, kultivace při 37 °C / incubation at 37 °C; +, velikost kolonií srovnatelná s kontrolou (sladinový agar) / growth comparable to control (wort agar); ~, drobné kolonie / small colonies; b, bílé kolonie / white colonies; z, zelené kolonie / green colonies; -, bez nárůstu / no growth

3.2 Růst vinařských kvasinek na různých kultivačních půdách

Nárůst vinařských kvasinek *S. cerevisiae* na jednotlivých půdách pro detekci divokých kvasinek je uveden v tab. 2. Na půdě WLN většina vinařských kmenů rostla ve formě zelených kolonií, pouze kmeny RIBM V5, V6 a V17 tvořily bílé až béžové kolonie (obr. 3). Kyselina monoiodoacetic inhibovala růst všech testovaných kmenů vinařských kvasinek. Pouze jeden kmen z celkového počtu 26 vinařských kmenů rostl na lysinovém agaru. Dva další kmeny rostly ve formě velmi drobných kolonií. Půdy s krystalovou violetí a se síranem měďnatým nejsou vhodné pro detekci kvasničných kontaminantů vína, neboť neinhibují růst kulturních vinařských kvasinek. Z celkového počtu 26 kmenů vinařských kvasinek rostlo 23 kmenů (tj. 88,5 %) na sladinovém agaru s krystalovou violetí, 24 kmenů (92,3 %) na půdě se síranem měďnatým. Při teplotě 37 °C narostlo 24 kmenů (obr. 4). Mezi nebezpečné kontaminanty vína patří zejména kvasinky rodu *Brettanomyces*, *Dekkera*, *Saccharomycodes*, *Zygosaccharomyces*, méně časté jsou *Candida*, *Hanseniaspora*, *Pichia* (Fugelsang a Edwards, 2007). Na půdě s aktidionem nebyl zaznamenán nárůst žádného z vinařských kmenů.

3.3 Růst divokých kvasinek na různých kultivačních půdách

Soubor 87 kmenů kvasinek kontaminujících prostředí nápojového průmyslu byl rozdělen do dvou skupin – 36 kmenů rodu *Saccharomyces* (tab. 3) a 51 kmenů skupiny *non-Saccharomyces* (tab. 4). Na obr. 5 je prezentováno porovnání růstu všech testovaných divokých kvasinek na jednotlivých půdách, obr. 6 dokumentuje rozdíly v nárůstu divokých kvasinek rodu *Saccharomyces* a kvasinek jiných rodů. Podobně jako u kulturních kvasinek, není v případě lysinového agaru jako pozitivní nárůst považována tvorba drobných kolonií.

Na půdě WLN s bromkresolovou zelení vytvářely divoké kvasinky kolonie různých tvarů a barev – bílé, krémové, nazelenalé až tmavě

3.2 The growth of wine yeasts on different culture media

The growth of *S. cerevisiae* wine yeast on different media used for detecting wild yeasts is shown in Table 2. Most wine strains grew on the WLN medium as green colonies, only strains RIBM V5, V6 and V17 forming white to beige colonies (Fig. 3). Monoiodoacetic acid inhibited the growth of all tested strains of wine yeast. Only one strain from a total of 26 wine strains grew on lysine agar. Two other strains grew in the form of very small colonies. Media with crystal violet and copper sulphate are not suitable for the detection of yeast wine contaminants as they do not inhibit the growth of wine yeast. Of the 26 strains of wine yeasts, 23 strains (i.e. 88.5%) grew on wort agar with crystal violet and 24 strains (92.3%) on the medium with copper sulphate. 24 strains grew at 37 °C (Fig. 4). Hazardous contaminants include wine yeast genera *Brettanomyces*, *Dekkera*, *Saccharomycodes*, *Zygosaccharomyces* and the less common *Candida*, *Hanseniaspora*, *Pichia* (Fugelsang and Edwards, 2007). No growth of wine strains was recorded on the medium with actidione.

3.3 The growth of wild yeasts in different culture media

The set of 87 yeast strains contaminating the beverage industry environments has been divided into two groups – 36 strains of *Saccharomyces* genus (Table 3) and 51 strains of *non-Saccharomyces* group (Table 4). Fig. 5 presents the comparison of the growth of wild yeasts tested on various media, Fig. 6 demonstrates the differences in the growth of wild yeasts of genus *Saccharomyces* and other yeast genera. Like with the culture yeast, the formation of tiny colonies on lysine agar is not regarded as positive growth.

On WLN medium with bromocresol green, wild yeast formed colonies of various shapes and colors – white, creamy, green-

Tab. 3 Růst divokých kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* na různých kultivačních půdách / Table 3 Growth of *Saccharomyces cerevisiae* wild yeast on various culture media

Kmen / Strain	Kultivační půdy / Culture media*						
	WLN	KOJ	LYS	KV	CuA	ACT	37 °C
RIBM Spk 1	z	-	-	+	-	-	-
RIBM Spk 2	z	-	+	+	~	-	-
RIBM Spk 3	z	-	-	+	+	~	+
RIBM Spk 4	z	-	+	+	-	-	+
RIBM Spk 9	z	-	-	-	-	-	-
RIBM Spk 10	z	-	-	+	+	-	+
RIBM Spk 11	k	-	-	+	~	-	+
RIBM Spk 13	z	-	-	+	+	-	-
RIBM Spk 14	k	-	-	+	+	-	+
RIBM Spk 16	b	-	-	+	+	-	+
RIBM Spk 17	z	-	-	+	~	-	-
RIBM Spk 18	z	-	-	+	-	-	+
RIBM Spk 19	z	-	-	+	+	-	+
RIBM Spk 20	b	-	-	+	+	-	+
RIBM Spk 23	b	-	-	+	~	-	+
RIBM Spk 24	k	-	-	+	+	-	+
RIBM Spk 30	z	-	-	+	-	-	-
RIBM Spk 32	z	-	-	-	-	-	-
RIBM Spk 37	z	-	-	+	+	-	+
RIBM Spk 40	k	-	-	+	+	-	+
RIBM Spk 48	z	-	-	+	-	-	-
RIBM Spk 57	z	-	-	+	+	-	+
RIBM Spk 67	k	-	-	+	-	-	-
RIBM Spk 79	z	-	+	+	+	-	+
RIBM Spk 80	z	-	-	+	-	-	-
RIBM Spk 92	k	-	-	+	+	-	+
RIBM Spk 96	k	-	-	+	-	-	+
RIBM Spk 101	z	-	-	+	+	-	+
RIBM Spk 119	z	-	-	+	+	-	+
RIBM Spk 201	z	-	-	+	-	-	-
RIBM BP 3	b	-	~	+	-	-	+
RIBM BP 11	k	-	~	+	-	-	-
RIBM BP 12	z	-	~	+	-	-	+
RIBM BP 14	b	~	+	-	+	+	-
RIBM BP 16	k	-	~	+	-	-	+
RIBM 122 („ <i>S. diastaticus</i> “)	k	-	~	+	+	-	+

* WLN, Wallerstein Laboratory Nutrient agar; KOJ, mladinový agar s kyselinou monoiodoaceticou / wort agar with monoiodoacetic acid; LYS, lysinový agar / Lysine agar; KV, agar s krystalovou violetí / agar with crystal violet; CuA, agar s CuSO_4 / agar with CuSO_4 ; ACT, agar s aktidionem / actidione agar; 37 °C, kultivace při 37 °C / incubation at 37 °C; +, velikost kolonií srovnatelná s kontrolou (sladinový agar) / growth comparable to control (wort agar); ~, drobné kolonie / small colonies; b, bílé kolonie / white colonies; k, krémové kolonie / creamy colonies; z, zelené kolonie / green colonies; -, bez nárůstu růstu / no growth

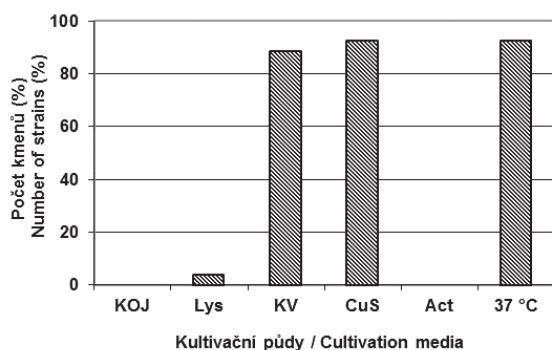
zelené. Kolonie většiny kmenů měly hladký povrch a vypouklý tvar. Menší část kvasinek vytvářela kolonie s drsným povrchem či okrajem, nebo kolonie ploché. Kolonie vybraných kmenů jsou prezentovány na obr. 7. Menší, bílé, lesklé kolonie nepravidelného tvaru tvoří *Dekkera bruxellensis* (obr. 7A). Kvasinky druhu *Hanseniaspora uvarum* („*Kloeckera apiculata*“) vytvářely na WLN agaru ploché, lesklé, tmavě zelené kolonie se světlým okrajem (obr. 7B). Kolonie *Metschnikowia pulcherrima* mají krémovou barvu s tmavším nazelenalým středem a oranžovou zónou (obr. 7C). Kvasinky rodu *Rhodotorula* vytváří na WLN agaru atypicky zbarvené kolonie (hnědé, hnědošedé), což je dáno kombinací bromkresolové zeleně a barviv, které produkují kvasinky (obr. 7D). Více jak 80 % divokých kvasinek na této půdě tvoří kolonie barevně či tvarově odlišitelné od spodních pivovarských kvasinek (obr. 3). Půda WLN je tedy vhodná pro detekci kvasinkové kontaminace v násadních kvasnicích, kvasničném hospodářství či v úseku hlavní kvašení a dokvašování v případě, kdy je ověřen a zaznamenán vzhled kolonií kulturního kmene *S. pastorianus* používaného v daném provozu.

ish to dark green. Colonies of most strains had a smooth surface and a convex shape. A smaller part of the yeast colonies formed colonies with a rough surface or edge, or flat colonies. Colonies of selected strains are shown in Fig. 7. Smaller, white, shiny irregularly shaped colonies are formed by *Dekkera bruxellensis* (Fig. 7A). *Hanseniaspora uvarum* („*Kloeckera apiculata*“) formed on WLN agar flat, glossy, dark green colonies with a bright rim (Fig. 7B). *Metschnikowia pulcherrima* colonies are creamy colored with dark center and a greenish orange zone (Fig. 7C). Yeasts of the genus *Rhodotorula* formed on WLN agar colonies with atypical color (brown, brown-gray), which is caused by a combination of bromocresol green and pigments produced by the yeast (Fig. 7D). On this medium more than 80 % of the wild yeast formed colonies distinguishable in color or shape from bottom brewer's yeast (Fig. 3). The WLN medium is therefore suitable for detection of fungal contamination of pitching yeast, yeast treatment or the main and secondary fermentation in the case when the appearance of

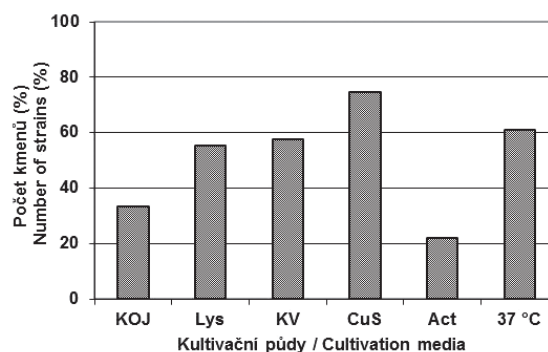
Tab. 4 Růst divokých kvasinek non-*Saccharomyces* na různých kultivačních půdách / Table 4 Growth of non-*Saccharomyces* wild yeast on various culture media

Druh / Species	Kmen / Strain	Kultivační půdy / Culture media*						
		WLN	KOJ	Lys	KV	CuA	Act	37 °C
<i>Candida rugosa</i>	RIBM TdB	b	+	+	-	+	-	-
<i>Candida sp.</i>	RIBM C6	b	-	+	+	+	-	-
<i>Candida sp.</i>	RIBM C7	z	+	+	+	+	-	+
<i>Candida sp.</i>	RIBM Spk 76	k	+	+	~	+	+	+
<i>Debaryomyces hansenii</i>	DSM 70244	b	+	+	-	+	+	+
<i>Dekkera bruxellensis</i>	DSM 70001	b	-	+	-	+	+	+
<i>Hanseniaspora osmophila</i>	DSM 2249	z	+	+	-	+	-	+
<i>Hanseniaspora uvarum</i> (<i>Kloeckera apiculata</i>)	RIBM Spk 91	z	+	~	-	+	-	+
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	RIBM A4	z	~	+	+	+	+	-
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	RIBM A7	z	~	+	+	+	+	-
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	RIBM A10	z	+	+	+	+	+	-
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	DSM 2768	z	+	+	+	+	+	-
<i>Hanseniaspora valbyensis</i> (<i>Kloeckera japonica</i>)	RIBM KI1/1	z	-	+	-	+	+	~
<i>Kluyveromyces lactis</i> (<i>Candida spherica</i>)	RIBM Spk 212	z	-	-	~	-	-	-
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	RIBM Km	z	~	+	-	+	+	+
<i>K. marxianus</i>	RIBM C1	b	-	+	-	+	+	+
<i>Kregervanrija fluxuum</i> (<i>Candida vini</i>)	DSM 70184	z	+	+	-	+	-	-
<i>Lachancea kluyveri</i> (<i>Saccharomyces kluyveri</i>)	RIBM Spk 15	z	-	+	~	+	-	+
<i>Lachancea thermotolerans</i> (<i>Kluyveromyces thermotolerans</i>)	RIBM Kth	b	-	+	+	+	+	+
<i>Lachancea thermotolerans</i> (<i>Candida dattila</i>)	RIBM Spk 221	z	-	~	+	+	-	-
<i>Lachancea thermotolerans</i> (<i>Kluyveromyces thermotolerans</i>)	DSM 3434	z	-	+	-	+	-	+
<i>Lindnera saturnus</i> (<i>Williopsis saturnus</i>)	RIBM Spk 8	z	+	+	-	+	-	-
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	DSM 70321	z	+	+	-	+	-	~
<i>Meyerozyma guilliermondii</i> (<i>Pichia guilliermondii</i>)	CCM 8224	z	+	+	-	+	+	+
<i>Pichia fermentans</i> (<i>Candida lambica</i>)	RIBM KI1/2	b	~	+	-	+	-	+
<i>Pichia membranifaciens</i>	RIBM Spk 25	b	+	+	-	+	-	-
<i>Pichia membranifaciens</i>	RIBM BS 196	z	+	+	-	+	-	+
<i>Pichia norvegensis</i> (<i>Candida norvegensis</i>)	KS 2	b	+	+	-	+	-	~
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	DSM 70403	z	+	+	-	+	+	~
<i>Rhodotorula sp.</i>	RIBM A8	z	+	+	-	+	-	-
<i>Rhodotorula sp.</i>	RIBM A9	z	+	+	-	+	+	-
<i>Schizosaccharomyces octosporus</i>	DSM 70573	z	-	-	-	+	-	+
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	DSM 70576	z	+	+	+	+	+	+
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	RIBM T1	z	-	-	-	-	+	+
<i>T. delbrueckii</i>	RIBM T2	b	-	+	+	+	-	+
<i>T. delbrueckii</i>	RIBM T3	b	-	+	-	+	+	+
<i>T. delbrueckii</i>	RIBM T4	z	+	+	+	+	-	+
<i>T. delbrueckii</i>	RIBM T5	z	-	+	-	+	-	~
<i>T. delbrueckii</i>	RIBM TdA	z	+	+	-	+	-	-
<i>T. delbrueckii</i>	RIBM Spk 222	z	-	-	~	+	-	-
<i>T. delbrueckii</i>	RIBM Spk 78	z	-	-	+	-	-	-
<i>Wickerhamomyces anomalus</i> (<i>Pichia anomala</i>)	RIBM Ha229	k	+	+	+	+	-	+
<i>W. anomalus</i>	RIBM Ha230	k	+	+	+	+	-	+
<i>W. anomalus</i>	RIBM BP 8	z	+	+	~	+	-	+
<i>W. anomalus</i>	RIBM BP 18	z	+	+	+	+	-	+
<i>W. anomalus</i>	RIBM C5	z	+	+	+	+	-	+
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	DSM 2531	k	~	+	-	+	-	+
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	CCM 8321	k	+	+	-	+	+	+
<i>Zygosaccharomyces bailli</i>	RIBM BS197/B	k	+	+	-	+	-	+
<i>Zygosaccharomyces bailli</i>	RIBM BS197/Z	z	+	+	-	+	-	+
<i>Zygosaccharomyces spp.</i>	RIBM Spk 292	z	-	-	+	+	-	+

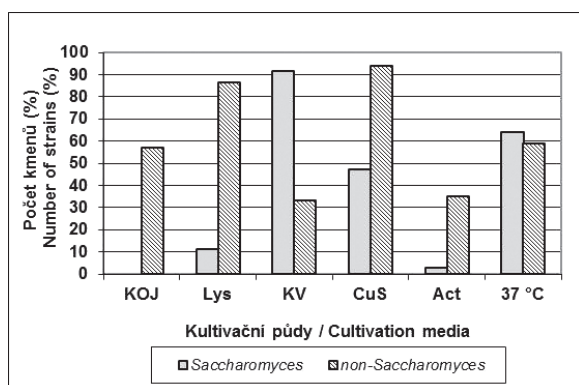
* WLN, Wallerstein Laboratory Nutrient agar; KOJ, mladinový agar s kyselinou monoiodoacetic / wort agar with monoiodoacetic acid; LYS, lysinový agar / Lysine agar; KV, agar s krystalovou violetí / agar with crystal violet; CuA, agar s CuSO_4 / agar with CuSO_4 ; ACT, agar s aktidionem / actidione agar; 37 °C; kultivace při 37 °C / incubation at 37 °C; +, velikost kolonií srovnatelná s kontrolou (sladinový agar) / growth comparable to control (wort agar); ~, drobné kolonie / small colonies; b, bílé kolonie / white colonies; k, krémové kolonie / creamy colonies; z, zelené kolonie / green colonies; -, bez nárůstu / no growth



Obr. 4 Růst vinařských kvasinek na různých kultivačních půdách / Fig. 4 Growth of wine yeast on various culture media



Obr. 5 Růst divokých kvasinek na různých kultivačních půdách / Fig. 5 Growth of wild yeast on various culture media



Obr. 6 Růst divokých kvasinek rodu *Saccharomyces* a non-*Saccharomyces* na různých kultivačních půdách / Fig. 6 Growth of *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* wild yeast on various culture media

Divoké kvasinky rodu *Saccharomyces* nerostly na mladinném agaru s kyselinou monoiodoctovou. Kyselina monoiodoctová působí jako inhibitor glykolýzy kvasinek rodu *Saccharomyces* a některých kvasinek ze skupiny non-*Saccharomyces* (Šilhánková, 1962). Zároveň potlačuje růst většiny bakterií (Šavel, 1980). Oproti tomu více než polovina kmenů (56,9 %) divokých kvasinek jiných rodů byla schopna růstu na této půdě (tab. 4 a obr. 6). Z 16 testovaných rodů pouze tři byly citlivé k účinkům kyseliny monoiodoctové a na půdě nerostly, a to *Dekkera*, *Kluyveromyces* a *Lachancea*. Jednotlivé kmeny rodů *Hanseniaspora*, *Schizosaccharomyces*, *Torulaspora* a *Zygosaccharomyces* vykazují vůči kyselině monoiodoctové různý stupeň rezistence a jejich průkaz s použitím této půdy tedy není spolehlivý.

Na lysinovém agaru rostly 4 kmeny (11,1 %) divokých kvasinek rodu *Saccharomyces* a 44 kmenů (86 %) skupiny non-*Saccharomyces* ve formě kolonií srovnatelných velikostí s nárůstem na WLN agaru. Na této půdě narostly kvasinky rodů *Candida* (včetně „*Candida vini*“, nyní správně *Kregervanrija fluxuum*), *Debaryomyces*, *Dekkera*, *Hanseniaspora* (s výjimkou jednoho kmene), některé kvasinky rodu *Kluyveromyces* a *Lachancea* (dříve řazené do rodu *Kluyveromyces*), dále všechny kmeny rodu *Pichia*, a to jak původně klasifikovaná „*Pichia anomala*“ (nyní *Wickerhamomyces anomalus*), tak i stávající *Pichia membranifaciens* a *Pichia fermentans*. Různý nárůst na lysinovém agaru byl pozorován mezi jednotlivými kmeny kvasinek *Torulaspora*, *Schizosaccharomyces* a *Zygosaccharomyces*. Pomocí lysinové půdy lze tedy detekovat poměrně široké spektrum divokých kvasinek skupiny non-*Saccharomyces*. Její použití se tak nabízí zejména při mikrobiologické kontrole vína, viz Fugelsang a Edwards, 2007.

Půda obsahující krystalovou violet umožnila zachyt 33 kmenů (91,7 %) divokých kmenů rodu *Saccharomyces*. Nižší zachyt byl zjištěn ve skupině non-*Saccharomyces* (17 kmenů, tj. 33,3 %). Z tohoto souboru kmenů byl nárůst pozorován u některých kmenů *Candida*, *Hanseniaspora uvarum* („*Kloeckera apiculata*“), *Lachancea*, *Torulaspora*, *Schizosaccharomyces*, *Wickerhamomyces* („*Pichia*“), a *Zygosaccharomyces*. Půda s krystalovou violetí není univerzálně použitelná pro detekci divokých kvasinek – narostlo na ní 7 kmenů *S. pastorianus* (tedy 46,7 %) a většina svrchních pivovarských kmenů (tab. 1, obr. 1) a kulturních vinařských kvasinek (tab. 2, obr. 4). Úprava koncentrace krystalové violeti pro zachyt divokých kvasinek nemají význam vzhledem k nízkému zachytu již při zvolené koncentraci.

Na půdě se síranem měďnatým byl pozorován nárůst u 17 kmenů (47,2 %) divokých kvasinek rodu *Saccharomyces*. Ze skupiny divo-

colonies of a culture strain of *S. pastorianus* used in the given process is confirmed and recorded.

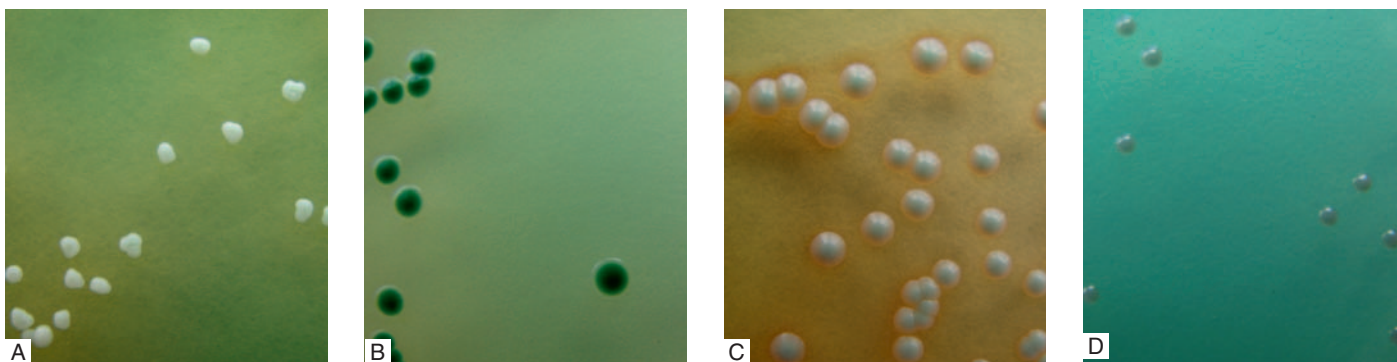
Wild yeasts of genus *Saccharomyces* did not grow on wort agar with monoiodoacetic acid. Monoiodoacetic acid acts as an inhibitor of glycolysis in *Saccharomyces* yeasts and in certain groups of non-*Saccharomyces* yeast (Šilhánková, 1962). It also inhibits the growth of most bacteria (Šavel, 1980). In contrast, more than half of the strains (56.9%) of wild yeasts of other genera were capable of growth on this medium (see Table 4 and Fig. 6). Of the 16 tested genera, only three (*Dekkera*, *Kluyveromyces* and *Lachancea*) were sensitive to the effects of monoiodoacetic acid and did not grow on the medium. Individual strains of the genera *Hanseniaspora*, *Schizosaccharomyces*, *Zygosaccharomyces* and *Torulaspora* showed varying degrees of resistance to monoiodoacetic acid and their proof on this medium is thus not reliable.

Four strains (11.1%) of wild *Saccharomyces* yeasts and 44 strains (86%) of non-*Saccharomyces* yeasts grew on lysine agar as colonies of size comparable with those on WLN agar. On this medium grew *Candida* yeasts (including „*Candida vini*“ now correctly *Kregervanrija fluxuum*), *Debaryomyces*, *Dekkera*, *Hanseniaspora* (with the exception of one strain), some yeasts *Kluyveromyces* and *Lachancea* (formerly included in genus *Kluyveromyces*), all strains of the genus *Pichia*, both those originally classified as „*Pichia anomala*“ (now *Wickerhamomyces anomalus*), as well as the existing *Pichia membranifaciens* and *Pichia fermentans*. Various growth on lysine agar was observed in different strains of *Torulaspora*, *Schizosaccharomyces* and *Zygosaccharomyces*. Lysine medium can therefore be used to detect a relatively broad range of wild non-*Saccharomyces* yeasts. Its use is thus convenient in particular in the microbiological control of wine, see Fugelsang and Edwards (2007).

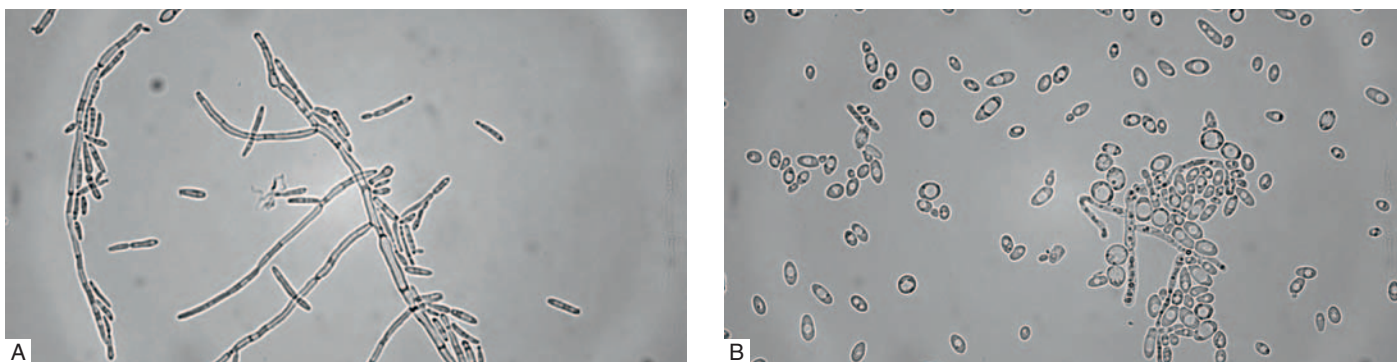
The medium containing crystal violet allowed the capture of 33 strains (91.7 %) of wild *Saccharomyces* strains. Lower detection (17 strains, i.e. 33.3 %) was observed in the non-*Saccharomyces* group. In this set of strains, growth was observed in some strains of *Candida*, *Hanseniaspora uvarum* („*Kloeckera apiculata*“), *Lachancea*, *Torulaspora*, *Schizosaccharomyces*, *Wickerhamomyces* („*Pichia*“) and *Zygosaccharomyces*. The medium with crystal violet is not universally applicable for detection of wild yeasts – 7 strains of *S. pastorianus* (i.e. 46.7%) and most of the top brewing strains (Table 1, Fig. 1) and culture wine yeast (Table 2, Fig. 4) grew on it. Adjustments of the concentration of crystal violet for detection of wild yeasts are of no significance due to the low detection even at the selected concentration.

The growth of 17 strains (47.2 %) of wild *Saccharomyces* yeasts was observed on the medium with copper sulphate. In the group of non-*Saccharomyces* wild yeasts only species *Kluyveromyces lactis* and two *Torulaspora delbrueckii* strains (Table 4) did not grow on CuA medium. Agar with copper sulphate thus captured 48 strains (94%) of non-*Saccharomyces* yeasts while the growth of culture yeast (brewer's and wine) was not suppressed at the given CuSO_4 concentration. As mentioned in the section on the growth of culture brewer's yeast on this medium, the medium is the most appropriate for the detection of wild yeasts in breweries that use only bottom brewer's yeast. In any case, the sensitivity of the brewery strain (or strains, especially top ones) to the concentration of CuSO_4 in the medium for the detection of wild yeasts is to be verified.

The medium with actidione supported the growth of only two strains of wild *Saccharomyces* yeasts, only one growing in the form



Obr. 7 Vzhled kolonií divokých kvasinek na půdě WLN / Fig. 7 Wild yeast colonies on WLN agar; A – *Dekkera bruxellensis* DSM 70001; B – *Hanseniaspora uvarum* RIBM A10; C – *Metschnikowia pulcherrima* DSM 70321; D – *Rhodotorula* sp. RIBM A9



Obr. 8 Morfologie buněk kvasinek / Fig. 8 Yeast cell morphology; A – *Dekkera bruxellensis* DSM 70001; B – *Schizosaccharomyces octosporus* DSM 70573

kých kvasinek non-*Saccharomyces* nerostly na půdě CuA pouze druh *Kluyveromyces lactis* a dva kmeny druhu *Torulaspora delbrueckii* (tab. 4). Agar se síranem měďnatým tedy zachytil 48 kmenů (94 %) skupiny non-*Saccharomyces*, nicméně růst kulturních kvasinek (pivovarských i vinařských) není při dané koncentraci CuSO_4 potlačen. Jak již bylo uvedeno v části týkající se nárůstu kulturních pivovarských kvasinek na této půdě, tato půda je nejvhodnějším médiem pro detekci divokých kvasinek v provozech, které používají výhradně spodní pivovarské kvasinky. V každém případě je žádoucí ověřit citlivost provozního kmene (nebo kmenů, zvláště svrchních) ke koncentraci CuSO_4 v půdě pro detekci divokých kvasinek.

Na půdě s aktidionem rostly pouze dva kmeny divokých kvasinek rodu *Saccharomyces*, a z toho jeden pouze ve formě velmi drobných kolonií. Z celkového souboru kvasinek rodu *Saccharomyces* byl zachyt na této půdě pouze 2,7 %. Ze skupiny non-*Saccharomyces* byl pozorován nárůst u 14 kmenů (35,3 %) – např. některé kmeny rodu *Candida*, *Hanseniaspora*, *Kluyveromyces*, *Rhodotorula*, *Torulaspora* aj. Z celkového počtu 87 kmenů cizích kvasinek na půdě s aktidionem rostlo pouze 19 (tj. 21,8 %), a proto není tato půda vhodná pro průkaz kvasinkové kontaminace v pivovarském provozu.

Divoké kvasinky ve vzorku lze do určité míry určit pomocí mikroskopie. Buňky divokých kvasinek mohou mít různý tvar a velikost – od velmi drobných buněk (např. u *Torulaspora delbrueckii*) přes typický citronovitý tvar *Hanseniaspora uvarum* („*Kloeckera apiculata*“), protáhlé buňky *Wickerhamomyces anomalus* („*Pichia anomala*“), viz obrázky v článku Matoulková et al., 2013. Některé divoké kvasinky vytváří pseudomycelia. Morfologie buněk je závislá na kultivačním médiu, podmínkách kultivace a dalších faktorech. Při nedostatku živin lze i u kulturních kvasinek pozorovat atypický protáhlý tvar buněk. Divoké kvasinky, zejména druhu *S. cerevisiae* však mohou mít pravidelný oválný tvar podobný kulturním kvasinkám. Podle Šavela lze přítomnost dobře vyvinutého pseudomycelia považovat za předběžný průkaz přítomnosti divokých kvasinek ve vzorku (Šavel, 1980). Z testovaného souboru divokých kmenů byla tvorba pseudomycelia pozorována pouze u kvasinky *Dekkera bruxellensis* a *Schizosaccharomyces octosporus* (obr. 8 A,B).

4 ZÁVĚR

Cílem této studie bylo navázání na naši předchozí práci týkající se problematiky detekce divokých kvasinek (Matoulková et al., 2013). Pro tyto účely byl rozšířen soubor testovaných kmenů kvasinek, a to jak kulturních pivovarských kvasinek (30 kmenů), a divokých kvasinek rodu *Saccharomyces* (36 kmenů) i non-*Saccharomyces* (51 kmenů). Použi-

í velmi malých kolonií. Ze skupiny kvasinek *Saccharomyces* bylo zachyceno pouze 2,7 %. Ze skupiny non-*Saccharomyces* kvasinek, růst byl pozorován u 14 kmenů (35,3 %), e.g. některé kmeny rodu *Candida*, *Hanseniaspora*, *Kluyveromyces*, *Rhodotorula*, *Torulaspora*, etc. Of the 87 strains of foreign yeast only 19 (i.e. 21,8%) grew on the medium with actidione, and this medium is therefore not suitable for the detection of yeast contamination in breweries.

Wild yeast in the sample can to some extent be determined microscopically. Cells of wild yeasts may have different shapes and sizes – from very small cells (e.g. *Torulaspora delbrueckii*) via the typical lemon shape of *Hanseniaspora uvarum* („*Kloeckera apiculata*“) to the elongated cells of *Wickerhamomyces anomalus* („*Pichia anomala*“), see the figures in Matoulková et al. (2013). Some wild yeasts produce pseudomycelium. The morphology of the cells is dependent on culture medium, culture conditions and other factors. An atypical elongated cell shape can be also observed in culture yeast under the lack of nutrients. Wild yeasts, in particular those of the species *S. cerevisiae*, can also have a regular oval shape similar to the culture yeast. According to Šavel, the presence of well-developed pseudomycelium is considered as a tentative evidence of the presence of wild yeasts in the sample (Šavel, 1980). Among the tested set of wild strains pseudomycelium formation was observed only in the yeast *Dekkera bruxellensis* and *Schizosaccharomyces octosporus* (Fig. 8 A, B).

4 CONCLUSION

The aim of this study was to follow up on our previous work on the detection of wild yeasts (Matoulková et al., 2013). For these purposes we tested an extended set of yeast strains including both culture brewer's yeast (30 strains) and wild yeasts of the genus *Saccharomyces* (36 strains) and non-*Saccharomyces* ones (51 strains). We used culture media that are readily available, i.e. commercially sold media (WLN agar, lysine agar) and media that can be easily prepared (medium with CuSO_4 , with crystal violet, moniodoacetic acid or actidione). The list of media that can be used with varying success for the detection of wild yeasts is shown in our previous work.

Medium WLN is suitable for the detection of fungal contamination in pitching yeast, yeast economy or in the primary fermentation in breweries using bottom-fermenting strains – more than 80 % of the wild yeast on the medium form colonies distinguish-

li jsme kultivační půdy, které jsou snadno dostupné – půdy dodávané komerčně (WLN agar, lysinový agar) a půdy, které lze snadno připravit (půda s CuSO_4 , s krystalovou violetí, s kyselinou monojodotovou, s akridionem). Výčet všech kultivačních médií, které lze s různým úspěchem použít pro detekci divokých kvasinek, je uveden v naší předchozí práci.

Půda WLN je vhodná pro detekci kvasinkové kontaminace v násadních kvasnicích, kvasničním hospodářství či v úseku hlavní kvašení a dokvašování v provozech používajících spodní kmen – více jak 80 % divokých kvasinek na této půdě tvoří kolonie barevně či tvarově odlišitelné od spodních pivovarských kvasinek. Je ale nutné ověřit a zaznamenat vzhled kolonií kulturního kmene používaného v daném provozu. Při použití mladinového agaru s kyselinou monojodotovou (KJO agar) byly detekovány pouze kvasinky skupiny *non-Saccharomyces*, a to přibližně 57 % z testovaných kmenů. Lysinový agar umožnil detekci 86 % kmenů divokých kvasinek *non-Saccharomyces*. Mladinový agar s krystalovou violetí není dostatečně selektivní půda pro detekci divokých kvasinek – více jak polovina kmenů spodních i svrchních pivovarských kvasinek není citlivá k dané koncentraci krystalové violeti. Nejvhodnější půdou pro průkaz kontaminace divokými kvasinkami je mladinový agar se síranem měďnatým. Na této půdě roste 94 % kvasinek ze skupiny *non-Saccharomyces* a téměř polovina kmenů rodu *Saccharomyces*. Spodní pivovarské kvasinky vykazují k této půdě značnou citlivost, při běžné mikrobiologické kontrole lze předpokládat, že kvasinky narostlé na této půdě jsou divoké. U svrchních kmenů byla přibližně polovina na této půdě schopna růstu. Doporučujeme tedy ověření citlivosti provozních kmenů (zejména svrchních) ke koncentraci CuSO_4 v půdě pro detekci divokých kvasinek.

PODĚKOVÁNÍ

Výsledky byly získány s využitím institucionální podpory Ministerstva zemědělství České republiky na dlouhodobý koncepční rozvoj VÚPS.

able in color or shape from the bottom brewer's yeast. However, it is necessary to verify and record the appearance of colonies of culture strains used in the brewery. When using wort agar with monoiodoacetic acid (KJO agar) only *non-Saccharomyces* wild yeasts (approximately 57 % of the tested strains) were detected. Lysine agar enabled the detection of 86 % of the strains of wild *non-Saccharomyces* yeast. Wort agar with crystal violet is not a sufficiently selective medium for the detection of wild yeasts – more than half of the bottom and top strains of brewer's yeast were not sensitive to the given concentration of crystal violet. The best medium for the detection of contamination by wild yeasts was wort agar with copper sulphate. This medium supported the growth of 94 % of the *non-Saccharomyces* yeast group and almost half of *Saccharomyces* strains. Bottom brewer's yeast showed considerable sensitivity to this medium. When performing a normal microbiological control it can be assumed that the yeasts growing on this medium are wild. About half of the top strains were able to grow on this medium; we therefore recommend that the susceptibility of brewery strains (especially top ones) to the concentration of CuSO_4 in the medium for detection of wild yeasts should be tested.

ACKNOWLEDGEMENTS

The results were obtained under the institutional support of the CR Ministry of Agriculture aimed at a long-term strategic development of the RIBM.

LITERATURE / REFERENCES

- 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(2):157.
- Campbell, I., 2003: Microbiological methods in brewing analysis. In: Brewing microbiology, 3rd edition. Ed.: Priest, F.G., Campbell, I., New York, Kluwer Academic / Plenum Publishers.
- Fugelsang, K.C., Edwards C.G., 2007: Wine Microbiology: Practical Applications and Procedures, (2nd edition), New York, Springer Science and Business Media.
- Hall, J.F., 1970: The use of Difco WLN agar for (a) The detection of wild yeast in the presence of *Sacch. cerevisiae* (b) Demonstration of the instability of strains of *Sacch. carlsbergensis*. J. Inst. Brew. 76: 522–523.
- Hall, J.F., 1971: Detection of wild yeasts in the brewery. J. Inst. Brew. 77: 513–516.
- Haikara, A., Enari, T.M., 1975: The detection of wild yeast contaminants by the immunofluorescence technique. Proc. Eur. Brew. Conv., pp. 363–375.
- Harris, J.O., Watson, W., 1968: The use of controlled levels of actidione for brewing and non-brewing yeast strain differentiation. J. Inst. Brew. 74: 286–290.
- Ingledeu, W.M., Casey, G.P., 1982: The use and understanding of media used in brewing microbiology. I. Media for wild yeast. Brew. Dig. 57: 18–22.
- Jespersen, L., Jakobsen, M., 1996: Specific spoilage organisms in breweries and laboratory media for their detection. Int. J. Food Microbiol. 33: 139–155.
- Kopecká, J., Matoulková, D., Němec, M., Jelínková, M., Felsberg, J., 2012: Problematika identifikace průmyslových kmenů kvasinek. 36. Pivovarsko-sladařský seminář, Plzeň.
- Kopecká, J., Matoulková, D., Felsberg, J., Jelínková, M., Němec, M., 2013: PCR a restrikční analýza pivovarských a vinařských kvasinek. 25. Pivovarsko-sladařské dny, Praha.
- Kurtzman C.P., Fell J.W., Boekhout T., 2011: The Yeast, a taxonomic study, Elsevier, Burlington, USA.
- Libkind, D., Hittinger, C.T., Valério, E., Goncalves, C., Dover, J., Johnston, M., Goncalves, P., Sampaio, J.P., 2011: Microbe domestication and the identification of the wild genetic stock of lager-brewing yeast. PNAS. 108: 14539–14544.
- Matoulková, D., Kopecká, J., Kubizniaková, P., 2013: Brewing microbiology – Wild yeasts and methods of their detection. Kvasny Prum. 59(9): 246–257.
- Pengelly, R.J., Wheals, A.E., 2013: Rapid identification of *Saccharomyces eubayanus* and its hybrids. FEMS Yeast Res. 13: 156–161.
- Šavel, J., 1980: Mikrobiologická kontrola v pivovarech. 1. vyd. Praha: SNTL, 184 s.
- Šilhánková, L., 1962: A new method of quantitative determination of contamination of baker's yeast by wild yeasts or by dissociation forms of the production culture. Folia Microbiol. 7: 255–256.
- Walters, L.S., Thiselton, M.R., 1953: Utilization of lysine by yeasts. J. Inst. Brew. 59: 401–404.