

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Timea HERŽENJAK STANKO

IZOLACIJA IN IDENTIFIKACIJA BAKTERIJ RODU
Alicyclobacillus

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2011

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Timea HERŽENJAK STANKO (HERŽENJAK)

IZOLACIJA IN IDENTIFIKACIJA BAKTERIJ RODU *Alicyclobacillus*

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF *Alicyclobacillus* spp.

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2011

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija živilske tehnologije. Raziskovalno delo je bilo opravljeno v laboratoriju za živilsko mikrobiologijo Katedre za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil na Oddelku za živilstvo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Za mentorico diplomskega dela je imenovana doc. dr. Barbara Jeršek in za recenzentko prof. dr. Nataša Poklar Ulrih.

Mentorica: doc. dr. Barbara Jeršek

Recenzentka: prof. dr. Nataša Poklar Ulrih

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Datum zagovora:

Naloga ja rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Timea Herzenjak Stanko

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn
 DK UDK 579.24.083+579.67:579.852.1(043)=163.6
 KG mikrobiološke metode/določanje bakterij/kvarljivci živil/*Alicyclobacillus*/ izolacija bakterij/identifikacija bakterij/standardna metoda IFU/ naravna kontaminacija/kontaminacija sladkorja/kontaminacija vode z okusom
 AV HERŽENJAK STANKO, Timea
 SA JERŠEK, Barbara (mentorica)/POKLAR ULRIH, Nataša (recenzentka)
 KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
 ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
 LI 2011
 IN IZOLACIJA IN IDENTIFIKACIJA BAKTERIJ RODU *Alicyclobacillus*
 TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
 OP X, 52 str., 25 pregl., 10 sl., 3 pril., 60 vir.
 IJ sl
 JI sl/en
 AI Bakterije rodu *Alicyclobacillus* so termo-acidofilne, grampozitivne, aerobne in sporogene bakterije in so vse pogostejše kvarljivci sadnih in zelenjavnih sokov, saj njihove spore preživijo temperature pasterizacije in so sposobne rasti pri zelo nizki vrednosti pH (2,5-6). Namen naloge je bila izolacija in identifikacija bakterij rodu *Alicyclobacillus* iz naravno kontaminiranih vzorcev sladkorja in vzorcev izvirske vode z okusom. Za izolacijo bakterij rodu *Alicyclobacillus* smo uporabili standardno metodo (IFU, 2004). Da bi določili optimalen postopek smo standardno metodo IFU izvedli v desetih različicah. Za vsak vzorec živila smo vzporedno uporabili vsaj dva različna postopka izolacije bakterij rodu *Alicyclobacillus*. Vedno smo uporabili standardno metodo izolacije bakterij na selektivnem gojišču. Spreminjali pa smo začetno količino preiskovanega vzorca živila ter preizkusili postopek selektivne obogatitve, postopek toplotne aktivacije spor in membransko filtracijo vzorca ali obogatitvenega gojišča. Dobljene izolate smo identificirali z določitvijo makromorfoloških in mikromorfoloških značilnosti, z metodo rasti na gojiščih s različnimi vrednostmi pH (4,0 in 7,0) in s testi API 50 CH. Rezultati so pokazali, da so bili najbolj učinkoviti postopki izolacije tisti, ki so vključevali membransko filtracijo in selektivno obogatitev vzorca živila. Iz 20 vzorcev sladkorja smo po najbolj učinkovitem postopku (obogatitev, filtracija, izolacija, identifikacija) izolirali 16 izolatov in jih 14 tudi identificirali kot različne vrste rodu *Alicyclobacillus*. Iz 5 vzorcev izvirske vode z okusom smo po 5 izolatov izolirali s postopkoma 5A (membranska filtracija, obogatitev, izolacija, identifikacija) in 5B (toplotna aktivacija, membranska filtracija, obogatitev, izolacija, identifikacija) in vse izolate tudi identificirali. Standardna metoda IFU (2004) je z vključitvijo membranske filtracije in obogatitve vzorca živila primerna za izolacijo in identifikacijo bakterij rodu *Alicyclobacillus*. Naši rezultati so pokazali visoko stopnjo kontaminacije sladkorja (60 %) in izvirske vode z okusom (100 %).

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
 DC UDC 579.24.083+579.67:579.852.1 (043)=163.6
 CX microbiological methods/bacteria detection/food spoiling bacteria/
Alicyclobacillus/isolation of bacteria/identification of bacteria/
 standard method IFU/natural contamination/contamination of water with taste/
 contamination of sugar
 AU HERŽENJAK STANKO, Timea
 AA JERŠEK, Barbara (supervisor)/POKLAR ULRIH, Nataša (reviewer)
 PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
 PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and
 Technology
 PY 2011
 TI ISOLATION AND IDENTIFICATION OF *Alicyclobacillus* spp.
 DT Graduation Thesis (University studies)
 NO X, 52 p., 25 tab., 10 fig., 3 ann., 60 ref.
 LA sl
 AL sl/en
 AB Bacteria of the genus *Alicyclobacillus* are thermo-acidophilic, gram-positive, aerobic and spore-forming bacteria. They often spoil fruit and vegetable juices, because their endospores can survive the processes of pasteurization and they can grow at very low pH (2.5-6). The purpose of this research was the isolation and identification of *Alicyclobacillus* species from naturally contaminated samples of sugar and samples of spring water with taste. To determine the optimal procedure, we performed standard method (IFU, 2004) with ten varieties. Each food sample was analysed in parallel with at least two different procedures. We always used the standard method of isolation with selective medium. We modified the initial amount of examined food sample, the selective enrichment procedure, the test of the heat activation of spores and membrane filtration of the sample or enrichment medium. Obtained isolates were identified by setting macro-morphological and micro-morphological characteristics, with the method of growth in media with different pH values (4.0 and 7.0) and with API 50 CH strips. The results showed that the most effective isolation procedures were those, which included membrane filtration and selective enrichment of food samples. For sugar the most effective procedure included enrichment, filtration, isolation and identification. Using that procedure 16 strains of *Alicyclobacillus* were isolated and also identified 14 strains were identified as different species of *Alicyclobacillus*. Five isolates of *Alicyclobacillus* were isolated from 5 samples of spring water with procedure 5A (membrane filtration, enrichment, isolation, identification) and also 5 strains with procedure 5B (thermal activation, membrane filtration, enrichment, isolation, identification). All of strains were identified. IFU standard method is with the inclusion of membrane filtration and enrichment of the food samples appropriate method for isolation and identification of *Alicyclobacillus* strains. Our results showed high contamination level of of sugar samples (60%) and samples of spring water with taste (100%).

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	II
KEY WORDS DOCUMENTATION	III
KAZALO VSEBINE	IV
KAZALO SLIK.....	VI
KAZALO PREGLEDNIC.....	VII
KAZALO PRILOG.....	IX
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	X

1 UVOD	1
1.1 CILJ NALOGE	2
1.2 DELOVNE HIPOTEZE.....	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 BAKTERIJE RODU <i>Alicyclobacillus</i>	3
2.1.1 Zgodovina odkritij bakterij rodu <i>Alicyclobacillus</i>	3
2.2 MORFOLOŠKE LASTNOSTI BAKTERIJ RODU <i>Alicyclobacillus</i>	5
2.2.1 Makromorfološke lastnosti.....	5
2.2.2 Mikromorfološke lastnosti.....	7
2.2.2.1 Barvanje po Gramu	7
2.2.2.2 Barvanje po Schaeffer – Fultonu	8
2.3 EKOLOŠKE LASTNOSTI BAKTERIJ RODU <i>Alicyclobacillus</i>	9
2.4 FIZIOLOŠKE LASTNOSTI BAKTERIJ RODU <i>Alicyclobacillus</i>	10
2.5 BAKTERIJE RODU <i>Alicyclobacillus</i> V ŽIVILIH	12
2.6 STANDARDNA METODA DOLOČANJA BAKTERIJ RODU <i>Alicyclobacillus</i>	13
2.6.1 Membranska filtracija	13
2.6.2 Test API 50 CH.....	14
3 MATERIAL IN METODE DELA.....	16
3.1 MATERIAL	16
3.1.1 Gojišča	16
3.1.1.1 Trdno gojišče BAT	16
3.1.1.2 Fiziološka raztopina	16
3.1.1.3 Trdno gojišče <i>Bacillus acidocaldarius</i> (BAM).....	16
3.1.1.4 Tekoče gojišče <i>Bacillus acidocaldarius</i> (BAM).....	17
3.1.1.5 Trdno gojišče <i>Alicyclobacillus</i> (AM).....	17
3.1.2 Tipski sevi bakterij.....	18
3.1.3 Vzorci živil	18
3.1.4 Aparati.....	19
3.1.5 Material za identifikacijo.....	19

3.2	METODE	20
3.2.1	POTEK EKSPERIMENTALNEGA DELA	20
3.2.2	Izolacija bakterij rodu <i>Alicyclobacillus</i> po standardni metodi IFU	21
3.2.2.1	Postopki izolacije bakterij rodu <i>Alicyclobacillus</i> iz vzorcev sladkorja .	21
3.2.2.1.1	Standardna metoda IFU brez obogatitve	21
3.2.2.1.2	Standardna metoda IFU z obogatitvijo	22
3.2.2.2	Postopki izolacije bakterij rodu <i>Alicyclobacillus</i> iz vzorcev izvirske vode z okusom.....	23
3.2.2.2.1	Standardna metoda IFU brez obogatitve	23
3.2.2.2.2	Standardna metoda IFU z obogatitvijo	24
3.2.3	Identifikacija bakterij rodu <i>Alicyclobacillus</i>.....	25
3.2.3.1	Morfološke lastnosti.....	25
3.2.3.2	Metoda različnih temperatur	26
3.2.3.3	Biokemijski testi	26
4	REZULTATI	28
4.1	IZOLACIJA BAKTERIJ RODU <i>Alicyclobacillus</i>	29
4.1.1	Makromorfološke značilnosti izolatov	29
4.1.2	Število izolatov dobljenih po različnih postopkih izolacije.....	32
4.2	IDENTIFIKACIJA IZOLATOV.....	34
4.2.1	Mikromorfološke lastnosti izolatov	34
4.2.2	Rast izolatov pri različnih temperaturah.....	38
4.2.3	Biokemijski testi	39
4.3	IDENTIFICIRANI SEVI BAKTERIJ RODU <i>Alicyclobacillus</i> DOBLJENI PO RAZLIČNIH POSTOPKIH IZOLACIJE	41
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	43
5.1	RAZPRAVA	43
5.2	SKLEPI	46
6	POVZETEK.....	47
7	VIRI.....	48
	ZAHVALA	
	PRILOGE	

KAZALO SLIK

Slika 1: Makromorfološke lastnosti kolonij (Prescott in sod., 2002).....	5
Slika 2: Postopek barvanja po Gramu (Prescott in Harley, 2002)	8
Slika 3: Postopek barvanja po Schaeffer – Fultonu (Prescott in Harley, 2002).....	9
Slika 4: Postopek kvantifikacije mikroorganizmov z uporabo membranske filtracije (Prescott in sod., 2002).....	14
Slika 5: Shema eksperimentalnega dela za vzorce sladkorja (A) in za vzorce izvirske vode z okusom (B)	20
Slika 6: Postopki izolacije bakterij rodu <i>Alicyclobacillus</i> iz vzorcev sladkorja po standardni metodi IFU (2004) brez obogatitve	22
Slika 7: Postopka izolacije bakterij rodu <i>Alicyclobacillus</i> iz vzorcev sladkorja po standardni metodi IFU (2004) z obogatitvijo	23
Slika 8: Postopka izolacije bakterij rodu <i>Alicyclobacillus</i> iz vzorcev izvirske vode z okusom po standardni metodi IFU (2004) brez obogatitve.....	24
Slika 9: Postopka izolacije bakterij rodu <i>Alicyclobacillus</i> iz vzorcev izvirske vode z okusom po standardni metodi IFU (2004) z obogatitvijo	25
Slika 10: Primer testa API 50 CH z izolatom 5f (ŽMJ 196).	39

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Makromorfološke lastnosti kolonij bakterij rodu <i>Alicyclobacillus</i>	6
Preglednica 2: Temperatura in pH za rast bakterij rodu <i>Alicyclobacillus</i>	10
Preglednica 3: Biokemijske lastnosti bakterij rodu <i>Alicyclobacillus</i> (Imperio in sod., 2008; Goto in sod., 2003; Matsubara in sod., 2002)	11
Preglednica 4: Sestavine dela A gojišča BAM	16
Preglednica 5: Sestavine dela B gojišča BAM	17
Preglednica 6: Sestavine dela A gojišča AM	17
Preglednica 7: Sestavine dela B (Mineralna raztopna SL – 6) gojišča AM	18
Preglednica 8: Sestavine dela C gojišča AM	18
Preglednica 9: Tipski sevi bakterij rodu <i>Alicyclobacillus</i>	18
Preglednica 10: Aparature, ki smo jih uporabili pri eksperimentalnem delu	19
Preglednica 11: Sestava biokemijskih testov API 50 CH	27
Preglednica 12: Makromorfološke značilnosti izolatov izoliranih iz vzorcev sladkorja s standardno metodo IFU (2004) z obogatitvijo (postopek 3B)	29
Preglednica 13: Makromorfološke značilnosti izolatov izoliranih iz vzorcev sladkorja po standardni metodi IFU (2004) brez obogatitve (postopek 1B)	30
Preglednica 14: Makromorfološke značilnosti izolatov izoliranih iz vzorcev izvirske vode z okusom po standardni metodi IFU (2004) z obogatitvijo brez predhodnega segrevanja (po postopku 5A)	31
Preglednica 15: Makromorfološke značilnosti izolatov izoliranih iz vzorcev izvirske vode z okusom s standardno metodo IFU (2004) z obogatitvijo s predhodnim segrevanjem (po postopku 5B)	31
Preglednica 16: Število izolatov bakterij rodu <i>Alicyclobacillus</i> dobljenih po različnih postopkih izolacije iz vzorcev sladkorja	32
Preglednica 17: Število izolatov bakterij rodu <i>Alicyclobacillus</i> dobljenih po različnih postopkih izolacije iz vzorcev izvirske vode z okusom	34
Preglednica 18: Mikromorfološke lastnosti izolatov izoliranih iz vzorcev sladkorja s standardno metodo IFU (2004) z obogatitvijo (po postopku 3B)	34
Preglednica 19: Mikromorfološke lastnosti izolatov izoliranih iz vzorcev sladkorja s standardno metodo IFU (2004) brez obogatitve (po postopku 1B).	35

Preglednica 20: Mikromorfološke lastnosti izolatov izoliranih iz vzorcev izvirske vode z okusom s standardno metodo IFU (2004) z obogatitvijo brez predhodnega segrevanja (po postopku 5A).....	36
Preglednica 21: Mikromorfološke lastnosti izolatov izoliranih iz vzorcev izvirske vode z okusom s standardno metodo IFU (2004) z obogatitvijo s predhodnim segrevanjem (po postopku 5B).....	37
Preglednica 22: Identifikacija bakterij rodu <i>Alicyclobacillus</i> z določitvijo rasti na gojišču BAT pri različnih temperaturah	38
Preglednica 23: Identifikacija izolatov bakterij rodu <i>Alicyclobacillus</i>	40
Preglednica 24: Število izolatov in identificirani sevi bakterij rodu <i>Alicyclobacillus</i> iz 20 vzorcev sladkorja dobljenih po različnih postopkih izolacije	41
Preglednica 25: Število izolatov in identificirani sevi bakterij rodu <i>Alicyclobacillus</i> iz 5 vzorcev izvirske vode z okusom dobljenih po različnih postopkih izolacije	42

KAZALO PRILOG

Priloga A 1: Izolat 1a (ŽMJ 199) barvan po Gramu

Priloga A 2: Izolat 2a (ŽMJ 201) barvan po Gramu

Priloga B 1: Izolat 5b (ŽMJ 206) barvan po Schaeffer-Fulton

Priloga B 2: Izolat 6b-vzorec sladkorja (ŽMJ 208) barvan po Schaeffer-Fulton

Priloga C 1: Primer testa API 50 CH z izolatom 2f (ŽMJ 195)

Priloga C 2: Primer testa API 50 CH z izolatom 2e (ŽMJ 201)

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

<i>A. acidiphillus</i>	<i>Alicyclobacillus acidiphillus</i>
<i>A. acidocaldarius</i>	<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i>
<i>A. acidoterrestris</i>	<i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i>
<i>A. contaminans</i>	<i>Alicyclobacillus contaminans</i>
<i>A. cycloheptanicus</i>	<i>Alicyclobacillus cycloheptanicus</i>
<i>A. disulfidooxidans</i>	<i>Alicyclobacillus disulfidooxidans</i>
<i>A. fastidiosus</i>	<i>Alicyclobacillus fastidiosus</i>
<i>A. herbarius</i>	<i>Alicyclobacillus herbarius</i>
<i>A. hesperidum</i>	<i>Alicyclobacillus hesperidum</i>
<i>A. kakegawensis</i>	<i>Alicyclobacillus kakegawensis</i>
<i>A. microsporangioides</i>	<i>Alicyclobacillus microsporangioides</i>
<i>A. pohliae</i>	<i>Alicyclobacillus pohliae</i>
<i>A. pomorum</i>	<i>Alicyclobacillus pomorum</i>
<i>A. sacchari</i>	<i>Alicyclobacillus sacchari</i>
<i>A. sendaiensis</i>	<i>Alicyclobacillus sendaiensis</i>
<i>A. shizukensis</i>	<i>Alicyclobacillus shizukensis</i>
<i>A. tolerans</i>	<i>Alicyclobacillus tolerans</i>
<i>A. vulcanalis</i>	<i>Alicyclobacillus vulcanalis</i>
AM	gojišče <i>Alicyclobacillus</i> tekoči ali trdni medij
BAM	gojišče <i>Bacillus acidocaldarius</i> medij
BAT	gojišče <i>Bacillus acidoterrestris</i> medij
DSMZ	Deutsche Sammlung von Microorganismen und Zellkulturen
PC	angl. Plate count
PCR	verižna reakcija s polimerazo
16S rRNA	ribosomalna ribonukleinska kislina
ŽMJ	mikrobiološka zbirka laboratorija za živilsko mikrobiologijo na Oddelku za živilstvo Biotehniške fakultete

1 UVOD

Nizek pH kislih živil in pijač (na primer sadni sokovi in drugi izdelki iz sadja) predstavlja naravno obrambo proti kvarjenju, kajti le malo mikroorganizmov je metabolično aktivnih v takih okoljih (Jay in sod., 2005). Pri pH 4,0 lahko rastejo kvasovke, plesni in mlečno kisline bakterije, ki se lahko razmnožujejo v kislih okoljih (Eiroa in sod., 1999; Hui in sod., 2006; Pontius in sod., 1998).

Kvarljivost sadnih pijač pripravljenih iz koncentratov je omejena na majhno količino endospor, grampozitivnih bakterij in toplotno odpornih plesni, katere so zmožne preživeti nizke vrednosti pH, visoke koncentracije sladkorja ter procese pasterizacije (Deák, 2008; Jay in sod., 2005; Pontius in sod., 1998; Silva in Gibbs, 2004). Kvarljivost zelo kislih živilskih proizvodov večinoma povzročajo anaerobne bakterije, kot so bakterije vrst *Clostridium butyricum* in *Clostridium pasteurianum*, ki rastejo in proizvajajo plin ter butirične vonje v konzerviranih živilih s pH < 4,5. Aerobne bakterije kot so bakterije vrst *Bacillus coagulans* in *Bacillus megaterium* so znane, da povzročajo značilen kvar »flat-sour«, kar pomeni, da tvorijo kisline in ne tvorijo plina (»bombaže«) v kislih sadnih pijačah (Brown, 2000; Silva in Gibbs, 2004).

Sporogene bakterije v zgodovini niso bile posebej pomembne kot kvarljivci sadnih sokov, saj razmere v teh izdelkih ne omogočajo rasti vegetativnim oblikam, ki bi se lahko razvile s klitjem bakterijskih endospor (Jay in sod., 2005). Sadni sokovi se tradicionalno pasterizirajo in ta postopek naj bi bil eden od stopenj za inaktivacijo mikroorganizmov kvarljivcev in zdravju škodljivih mikroorganizmov (Blocher in Busta, 1983). Leta 1984 so v Nemčiji poročali o novi vrsti kvara v jabolčnih sokovih. Ugotovili so, da so ga povzročile termo-acidofilne bakterije vrste *Alicyclobacillus acidoterrestris* (Cerny in sod., 1984).

Na bakterije rodu *Alicyclobacillus* še posebej na vrsto *A. acidoterrestris*, so se raziskovalci posebej osredotočili pri raziskavah kvara kislih živilskih izdelkov. Odkrili so, da odpornost na toploto omogoča bakterijam rodu *Alicyclobacillus* preživeti pasterizacijo. Poleg tega jim njihova acidofilna narava omogoča, da lahko endospore kalijo in zrastejo do dovolj velike koncentracije celic, da pride do kvara (Walls in Chuyate, 1998).

Za določitev bakterij rodu *Alicyclobacillus* je bilo predlaganih več postopkov, ki vsebujejo mikroskopske metode za karakterizacijo morfoloških lastnosti (Pettipher in Osmundson, 2000), biokemijske analize, molekularne metode kot je PCR ali 16S rRNA gensko sekvenčna analiza (Yamazaki in sod., 1997; Murakami in sod., 1998).

Pri našem eksperimentalnem delu smo uporabili standardno metodo izolacije, katero je objavila delovna skupina mikrobiologov IFU kot prvo standardno metodo za določanje bakterij rodu *Alicyclobacillus* v sadnih sokovih (IFU, 2004). S primerjalnimi izvedbami različnih postopkov standardne metode IFU smo želeli v različnih naravno kontaminiranih vzorcih živil določiti optimalen postopek določitve bakterij rodu *Alicyclobacillus*.

1.1 CILJ NALOGE

Cilj naloge je bil izolirati in identificirati bakterije rodu *Alicyclobacillus* iz različnih naravno kontaminiranih vzorcev sladkorja in izvirske vode z okusom. Pri tem smo želeli določiti optimalen postopek priprave živila za izolacijo teh bakterij ter določiti najbolj učinkovit postopek izolacije bakterij rodu *Alicyclobacillus*.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

Glede na cilj naloge smo postavili naslednje hipoteze:

- Predvidevali smo, da bodo v vzorcih sladkorja in izvirske vode z okusom prisotne bakterije rodu *Alicyclobacillus*.
- Prav tako smo predvidevali, da bodo različne izvedbe standardne metode (IFU, 2004) različno učinkovite za izolacijo in identifikacijo posameznih vrst bakterij rodu *Alicyclobacillus*.
- Pričakovali smo, da bomo s standardno metodo (IFU, 2004) z obogatitvijo določili večje število vzorcev živil v katerih bodo prisotne bakterije rodu *Alicyclobacillus*, kakor s standardno metodo brez obogatitve.
- Poleg tega smo predvidevali, da bodo rezultati identifikacije bakterij doprinesli k boljšemu poznavanju njihove razširjenosti v živilih, saj pri pregledu literature tovrstnih raziskav pri nas nismo zasledili.

2 PREGLED OBJAV

2.1 BAKTERIJE RODU *Alicyclobacillus*

Nedolgo nazaj je veljalo prepričanje, da bakterijske spore ne morejo kaliti v vegetativne celice, le-te pa se ne morejo razmnoževati v tako kislem okolju, kot so na primer sadni sokovi (Splittstoesser in sod., 1994). Zato so dolgo časa za krivce kvarjenja živil z nižjim pH veljale kvasovke, plesni in nekatere nesporogene bakterije. Vieira in sodelavci (2002) so dokazali, da je bila pasterizacija dovolj učinkovita, da je uničila te mikroorganizme, vendar premalo učinkovita da bi uničila spore bakterij *Alicyclobacillus*.

2.1.1 Zgodovina odkritij bakterij rodu *Alicyclobacillus*

Leta 1967 sta raziskovalca Uchino in Doi poročala o prvi izolaciji aerobnih sporogenih bakterij iz termalnega izvira na Japonskem. Izolat sta objavila kot novo vrsto, saj naj bi bila sorodna bakterijam vrste *Bacillus coagulans* (Darland in Brock, 1971). Vendar pa danes taksonomska uvrstitev teh bakterij ni mogoča, ker izolati niso bili shranjeni. Opis njihovih morfoloških, fizioloških in biokemijskih lastnosti je podoben bakterijam, ki jih danes imenujemo bakterije rodu *Alicyclobacillus*, zato do dandanes to velja kot prva izolacija teh bakterij (Wisotzkey in sod., 1992).

Nekaj let kasneje (1971) sta Darland in Brock izolirala iz vzorcev zemlje in vode bakterije s podobnimi lastnostmi kot sta jih predhodno izolirala Uchino in Doi. Glede na taksonomske lastnosti sta izolat uvrstila v vrsto *Bacillus acidocaldarius*. Bakterije so poleg svojih termofilnih in acidofilnih lastnosti v celični membrani vsebovale hapanoide, ki delujejo na podoben način kot steroli in služijo za stabilizacijo celičnih membran ter enkratne aliciklične končne skupine v svojih maščobnih kislinah, katere so jih razlikovale od drugih vrst bakterij rodu *Bacillus*. Te značilne ω -cikloheksilne maščobne kisline so sestavni del njihovih esencialnih maščobnih kislin. Ker so bili izolati izolirani iz termalnih in kislih okolij, je veljalo prepričanje, da bodo vrste rodu *Bacillus*, ki vsebujejo ω -cikloheksilne maščobne kisline, strogo omejene na ta okolja (Darland in Brock, 1971).

Cerny in sodelavci so leta 1984 prvi poročali o izolaciji bakterij z ω -cikloheksilnimi maščobnimi kislinam iz ne-termalnega okolja. Te bakterije so izolirali iz pokvarjenega jabolčnega soka in predvideli, da so povzročile kvarjenje. Hippchen in sodelavci so že leta 1981 izoliral bakterije iz zemlje, ki niso bili iz kislega okolja in termofilni, pa vendarle z zelo podobnimi lastnostmi kot jih je imel eden od Cernyjevih izolatov iz jabolčnega soka (Hippchen in sod., 1981; Cerny in sod., 1984; Chang in Kang, 2004).

Deinhard in sodelavci so leta 1987 dokončno določili razmerje med ω -cikloheksilnimi maščobnimi kislinam, ki jih imajo izolati rodu *Bacillus*. Opravili so fiziološke in biokemične preiskave 13 termofilnih in v kislem okolju živečih vrst rodu *Bacillus*, vključno z izolati iz zemlje (Hippchen in sod., 1981) in izolatom iz pokvarjenega jabolčnega soka. Rezultati so pokazali, da ima ena vrsta rodu *Bacillus* specifične ω – cikloheksilne maščobne kisline in hapanoide ter da je ta specifična za vrsto *Bacillus acidocaldarius*. Vendar so se izolati iz zemlje in pokvarjenega jabolčnega soka razlikovali po izkoriščanju različnih virov ogljika in so izvirali iz drugačnih okolij, zato so predlagali

novo vrsto. Poimenovali so jo *Bacillus acidoterrestris*, saj so bili ti izolati iz kislega okolja in izolirani iz zemlje. Razlika med vrstama *Bacillus acidocaldarius* in *Bacillus acidoterrestris* je v fermentaciji, saj bakterije vrste *Bacillus acidoterrestris* lahko izkoriščajo eritrol, sorbitol in ksilitol, medtem ko jih bakterije vrste *Bacillus acidocaldarius* ne morejo (Deinhard in sod., 1987a).

Prav tako so v drugih raziskavah Deinhard in sodelavci (1987b) pri bakterijah ugotovili posebne ω – aliciklične maščobne kisline, torej ω – cikloheptilne maščobne kisline. Ker so se ti izolati razlikovali od prvih dveh (*Bacillus acidocaldarius*, *Bacillus acidoterrestris*), so jih poimenovali bakterije vrste *Bacillus cycloheptanicus*. Bakterije vrste *Bacillus cycloheptanicus* so imele tudi nekatere drugačne značilnosti od bakterij vrst *Bacillus acidocaldarius* in *Bacillus acidoterrestris* in sicer, da imajo v sestavi maščobnih kislin metionin, izolevcin in pantotensko kislino. Hibridizacija DNA, pa je vendarle pokazala, da je med njimi majhna sorodnost (Deinhard in sod., 1987b).

Leta 1992 so se raziskovalci Wisotzkey in sodelavci osredotočili na ustrezno taksonomsko uvrstitev vrst *Bacillus acidocaldarius*, *Bacillus acidoterrestris* in *Bacillus cycloheptanicus* tako, da so preiskali njihova zaporedja 16S rRNA. Ugotovili so, da je primerjava primarnih sekvenc 16S rRNA, vrst *Bacillus acidocaldarius* in *Bacillus acidoterrestris* skoraj enaka (98,9 %). Medtem ko je bila primarna sekvenc 16S rRNA pri bakterijah vrste *Bacillus cycloheptanicus* manj podobna. Zato so se odločili primerjati še sekundarno strukturo 16S rRNA, kjer so ugotovili, da so si vrste enake ali zelo podobne, vendar pa sekundarna struktura 16S rRNA ni bila enaka strukturam drugih vrst rodu *Bacillus*. Predlagali so preklasifikacijo in preimenovanje teh vrst v nov rod, tako so jih preimenovali v rod *Alicyclobacillus* (Chang in Kang, 2004; Matsubara in sod., 2002).

Nato so v naslednjih letih sledile nove raziskave in leta 2000 so Albuquerque in sodelavci prvi izolirali vrsto *Alicyclobacillus hesperidium* iz vulkanskih tal.

Leta 2002 so Goto in sodelavci iz zeliščnega čaja posušenih cvetlic hibiskusa izolirali vrsto *Alicyclobacillus herbarius*. Istega leta je Matsubara z sodelavci izolirali bakterije vrste *Alicyclobacillus acidiphilus* iz kislih pijač.

Vse vrste rodu *Alicyclobacillus* so bile izolirane iz naravnih virov, prav tako iz termalne vode in tal, kot iz pokvarjenega sadnega soka. Tako so leta 2003 Goto in sodelavci izolirali nenavadno vrsto *Alicyclobacillus*. Med potekom mikrobioloških raziskav so iz mešanega sadnega soka, ki je vseboval svež pomarančni, jabolčni, mangov, ananasov in malinov sok izolirali novo vrsto in jo poimenovali *Alicyclobacillus pomorum*. Ugotovili so še, da vse bakterije rodu *Alicyclobacillus* glede na 16S rRNA sekvečno analizo sodijo v eno filogenetsko skupino in da vsebujejo ω -aliciklične maščobne kisline (ω -cikloheksane ali ω -cikloheptine), kot pomembno sestavino celične membrane (Goto in sod., 2003).

Prav tako so leta 2003 Tsuruoka in sodelavci izolirali novo vrsto rodu *Alicyclobacillus*. Med izolacijo termostabilnih kolagenaz so iz tal izolirali acidofilne bakterije, ki so proizvajale ekstraselularno termostabilno kolagenazo. Te bakterije so bile aerobne, sporogene in so se po fizioloških, kemo-taksonomskih in filogenetskih analizah zelo približale bakterijam rodu *Alicyclobacillus*. Novo vrsto so poimenovali *Alicyclobacillus sendaiensis* (Tsuruoka in sod., 2003).

Leta 2004 so Simbahan in sodelavci izolirali iz geotermalnega izvira Coso Hot Springs v Kaliforniji vrsto *Alicyclobacillus vulcanalis* (Simbahan in sod., 2004).

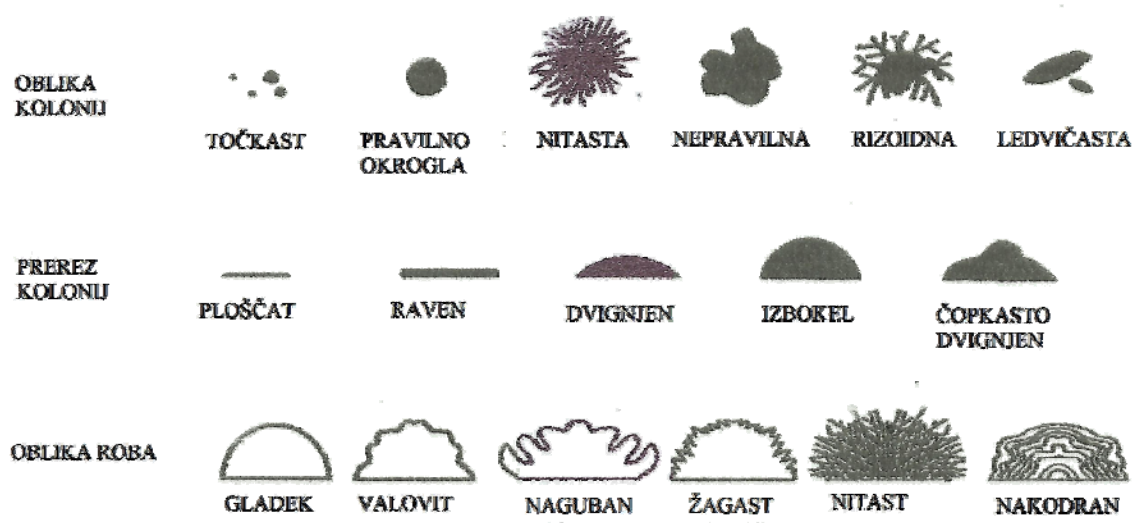
Danes poznamo 18 različnih vrst rodu *Alicyclobacillus* (*A. acidiphilus*, *A. acidocaldarius*, *A. acidoterrestris*, *A. contaminans*, *A. cycloheptanicus*, *A. disulfidooxydans*, *A. fastidiosus*, *A. herbarius*, *A. hesperidum*, *A. kakegawensis*, *A. macrosporangiidus*, *A. pohliae*, *A. pomorum*, *A. sacchari*, *A. sendaiensis*, *A. shizuokensis*, *A. tolerans*, *A. vulcanalis*). Izolirane so bile iz zemlje, pokvarjenih sokov ali drugih ekstremnih okolij (Imperio in sod., 2008).

2.2 MORFOLOŠKE LASTNOSTI BAKTERIJ RODU *Alicyclobacillus*

Morfološke lastnosti mikroorganizma so pomembne pri njegovi identifikaciji in klasifikaciji. Morfološke značilnosti mikroorganizmov proučujemo na dveh nivojih in sicer na makromorfološkem nivoju (strukture, ki jih običajno vidimo s prostim očesom, npr.: kolonije) in na mikromorfološkem nivoju (strukture, ki jih običajno ne vidimo s prostim očesom, npr.: oblika celic, spore).

2.2.1 Makromorfološke lastnosti

Makromorfološke strukture in lastnosti kolonij večinoma vidimo s prostim očesom. Makromorfološke lastnosti opredeljuje velikost, barva, oblika, površina, prerez, čvrstost kolonije (Prescott in sod., 2002). Glede na obliko ločimo točkaste, pravilne okrogle, rizoidne, nepravilne in nitaste kolonije (slika 1). Glede na rob kolonije ločimo kolonije z gladkim ali nakodranim robom. Površina kolonij je lahko gladka ali hrapava. Prerez kolonije je lahko ploščat, dvignjen, izbokel, ali pa čopkasto dvignjen. Glede na čvrstost pa ločimo: krhke, trde, mazave, sluzaste kolonije. Makromorfološke lastnosti lahko uporabimo pri identifikaciji mikroorganizmov.



Slika 1: Makromorfološke lastnosti kolonij (Prescott in sod., 2002)

Morfologija kolonij bakterij rodu *Alicyclobacillus* se lahko razlikuje odvisno od seva, vendar pa so v splošnem kolonije okrogle oblike (preglednica 1). Velikost je odvisna od gojišča, na primer na gojišču YSG (angl. Yeast Starch Glucose Agar) dosežejo premer od 2 do 5 mm (lahko tudi več) pri optimalni temperaturi. Kolonije so bele do bež barve in s starostjo postanejo rahlo temnejše. Rast pod površino gojišča je omejena na približno 0,5-1 mm, zaradi nizke koncentracije kisika (Goto, 2007a).

Preglednica 1: Makromorfološke lastnosti kolonij bakterij rodu *Alicyclobacillus*

VRSTA	LASTNOSTI KOLONIJE			
	BARVA	OBLIKA (rob, izbočenost, odsev)	PREMER (mm)	VIR
<i>A. acidocaldarius</i>	Ne pigmentiran, kremasto rumen	Pravilno okrogel, raven ali dvignjen, gladek, nepravilen rob	1,0 – 2,0	Wisotzkey in sod., 1992
<i>A. acidiphilus</i>	Kremasto bel, neprozoren	Okrogel, gladek	1.1 – 3.8	Matsubara in sod., 2002
<i>A. acidoterrestris</i>	Kremasto bel do rumenkast, prosojen do neprozoren	Okrogel	3,0 – 5,0	Walls in Chuyate, 1998
<i>A. cycloheptanicus</i>	Kremasto bel, neprozoren	Okrogel, majhen, gladek	NR	Wisotzkey in sod., 1992
<i>A. hesperidum</i>	Ne pigmentiran	NR	1.0 – 2,0	Albuquerque in sod., 2000
<i>A. herbarius</i>	Ne pigmentiran	Pravilno okrogel	2,0 – 3,0	Goto in sod., 2002
<i>A. mali</i>	Ne pigmentiran	NR	1,0 – 2,0	Albuquerque in sod., 2000
<i>A. sendaiensis</i>	Bel in polprozoren	Pravilno okrogel, dvignjen	1,0	Tsuruoka in sod., 2003
<i>A. pomorum</i>	Ne pigmentiran	Pravilno okrogel	3,0 – 4,0	Goto in sod., 2003
<i>A. vulcanalis</i>	Polprozoren do bel	Dvignjen	1,0	Simbahan in sod., 2004
<i>A. disulfidooxidans</i>	NR	NR	NR	Karavaiko in sod., 2005
<i>A. tolerans</i>	NR	NR	0,3 – 0,5	Karavaiko in sod., 2005
<i>A. fastidiosus</i>	Ne pigmentiran, kremsto bel, neprozoren	Pravilno okrogel, cel, raven	3,0 – 4,0	Goto in sod., 2007
<i>A. sacchari</i>	Ne pigmentiran, kremasto bel	Pravilno okrogel, cel, čopkasto dvignjen	3,0 – 5,0	
<i>A. macrosporangidus</i>	Ne pigmentiran, kremasto bel, neprozoren	Pravilno okrogel, cel, dvignjen	2,0 – 4,0	
<i>A. contaminans</i>	Ne pigmentiran, kremasto bel, neprozoren	Pravilno okrogel, cel	3,0 – 5,0	
<i>A. kakegawaensis</i>	Ne pigmentiran, kremasto bel, neprozoren	Pravilno okrogel, gladek, ploščat	2,0 – 3,0	
<i>A. shizuokaensis</i>	Nepigmentiran, kremasto bel, neprozoren	Pravilno okrogel, gladek, dvignjen	1,0 – 2,0	

Legenda: NR- ni podatka

2.2.2 Mikromorfološke lastnosti

Mikromorfoloških lastnosti bakterij (posameznih celic) s prostim očesom ne moremo opazovati. Oblika posamezne bakterijske celice je lahko različna: kok, palčka, vibrio, spiril, spiroheta. V tekočem gojišču lahko mikrobne celice po celični delitvi ostanejo povezane v obliki verižic ali poliedrov (monokoki, diplokokki, tetrakoki, sarcine, streptokoki) (Prescott in sod., 2002).

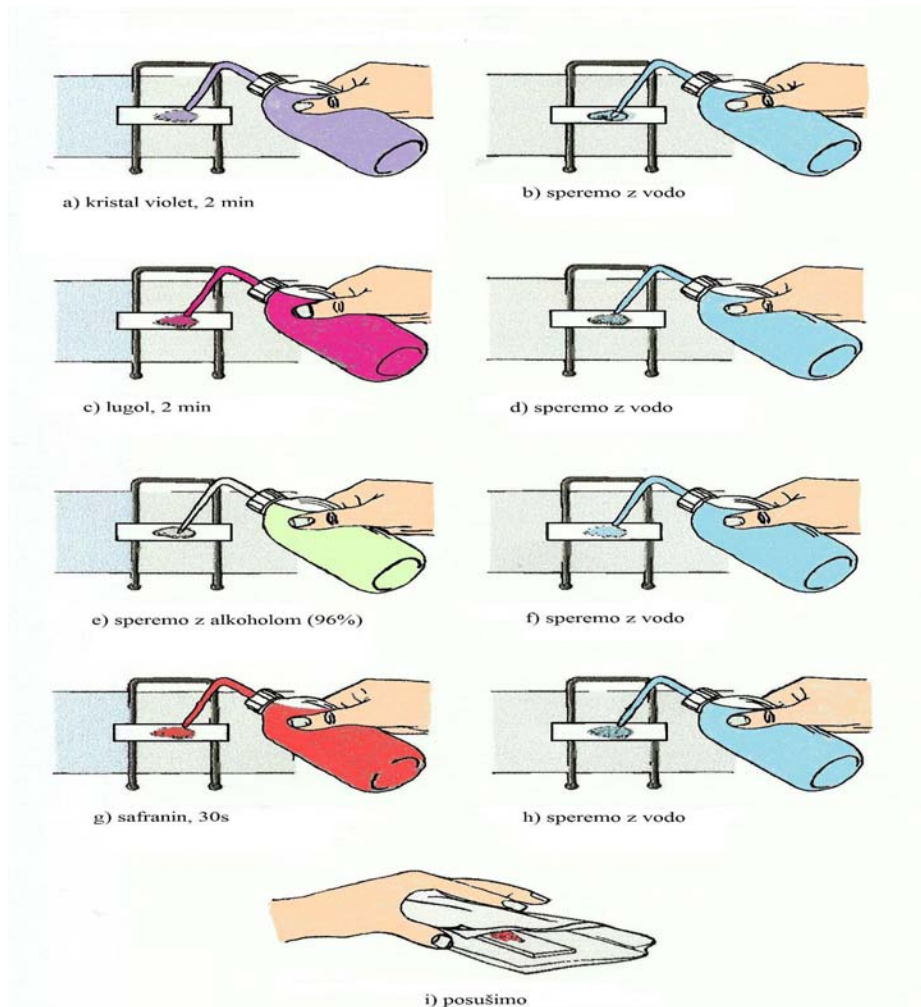
Vegetativne celice bakterij rodu *Alicyclobacillus* so po obliki palčke z terminalno ali subterminalno endosporo. Palčke so široke približno od 0,7 μm do 1 μm in 3 do 5 μm dolge. Formacija celic v verižice je zelo redka in gibljivost je šibka. Celice so grampozitivne v začetni fazi gojenja in postanejo gramnegativne ali gramvariabilne na koncu gojenja. To dejstvo so tudi potrdili z uporabo metode Ryu E, kjer so se celice obarvale grampozitivno pri mlajših kulturah in gramnegativno pri starejših kulturah (Goto, 2007a).

2.2.2.1 Barvanje po Gramu

Barvanje po Gramu je diferencialno barvanje, s katerim razlikujemo dva tipa bakterijskih celic, grampozitivne in gramnegativne bakterije. Metoda, ki jo je zasnoval danski bakteriolog Hans Christian Gram (1884), je ena najpomembnejših tehnik barvanja v mikrobiologiji. Z njo skoraj vedno pričnemo identifikacijo bakterij. Barvanje temelji na razlikah v celičnih stenah bakterij: stene grampozitivnih bakterij imajo večjo vsebnost peptidoglikana in manjšo vsebnost lipidov kot gramnegativne bakterije.

Primarno barvilo je kristal vijolično, ki ga lahko nadomestimo tudi z metilenskim modrilom. Sledi dodatek joda, ki s primarnim barvilom tvori slabo topne kristale. Preparat nato razbarvamo z etanolom ali acetonom, ki raztopita lipidni dvosloj v gramnegativnih celicah in pospešita spiranje barvila iz teh celic. Hkrati povzročita dehidracijo celične stene grampozitivnih celic, posledično zaprtje por in upočasnjeno spiranje. Čas spiranja je zato za uspešno izvedbo barvanja bistvenega pomena. Po razbarvanju dodamo kontrastno barvilo safranin, (bazični fuksin), ki obarva celice, ki so se pred tem razbarvale in na končnem preparatu sicer ne bi bile vidne. Shema barvanja po Gramu je prikazana na sliki 2.

Grampozitivne celice so obarvane temno modro-vijolično. Gramnegativne pa rožnato. Na preparatu opazujemo tudi obliko celic, velikost celic, formacijo celic in morebitne posebnosti (vključki, spore) (Tortura, 2010).

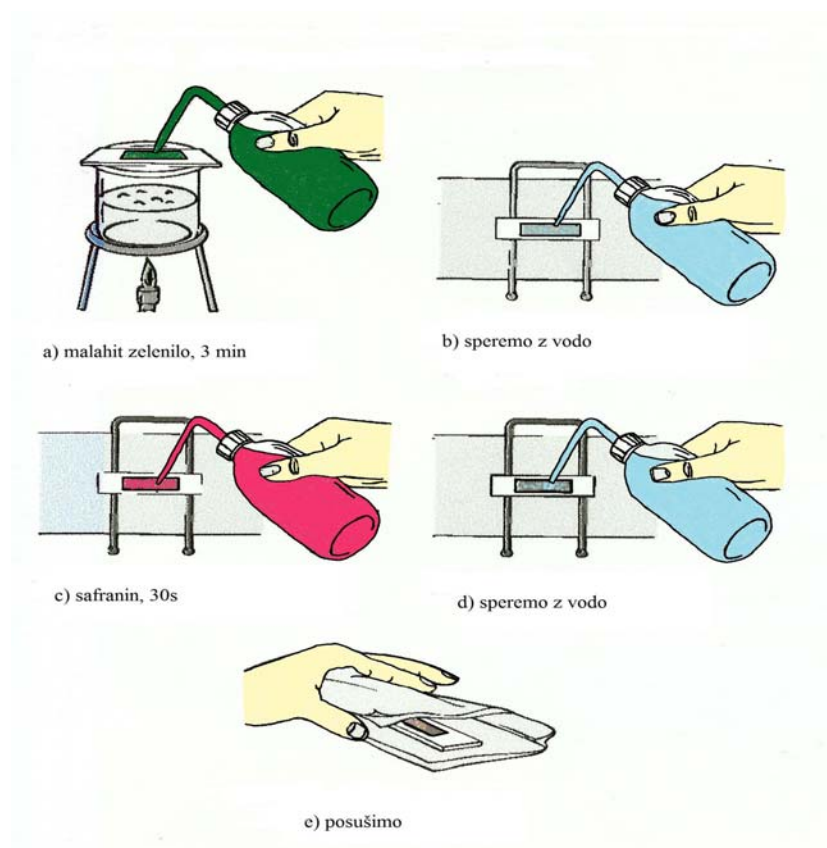


Slika 2: Postopek barvanja po Gramu (Prescott in Harley, 2002)

2.2.2.2 Barvanje po Schaeffer – Fultonu

Bakterije rodov *Alicyclobacillus*, *Bacillus* in *Clostridium* so sposobne preživeti v neugodnih okoljih, zato ker imajo zelo odporne strukture, ki jih imenujemo endospore. Endospore so okrogle do elipsaste oblike in bodisi manjše ali večje od bakterijske celice. Lahko imajo značilen položaj torej so lahko centralne, subterminalne ali terminalne (Prescott in sod., 2002).

Za mikroskopsko ločitev endospor in bakterijskih vegetativnih celic lahko uporabljamo barvanje po Schaeffer-Fulton (slika 3). Primarno barvilo, malahitno zelenilo, na fiksiranem razmazu segrevamo zato, da barvilo lahko prodre skozi relativno nepropustne ovojnice spore. Malahitno zelenilo se veže tudi na vegetativne celice, vendar se ob spiranju z vodo iz celic tudi izpere in celice so po barvanju z malahit zelenilom brezbarvne. Za večji kontrast celice barvamo še s safraninom, ki se veže le na vegetativne celice in so zato rdeče obarvane (Prescott in Harley, 2002).



Slika 3: Postopek barvanja po Schaeffer – Fultonu (Prescott in Harley, 2002)

2.3 EKOLOŠKE LASTNOSTI BAKTERIJ RODU *Alicyclobacillus*

Poreklo bakterij rodu *Alicyclobacillus* je mogoče razdeliti v dve splošni skupini, ena so kisli izviri tople vode, druga pa je zemlja. Od osemnajstih vrst bakterij rodu *Alicyclobacillus*, so bakterije vrste *Alicyclobacillus acidocaldarius* odkrili v kislem termalnem okolju (Chang in Kang, 2004).

Hiraishi in sodelavci (1997) so bili uspešni pri izolaciji bakterij *Alicyclobacillus* iz toplih vrelcev na Japonskem, medtem ko pa so druge vrste izolirane iz tal in ne zahtevajo izredno kislega okolja in visoke temperature za preživetje. Torej glavni vir teh bakterij je zemlja. Ugotovljeno je bilo, da kvar sadnih sokov pogosto povzroča kontaminirano sveže sadje, katerega so slabo oprali pred proizvodnjo in je bil med obiranjem v stiku z zemljo.

Bakterije rodu *Alicyclobacillus* lahko rastejo v temperaturnem območju od 20 °C do 70 °C, z optimalno temperaturo med 40 °C in 60 °C, ter pri pH od 2,0 – 6,0, z optimalnim pH med 3,5 – 4,5 (preglednica 2). Rast teh bakterij je zmanjšana pri temperaturi in vrednosti pH zunaj optimalnega razpona. Čeprav so striktno aerobni, lahko ti organizmi preživijo v mikroaerofilnih razmerah, vendar pa je rast inhibirana pri odsotnosti kisika (Goto, 2007a). V preglednici 2 so za posamezno vrsto bakterij rodu *Alicyclobacillus* zbrani podatki o temperaturi in kislosti okolja, kjer te bakterije rastejo.

Preglednica 2: Temperatura in pH za rast bakterij rodu *Alicyclobacillus*

VRSTA	Temperatura (°C)		pH		Vir
	Območje rasti	Optimalna	Območje rasti	Optimalen	
<i>A. acidocaldarius</i>	35 – 70	60 – 65	2,5 – 6,0	3,5 – 4,5	Goto in sod., 2006
<i>A. acidiphilus</i>	20 – 55	50	2,5 – 5,5	3,0	Matsubara in sod., 2002
<i>A. acidoterrestris</i>	20 – 55	40 – 50	3,0 – 6,0	3,5 – 4,0	Goto in sod., 2007a
<i>A. cycloheptanicus</i>	40 – 53	48	3 – 5,5	3,5 – 4,5	Chang in Kang, 2004
<i>A. hesperidum</i>	35 – 60	50 – 53	2,0 – 6,0	3,5 – 4,0	Albuquerque in sod., 2000
<i>A. herbarius</i>	35 – 65	55 – 60	3 – 6	4,5 – 5	Chang in Kang, 2004
<i>A. mali</i>	35 – 65	50	2,0 – 5,5	4,0 – 5,0	Matsubara in sod., 2002
<i>A. sendaiensis</i>	40 – 65	55	2,5 – 6,5	5,5	Tsuruoka in sod., 2003
<i>A. pomorum</i>	30 – 60	45 – 50	3,0 – 6,0	4,0 – 4,5	Goto in sod., 2003
<i>A. vulcanalis</i>	35 – 65	55	2,0 – 6,0	4,0	Simbahan in sod., 2004
<i>A. disulfidooxidans</i>	4 – 40	35	0,5 – 6,0	1,5 – 2,5	Goto in sod., 2007a
<i>A. tolerans</i>	≤ 20 – 55	37 – 42	1,5 – 5,0	2,5 – 2,7	
<i>A. fastidiosus</i>	20 – 55	40 – 45	2,0 – 5,5	4,0 – 4,5	Goto in sod., 2007
<i>A. sacchari</i>	30 – 55	45 – 50	2,0 – 6,0	4,0 – 4,5	
<i>A. macrosporangidus</i>	35 – 60	50 – 55	3,0 – 6,5	4,0 – 4,5	
<i>A. contaminans</i>	35 – 60	50 – 55	3,0 – 6,5	4,0 – 4,5	
<i>A. kakegawaensis</i>	40 – 60	50 – 55	3,0 – 6,5	4,0 – 4,5	
<i>A. shizuokaensis</i>	35 – 60	45 – 50	3,0 – 6,5	4,0 – 4,5	

2.4 FIZIOLOŠKE LASTNOSTI BAKTERIJ RODU *Alicyclobacillus*

Bakterije rodu *Alicyclobacillus* zelo dobro presnavljajo sladkorje in proizvajajo kisline. Od vrste je odvisna presnova sladkorjev, saj so med vrstami precejšnje razlike. Pri metabolizmu sladkorjev ne tvorijo plinov. Prisotnost soli, organskih kislin, polifenolov in alkoholov, v določenih koncentracijah lahko zavira rast bakterij rodu *Alicyclobacillus*. Vendar, pa so nekateri sevi znani po tem da posedujejo odpornost na te zaviralne snovi. (Goto, 2007a).

V preglednici 3 so prikazane nekatere biokemijske lastnosti posameznih vrst bakterij rodu *Alicyclobacillus*.

Preglednica 3: Biokemijske lastnosti bakterij rodu *Alicyclobacillus* (Imperio in sod., 2008; Goto in sod., 2003; Matsubara in sod., 2002)

SUBSTRATI (iz katerih se proizvajajo kisline)	BAKTERIJE RODU <i>ALICYCLOBACILLUS</i>																		
	<i>A. acidocaldarius</i>	<i>A. acidoterrestris</i>	<i>A. acidiphilus</i>	<i>A. cycloheptanicus</i>	<i>A. herbarius</i>	<i>A. hesperidum</i>	<i>A. mali</i>	<i>A. sendaiensis</i>	<i>A. pomorum</i>	<i>A. vulcanalis</i>	<i>A. contaminans</i>	<i>A. fastidiosus</i>	<i>A. lakegawensis</i>	<i>A. macrosporangidus</i>	<i>A. sacchari</i>	<i>A. shizuokensis</i>	<i>A. pohliae</i>	<i>A. tolerans</i>	<i>A. disulfioxidans</i>
GLY	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	W	+
ERY	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	V	-	-	-	-	-	-
DARA	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	W	+
LARA	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	W	+
RIB	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
DXYL	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
LXYL	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+
ADO	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MDX	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	NR	NR
GAL	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
GLU	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
FRU	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
MNE	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
SBE	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	V	-	+	+	-	-	+	+	+
RHA	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	V	+	+	+	+	-	+	-	-
DUL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
INO	-	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	V	-	-	-	+	-	-
MAN	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-
SOR	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+
MDM	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	NR	NR
MDG	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-	W	+	+
NAG	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AMY	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+
ARB	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	W	-	-
ESC	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+
SAL	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	V	-	+	+	+	+	W	-	-
CEL	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+
MAL	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	W	+
LAC	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	V	-	+	+	+	-	+	W	-
MEL	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+
SAC	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
TRE	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	W	+	-
INU	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	NR	NR
MLZ	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	V	-	+	-	W	+	+
RAF	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	W	W	+
AMD	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
GLYG	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+
XLT	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	NR	NR
GEN	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	V	-	+	+	+	+	+	NR	NR
TUR	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	W	-
LYX	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	NR	NR
TAG	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	V	+	V	-	-	-	+	W	+
DFRUC	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+
LFRUC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	NR	NR
DARL	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	NR	NR
LARL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GNT	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2KG	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5KG	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+

Legenda: GLY=Glicerol, ERY=Eritritol, DARA=D-Arabinosa, LARA=L-Arabinosa, RIB=D-Riboza, DXYL=D-Ksiloza, LXYL=L-Ksiloza, ADO=D-Adonitol, MDX=Metil-βD-kilopiranozid, GAL=D-Galaktoza, GLU=D-Glukoza, FRU=D-Fruktoza, MNE=D-Manoza, SBE=L-Sorboza, RHA=L-Ramnoza, DUL=Dulcitol, INO=Inositol, MAN= D-Manitol, SOR=D-Sorbitol, MDM=Metil-αD-manopiranozid, MDG=Metil-αD-glukopiranozid, NAG=N-Acetilglukozamin, AMY=Amigdal, ARB=Arbutin, ESC=Eskulin železov citrat, SAL=Salicin, CEL=D-Celobioza, MAL=D-Maltoza, LAC=D-Laktoza, MEL=D-Melibioza, SAC=D-Saharoza, TRE=D-Trehaloza, INU=Inulin, MLZ=D-Melecitoza, RAF=D-Rafinoza, AMD=Amidon, GLYG=Glikogen, XLT=Ksilitol, GEN=Gentiobioza, TUR=D-Turanoza, LYX=D-Liksoza, TAG=D-Tagatoza, DFRUC=D-Fukoza, LFRUC=L-Fukoza, DARL=D-Arabitol, LARL=L-Arabitol, GNT=Kalijev glukonat, 2KG=Kalijev-2-keto-glukonat, 5KG=Kalijev-5-keto-glukonat, + pozitivno, - negativno, V različni rezultati, NR ni bilo reakcije, W slabo pozitiven

2.5 BAKTERIJE RODU *Alicyclobacillus* V ŽIVILIH

Zastopanost bakterij rodu *Alicyclobacillus* je v kisljih izdelkih razmeroma visoka. Pinhatti in sodelavci (1997) so ugotovili, da je pri 34 analiziranih komercialnih sadnih sokovih in koncentratih kar 67 % izdelkov kontaminiranih z bakterijami rodu *Alicyclobacillus*.

Eiroa in sodelavci (1999) so ugotovili, da so bakterije rodu *Alicyclobacillus* razmeroma razširjene v koncentratih pomarančnega soka in kar 14,7 % vzorcev zgoščenih sokov pomaranče je vsebovalo spore bakterij rodu *Alicyclobacillus*. Borlinghaus in Engel (1997) sta ugotovila visoko stopnjo pojavljanja bakterij rodu *Alicyclobacillus* v koncentratih jabolčnega soka, saj je kar 36 % vzorcev vsebovalo te bakterije (od 166 vzorcev).

Jensen (2000) je prav tako opravil študijo s katero je določal pogostost bakterij rodu *Alicyclobacillus* v avstralskih sadnih sokovih. Ugotovil je, da je od 85 testiranih pomarančnih sokov kar 31 % vsebovalo bakterije vrste *A. acidoterrestris* in 41 % sokov je vsebovalo bakterije vrste *A. acidocaldarius*. Od 64 analiziranih koncentratov jabolčnega soka pa je 12 % vzorcev vsebovalo bakterije vrste *A. acidoterrestris* in 7 % bakterije vrste *A. acidocaldarius*.

Pogosta razloga za zavrnitev živila zaradi kvara, ki ga povzročajo bakterije rodu *Alicyclobacillus*, sta nesprejemljiv okus in/ali vonj. Vsako leto je vedno več pritožb potrošnikov, zaradi priokusa in nestabilnosti svežih, predelanih ali pakiranih živil. Glavni neželeni produkti, ki jih tvorijo bakterije rodu *Alicyclobacillus*, so proizvodnja gvajakola in halofenolov, vključno z 2,6-dibromofenolom (2,6-DMP) in 2,6-diklorofenolom (2,6-DCP). Čeprav je gvajakol splošno sprejet kot prevladujoči priokus, se 2,6-dibromofenola in 2,6-diklorofenola ne sme spregledati (Chang in Kang, 2004).

Gvajakol je že dolgo poznan kot dober in slab priokus v različnih živilih. Plinasti fenolni vonj gvajakola je dobro uveljavljen in se uporablja kot sestavina sintetične arome pri predelavi živil. Gvajakol prispeva praženim izdelkom značilen vonj, kot sta to kava Arabica in ječmenov slad, vendar pa je verjetno bolje poznan kot stranski vonj vina, sadnega soka, čokoladnega sladoleda in vanilijevega jogurta. Simpson in sodelavci (1986) so določili kvar v komercialnih vinih, ki je bil posledica nastanka gvajakola. V vinotočih so ocenili, da je bilo v približno 20 % polnjenih steklenic z vinom prisoten gvajakol in odkrili so, da obstajajo precejšnje razlike v koncentraciji gvajakola v steklenicah. O dogodkih povezanih z gvajakolom so v zadnjih desetih letih poročali tudi proizvajalci mlečnih izdelkov. Gvajakol je bil obsežen vzrok za priokuse v čokoladnem sladoledu, slaščičarskih izdelkih in vanilijevem jogurtu. V vseh primerih je bil gvajakol, mikrobiološkega izvora (*Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis*, *Streptomyces setonii*). Čeprav je vonj zaželen pri dimljenih in praženih živilih, gvajakol oddaja nezaželen senzorični vonj v mnogih živilih (Chang in Kang, 2004).

Duong in Jensen (2000) sta poročala o redkih primerih kvara ledenih čajev z okusom jagodičevja, povzročenega z strani bakterij rodu *Alicyclobacillus*. Kvarjenje se je odražalo v neželenem vonju po zdravilih ali kemikalijah ne da bi se povečala motnost, tvorba plina ali sedimenta. Duong in Jensen prav tako pripisujeta ta vonj prisotnosti gvajakola.

2.6 STANDARDNA METODA DOLOČANJA BAKTERIJ RODU *Alicyclobacillus*

Standardna metoda IFU (IFU, 2004) predpisuje reprezentativen vzorec, ki se ga toplotno obdela s toplotnim šokom pri 80 °C za 10 minut. Enak učinek toplotnega šoka dosežemo s segrevanjem pri 60 °C za 1 uro. Postopku sledi direktna nacepitev vzorca na gojišče ali obogatitev. Metoda, navaja tudi filtracijo, vendar ta ni obvezen korak. Vzorec se filtrira skozi filter z velikostjo por 0,45 µm. Filtracijska membrana se nato aseptično prenese na gojišče K-agar, BAT ali YSG. Standardna metoda IFU priporoča, da se težko ali ne filtrirajoče vzorce podvrže obogatitveni metodi, katera vsebuje inkubacijo toplotno obdelanih vzorcev pri 45 °C za 7 dni. Po postopku obogatitve sledi direktna nacepitev na gojišče in inkubacija gojišč pri 45 °C za 3 do 5 dni.

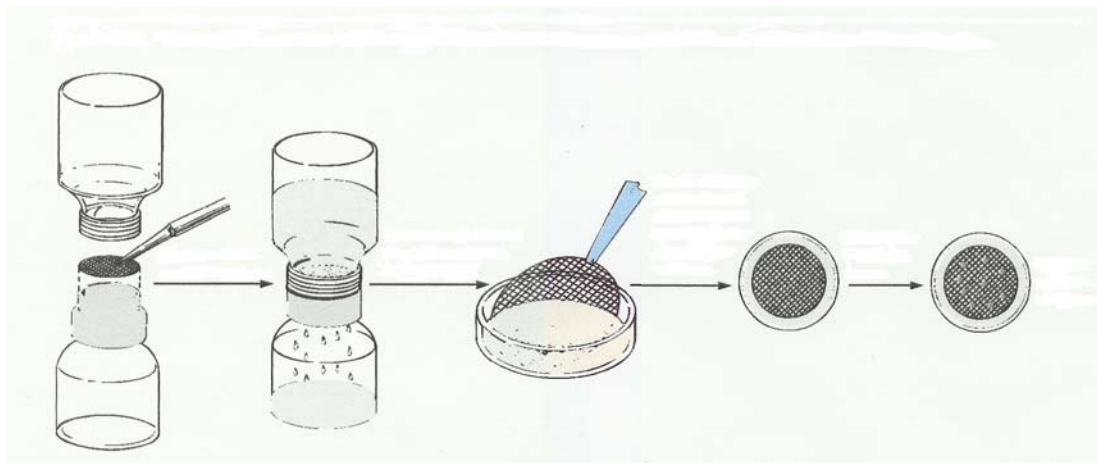
Konvencionalna metoda identifikacije bakterij rodu *Alicyclobacillus* vsebuje standardne biokemijske in morfološke teste, ki ponavadi zahtevajo veliko časa za izvedbo in zanesljivost izolacijskih postopkov (Chang in Kang, 2004).

2.6.1 Membranska filtracija

Membranska filtracija se pogosto uporablja za zbiranje mikroorganizmov iz različnih vrst vzorcev, vključno s tekočinami in plini. Membranska filtracija se na primer uporablja pri odkrivanju koliformnih bakterij, patogenih bakterij, gliv in virusov (Dutka, 1981).

Princip membranske filtracije je v tem, da zadrži delce večje od velikosti por uporabljenega filtra. Ena glavnih prednosti membranske filtracije se nanaša na sposobnost, da se testira večja količina vzorca, namesto da bi bila omejena kot je pri nanašanju na trdo gojišče. Membranska filtracija je standardna metoda za odkrivanje mikroorganizmov v vzorcih, katere se lahko filtrira, kot so voda in pijače (Chang in Kang, 2004). Velikost por je odvisna od gostote vzorca, katerega se filtrira. Za izolacijo bakterij in drugih mikroorganizmov se uporabljajo filtri z velikostjo por 0,45 µm (Millipore Corporation, 2001). Za štetje mikrobov z uporabo membranske filtracije se morajo vzorci filtrirati skozi filter, kateri se nato nanese direktno na plošče s trdim gojiščem ali v tekoče gojišče, ki omogoča rast mikroorganizmov v času inkubacije (Pettipher in Osmundson, 2000). Postopek je prikazan na sliki 4. Čas inkubacije se razlikuje glede na različne ciljne mikroorganizme ter glede na izvor in uporabo medija za rast. Gojišča s filtri se običajno inkubirajo od 18 ur in vse do nekaj tednov preden je opazna rast kolonij. V zgodnjih fazah raziskovanja bakterij rodu *Alicyclobacillus*, so bile uporabljene konvencionalne metode gojenja za ugotavljanje prisotnosti in števila mikroorganizmov (Chang in Kang, 2004).

Že leta 1994 so uporabili membransko filtracijo za izolacijo bakterij rodu *Alicyclobacillus*. Splittstoesser in sodelavci (1994) so poročali, da pojavnost kontaminacije pijač z bakterijami rodu *Alicyclobacillus* ni bila visoka. Bakterije so določili tako, da so filtrirali vzorce pijač skozi filter z velikostjo por 0,45 µm. Albuquerque in sodelavci (2000) so izolirali bakterije vrste *A. hesperidum* iz suspenzije zemlje s pomočjo GN-6 membranskega filtra (velikost por 0,45 µm). Goto in sodelavci (2002) so izolirali bakterije vrste *A. herbarius* prav tako s pomočjo membranske filtracije.



Slika 4: Postopek kvantifikacije mikroorganizmov z uporabo membranske filtracije (Prescott in sod., 2002)

Postopki izolacije bakterij rodu *Alicyclobacillus* se večinoma izvajajo z direktnim nanosom vzorca na/v gojišče ali pa se tudi kombinirajo z membransko filtracijo (Splittstoesser in sod., 1994; Albuquerque in sod., 2000; Goto in sod., 2002). Nekaj preiskav je predpostavljalo, da se membranska filtracija uporablja za odstranitev bakterij *Alicyclobacillus* iz izdelkov, kot del postopkov rutinske kontrole kvalitete sadnih sokov. (Vieira in sod., 2002; Chang in Kang, 2004). Filtracija je bolj občutljiva in ima nižjo mejo detekcije kot direktna tehnika nanosa, ker se lahko večja količina vzorca prefiltrira skozi filter (Chang in Kang, 2004; Lee in sod., 2007).

2.6.2 Test API 50 CH

Testi API so standardizirane verzije običajnih testov za identifikacijo bakterij družine Enterobacteriaceae in ostalih gramnegativnih bakterij. So pripravljeni za takojšnjo uporabo in vsebujejo 49 standardnih biokemijskih testov.

Test API 50 CH je eden od postopkov, ki omogoča, da ocenimo fiziološke lastnosti nekega organizma, kot so rast in metabolizem posameznega substrata vključno z ogljikovimi hidrati, polialkoholi, heterogenimi in uronskimi kislinami. Iz spremembe barve v skledastem delu traku, je mogoče sklepati da gre za eno od prilagoditvenih, oksidativnih ali fermentacijskih poti. Ker fermentacijski sistem API 50 CH vsebuje več vrst spojin, so rezultati zelo koristni pri ocenjevanju lastnosti seva in pojasnjevanju svoje fiziološke pripadnosti. Sistem služi tudi kot pomembno orodje pri identifikaciji bacilov (Nigatu, 2000).

Leta 1984 sta Logan in Berkeley prva uporabila test API 50 CH za identifikacijo velikega števila sevov bakterij rodu *Bacillus*, ter dokazala, da so testi API bolj ponovljivi od klasičnih biokemijskih testov. Boyd in sodelavci (2005) so s testi API 50 CH identificirali 97 sevov bakterij rodu *Lactobacillus*.

Albuquerque in sodelavci (2000) so prvi uporabili teste API 50 CH za identifikacijo 4 izolatov bakterij rodu *Alicyclobacillus*, ter določili uporabo gojišča in indikatorja v sistemu

API. Goto in sodelavci (2006) so izolirali bakterije rodu *Alicyclobacillus* iz različnih virov (pomarančni sok, limonin sok, jabolčni sok, sok lubenice, koncentrat pomaranč). Dobili so 180 izolatov in jim s pomočjo testov API 50 CH določili biokemijski profil, ter jih tako identificirali. Za identifikacijo izolatov s pomočjo API 50 CH testov se je odločilo več raziskovalcev, tako so Goto in sodelavci (2007) identificirali 146 izolatov, Matsubara in sodelavci (2002) 5 izolatov, Simbahan in sodelavci (2004) prav tako 5 izolatov, od katerega je ena bila nova vrsta bakterij rodu *Alicyclobacillus*.

3 MATERIAL IN METODE DELA

3.1 MATERIAL

3.1.1 Gojišča

3.1.1.1 Trdno gojišče BAT

14,5 g osnovnega gojišča BAT (Merck, 1.07994.0500, Nemčija) smo raztopili v 500 ml destilirane vode in nato 15 minut sterilizirali v avtoklavu pri 121 °C. Osnovni medij smo ohladili na 45 – 50 °C, ter smo mu znižali pH na 4,0 z 1 M H₂SO₄ (Merck 1.00731.1000, Nemčija). Vsebino smo dobro premešali in razlili na petrijevke po 15 ml.

3.1.1.2 Fiziološka raztopina

Zatehtali smo 3,4 g KH₂PO₄ (Kemika, 1112408, Hrvaška) in ga raztopili v 100 ml destilirane vode (pH =7,2). 1,25 ml tako pripravljene raztopine KH₂PO₄, smo razredčili v 1000 ml destilirane vode. Raztopino smo dobro premešali ter jo razlili v steklenice ustreznih velikosti (500 ml fiziološke raztopine v 1000 ml steklenico in 100 ml fiziološke raztopine v 250 ml steklenico) in jih 15 minut sterilizirali v avtoklavu pri 121 °C.

3.1.1.3 Trdno gojišče *Bacillus acidocaldarius* (BAM)

Preglednica 4: Sestavine dela A gojišča BAM

Sestavine	Količina (g/l)	Šifra in proizvajalec
Kvasni ekstrakt	1,00	412220, BioLife, Italija
Amonijev sulfat (NH ₄) ₂ SO ₄	0,20	Zorka Šabac, Makedonija
Magnezijev sulfat MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,50	1.05826.0500, Merck, Nemčija
Kalcijev klorid CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,25	1.02382.0500, Merck, Nemčija
KH ₂ PO ₄	0,60	1112408, Kemika, Hrvaška
Destilirana voda	500 ml	/

Preglednica 5: Sestavine dela B gojišča BAM

Sestavine	Količina (g/l)	Šifra in proizvajalec
Glukoza	1,00	0705007, Kemika, Hrvaška
Agar	20,00	4110302, BioLife, Italija
Destilirana voda	500 ml	/

Obe sestavini, A in B, smo pripravili posebej ter ju 15 minut sterilizirali pri 121 °C. Nato smo ju ohladili na 50 °C in zmešali v razmerju 1:1.

3.1.1.4 Tekoče gojišče *Bacillus acidocaldarius* (BAM)

Za pripravo tekočega gojišča BAM smo uporabili enak postopek kot je opisan v točki 3.1.1.3, le da pri delu B nismo dodali agarja.

3.1.1.5 Trdno gojišče *Alicyclobacillus* (AM)

Preglednica 6: Sestavine dela A gojišča AM

Sestavine	Količina (g/l)	Šifra in proizvajalec
Kalcijev klorid $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	0,25	1.02382, Merck, Nemčija
Magnezijev sulfat $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	0,50	1.05826.0500, Merck, Nemčija
Amonijev sulfat $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,20	Zorka Šabac, Makedonija
Kvasni ekstrakt	2,00	412220, BioLife, Italija
Glukoza	5,00	0705007, Kemika, Hrvaška
KH_2PO_4	3,00	1112408, Kemika, Hrvaška
Destilirana voda (tekoč medij)	1000 ml	/
Destilirana voda (trden medij)	500 ml	/

Preglednica 7: Sestavine dela B (Mineralna raztopna SL – 6) gojišča AM

Sestavine	Količina (g/l)	Šifra in proizvajalec
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	0,10	1.08883.0500, Merck, Nemčija
MnCl ₂ x 4 H ₂ O	0,03	13225, Kemika, Hrvaška
H ₃ BO ₃	0,30	1.00165.0500, Merck, Nemčija
CoCl ₂ x 6 H ₂ O	0,20	20,218-5, Sigma-Aldrich Chemie, Nemčija
CuCl ₂ x 2 H ₂ O	0,01	22,178-3, Sigma-Aldrich Chemie, Nemčija
NiCl ₂ x 6 H ₂ O	0,02	N-5756, Sigma, ZDA
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	0,03	14189, Kemika, Hrvaška
Destilirana voda	1000 ml	/

Preglednica 8: Sestavine dela C gojišča AM

Sestavine	Količina (g/l)	Šifra in proizvajalec
Agar	15,00	4110302, BioLife, Italija
Destilirana voda	500 ml	/

Vse tri sestave A, B in C smo pripravili vsako posebej v svoji steklenici. Sestavi A smo znižali pH na 4,0 z 1M H₂SO₄ pred sterilizacijo. Vse tri sestave smo sterilizirali 15 minut pri 121 °C. Nato smo zmešali sestavo A in C, ter dodali še 1 ml sestave B. Vse skupaj smo razlili na petrijeve plošče. Za tekoč medij (bujon) se uporabita samo sestavi A in B, se pravi sestavi A smo dodali 1 ml sestave B. Če pa je sev *Alicyclobacillus cycloheptanicus*, potem dodamo kvasnega ekstrakta 5 g/L, namesto 2 g/L.

3.1.2 Tipski sevi bakterij

Pri delu smo za potrditev identifikacije neznanih izolatov uporabili tipske seve, ki so prikazani v preglednici 9.

Preglednica 9: Tipski sevi bakterij rodu *Alicyclobacillus*

OZNAKA	VRSTA	ŠIFRA IN PRIZVAJALEC
ŽMJ183	<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i>	446, DSMZ, Nemčija
ŽMJ184	<i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i>	3922, DSMZ, Nemčija
ŽMJ185	<i>Alicyclobacillus acidiphilus</i>	14558, DSMZ, Nemčija

3.1.3 Vzorci živil

Vzorci živil za preiskave so bili sladkor (20 vzorcev) in izvirska voda z okusom (5 vzorcev). Vse vzorce smo dobili iz proizvodnje brezalkoholnih pijač. V vzorcih smo na različne načine izvedli izolacijo bakterij rodu *Alicyclobacillus*.

Vzorci sladkorja smo označili s številkami od 1 do 20. Pri vzorcih izvirske vode z okusom smo vzorce označili prav tako od 1 do 5.

Pri našem delu smo za izolacijo uporabili različne izvedbe standardne metode (IFU, 2004) in zato smo izolate označili glede na izvedbo izolacije. Tako smo izolate dobljene iz sladkorja s standardno metodo IFU z obogatitvijo označili s številko vzorca in še s črkama a in b (paralelke), izolate dobljene iz sladkorja s standardno metodo IFU brez obogatitve smo označili s črkama c in d, izolate dobljene iz izvirske vode s standardno metodo IFU in z obogatitvijo brez segrevanja smo označili s črko e in izolate dobljene iz izvirske vode z okusom s standardno metodo IFU z obogatitvijo in s segrevanjem smo označili s črko f. Na primer izolat z oznako 1a, je vzorec številka 1 in izolat iz prve paralelke.

3.1.4 Aparati

V preglednici 10 so zbrani aparati, ki smo jih uporabili pri eksperimentalnem delu.

Preglednica 10: Aparature, ki smo jih uporabili pri eksperimentalnem delu

APARAT	OZNAKA	PROIZVAJALEC
Avtoklav	Tip 250	Sutjenska, Jugoslavija
Mikroskop	BA210	Motic
Računalnik in program za slikanje mikroskopskih preparatov		
Inkubator 1	I-115C	Kambič, Slovenija
Digitalna tehtnica	PB 1502-S	Mettler Toledo, Švica
pH – meter		
Hladilnik		LTH, Slovenija
Zmrzovalnik		LTH, Slovenija
Inkubator 2	I-105CK	Kambič, Slovenija
Stresalnik	Vibriomix 314 EVT	Tehtnica, Slovenija
Vodna kopel	E7805028	Sutjeska, Jugoslavija

Poleg navedenih aparatov smo uporabljali še: cepilne zanke, avtomatske pipete in nastavke (Eppendorf, Nemčija), petrijeve plošče (Labortechnika Golias, Slovenija), laboratorijske steklenice – 100 ml, 1000 ml (Duran, Nemčija), filter papirje, steklovino, plinski gorilnik, parafilm (PM 992, American National Can), pincete in programsko opremo.

3.1.5 Material za identifikacijo

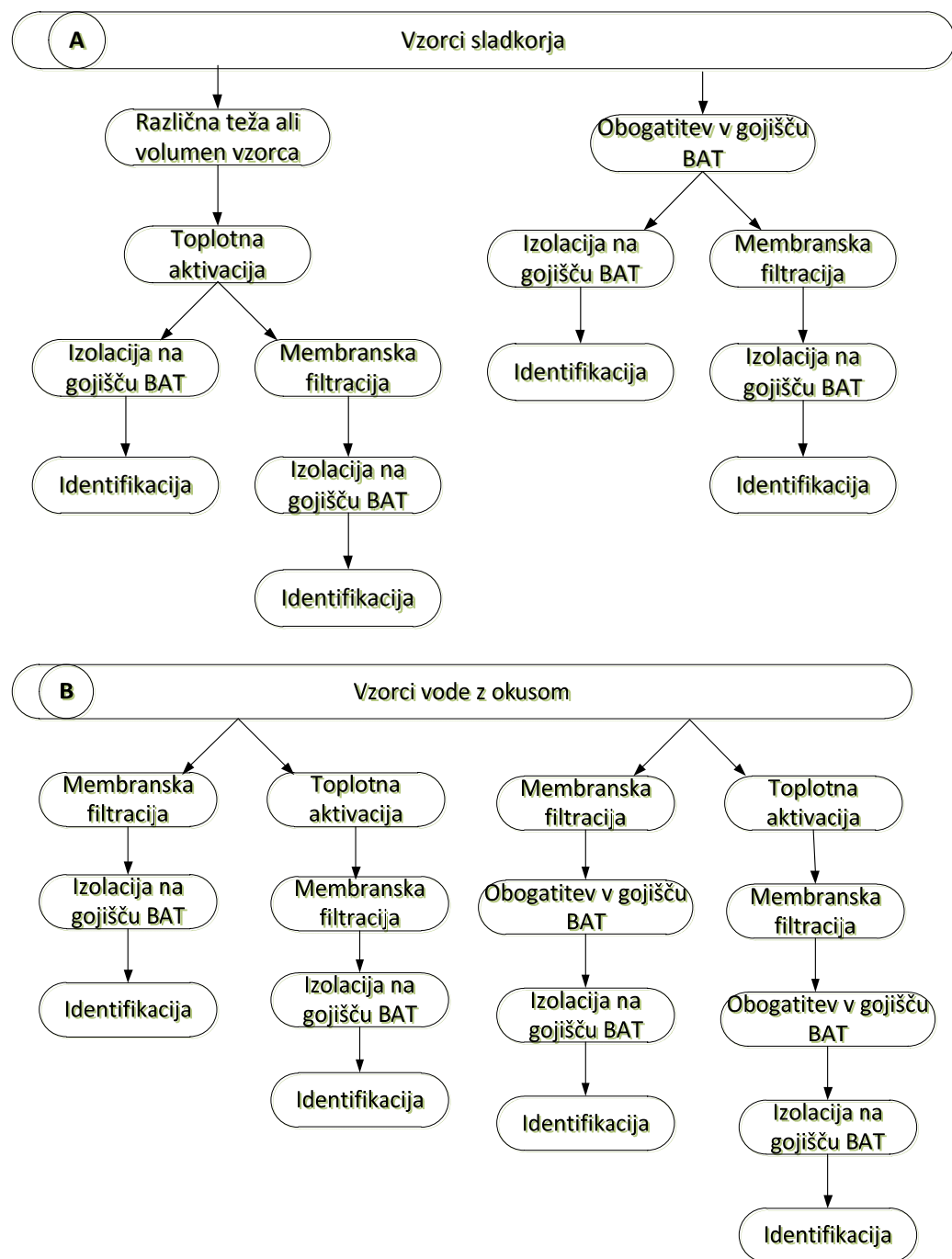
Test API 50 CH (Biomérieux, REF 50 430, Francija) so namenjeni identifikaciji bakterij rodu *Bacillus* in sorodnih rodov. Testi API 50 CH so pripravljeni za takojšnjo uporabo in vsebujejo 49 ogljikovih hidratov ter njihovih derivatov.

Za barvanje bakterijskih celic in spor je potrebno: objektno stekelce, raztopine: kristal violet, lugol, alkohol, safranin, malahit zelenilo in voda.

3.2 METODE

3.2.1 POTEK EKSPERIMENTALNEGA DELA

Namen našega dela je bil, da bi iz naravno kontaminiranih vzorcev sladkorja in vzorcev izvirske vode z okusom, izolirali bakterije rodu *Alicyclobacillus* z vzporednimi različnimi izvedbami standardne metode IFU (IFU, 2004). Shema poskusa eksperimentalnega dela je prikazana za vzorce sladkorja (A) in za vzorce izvirske vode z okusom (B) na sliki 5.



Slika 5: Shema eksperimentalnega dela za vzorce sladkorja (A) in za vzorce izvirske vode z okusom (B)

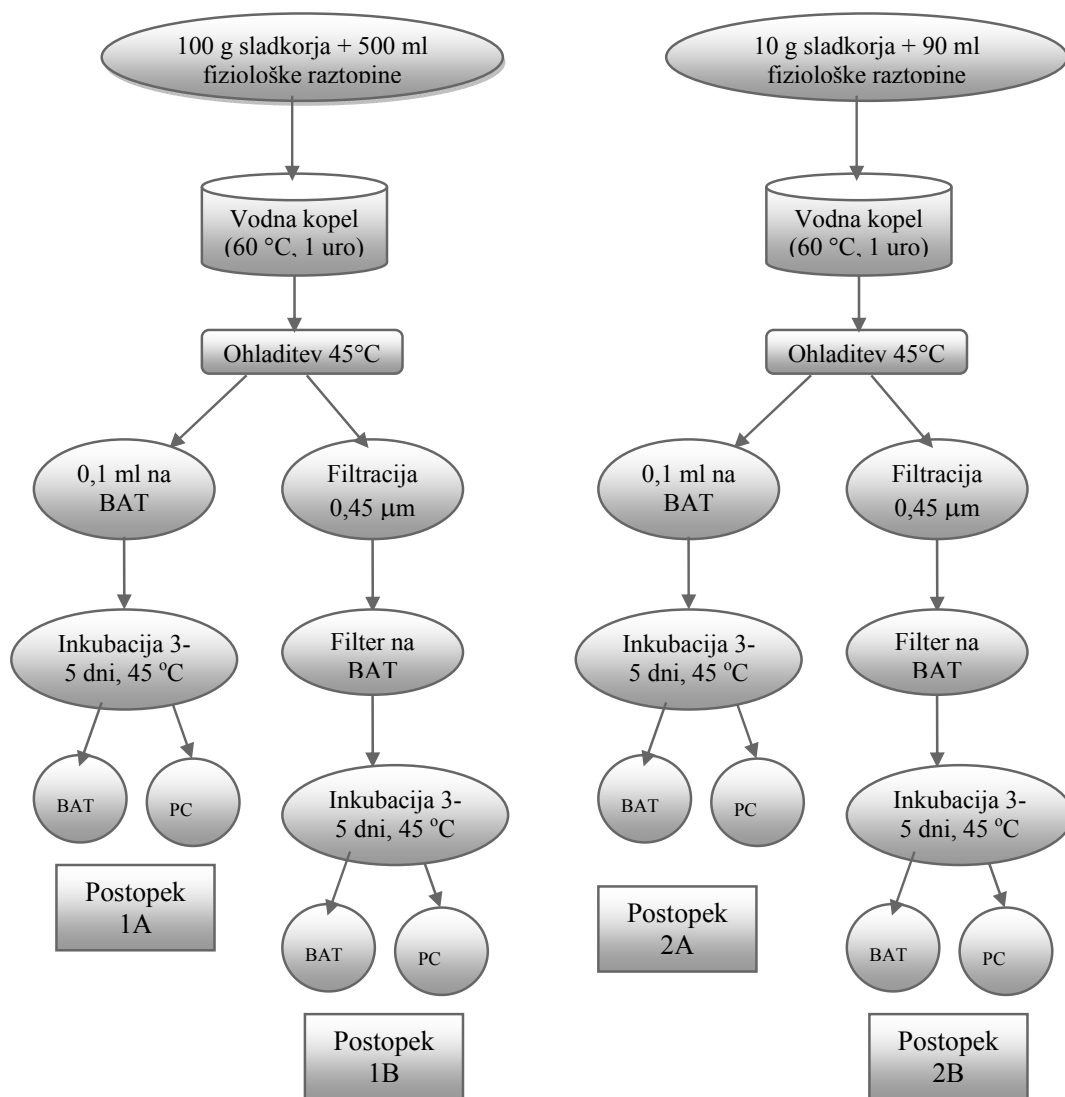
3.2.2 Izolacija bakterij rodu *Alicyclobacillus* po standardni metodi IFU

Metoda IFU določanja bakterij rodu *Alicyclobacillus* v sadnih sokovih je bila razvita s strani IFU delovne skupine za Mikrobiologijo in temelji na uporabi gojišča K-agar v kombinaciji z gojiščem BAT ali gojiščem YSG. Vzorce katere ni enostavno prefiltrirati se nacepi direktno ali po obogatitvi. Vzorce katere lahko filtriramo, je potrebno analizirati s pomočjo membranske filtracije. Razlikovanje temelji na tem, da bakterije rodu *Alicyclobacillus* niso zmožne rasti na standardnih gojiščih z nevtralnim pH. Rast in tvorba spor je možna samo na gojiščih K-agar ter YSG in BAT pri temperaturi 45 °C s pH 4, nekateri sevi pa lahko rastejo pri pH 4 in temperaturi 65 °C (Yokota in sod., 2007).

3.2.2.1 Postopki izolacije bakterij rodu *Alicyclobacillus* iz vzorcev sladkorja

3.2.2.1.1 Standardna metoda IFU brez obogatitve

Pri standardni metodi (IFU, 2004) izolacije bakterij rodu *Alicyclobacillus* smo v paralelkah sterilno zatehtali vzorce sladkorja in sicer smo pri postopkih 1A in 1B zatehtali po 100 g in pri postopkih 2A in 2B po 10 g sladkorja (slika 6). Nato smo aseptično dodali 500 ml oziroma 90 ml fiziološke raztopine. Standardna metoda navaja le postopka 2A in 2B. Ker smo domnevali, da je v vzorcih nizko število bakterij, smo povečali količino vzorca (postopka 1A in 1B). Vse paralelke smo nato inkubirali 1 uro v vodni kopeli pri 60 °C. Domnevali smo, da bo učinek enak kot pri standardni metodi IFU kjer je inkubacija 10 minut pri 80 °C. Raztopine smo ohladili na 45 °C, vsebino smo dobro in pazljivo premešali ter aseptično nacepili 0,1 ml suspenzije na gojišče BAT. Preostalo suspenzijo smo filtrirali skozi filter (0,45 µm) in filter aseptično položili na gojišče BAT. Gojišča BAT smo inkubirali 3 – 5 dni v inkubatorju pri 45 °C. Vse kolonije, katere so zrasle na gojišču BAT, smo aseptično precepili na gojišče PC ter sočasno na gojišče BAT. Petrijevke smo inkubirali v inkubatorju pri temperaturi 45 °C. Po inkubaciji smo pregledali petrijevke in določili rast. Če je bila rast izolatov na gojišču BAT in ni bilo rasti na gojišču PC smo dobili izolate rodu *Alicyclobacillus*. Za dodatno potrditev rodu *Alicyclobacillus* smo iz vseh vzorcev naredili še mikroskopske preparate in jih barvali po Gramu in Schaeffer-Fulton.

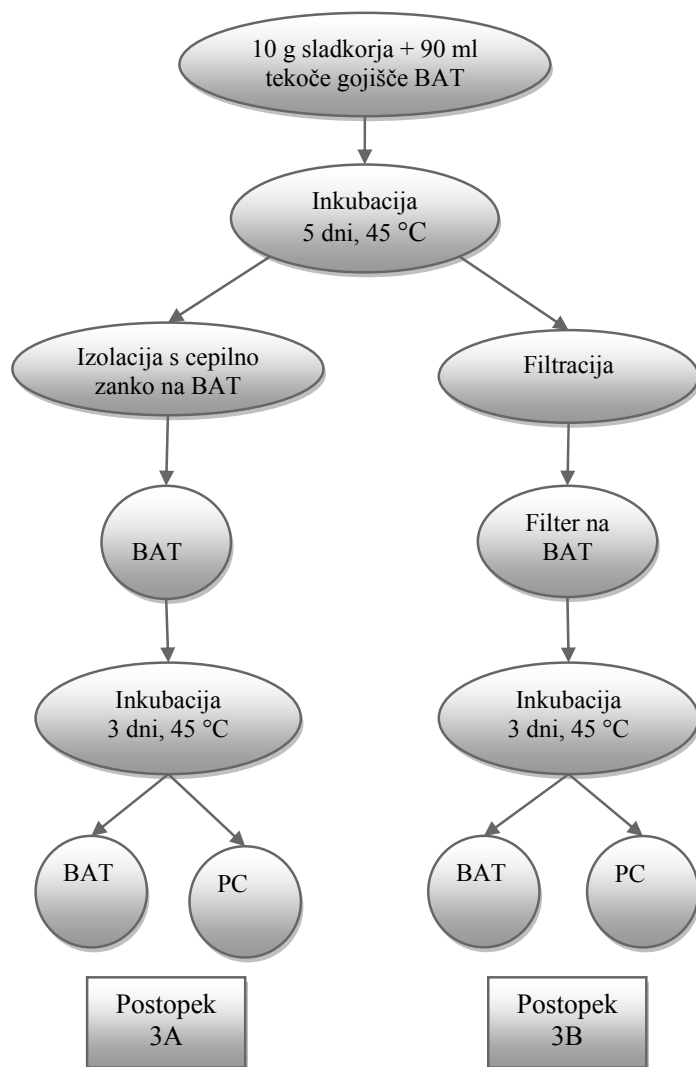


Slika 6: Postopki izolacije bakterij rodu *Alicyclobacillus* iz vzorcev sladkorja po standardni metodi IFU (2004) brez obogatitve

3.2.2.1.2 Standardna metoda IFU z obogatitvijo

Pri izolaciji bakterij rodu *Alicyclobacillus* po standardni metodi IFU z obogatitvijo smo v paralelkah aseptično zatehtali 10 g vzorca sladkorja in ga sterilno dodali k 90 ml tekočega gojišča BAT (slika 7). Vse suspenzije smo inkubirali 5 dni v inkubatorju pri 45 °C. Po inkubaciji smo suspenzijo dobro in pazljivo premešali in s cepilno zanko cepili na gojišče BAT. Preostalo suspenzijo smo filtrirali skozi filter (0,45 µm) in filter aseptično položili na gojišče BAT. Vsa gojišča smo nato inkubirali 3 dni v inkubatorju pri 45 °C. Po inkubaciji smo vse kolonije precepili na gojišče PC ter na gojišče BAT in gojišča inkubirali v inkubatorju pri temperaturi 45 °C. Po inkubaciji smo preverili rast na gojiščih, če je bila

rast na gojišču BAT in ni bilo rasti na gojišču PC, smo dobili kot izolat bakterije rodu *Alicyclobacillus*. Za dodatno potrditev rodu smo iz vsakega vzorca še naredili mikroskopske preparate in jih barvali po Gramu in Schaeffer-Fulton.



Slika 7: Postopka izolacije bakterij rodu *Alicyclobacillus* iz vzorcev sladkorja po standardni metodi IFU (2004) z obogatitvijo

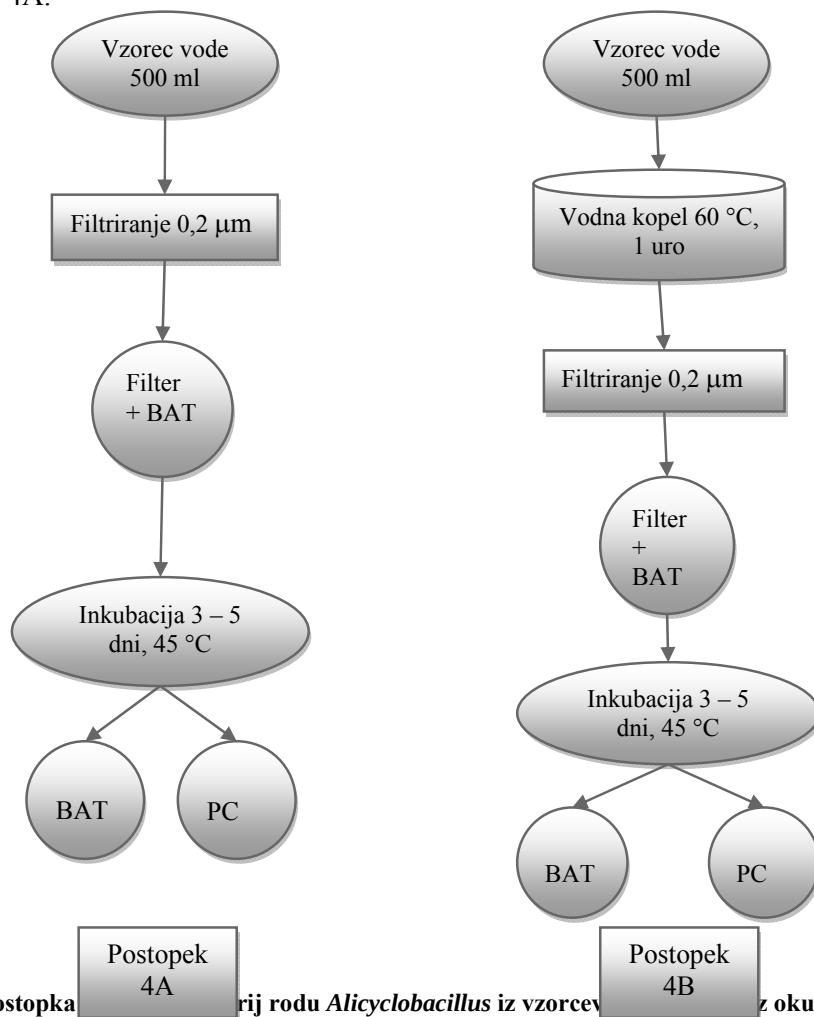
3.2.2.2 Postopki izolacije bakterij rodu *Alicyclobacillus* iz vzorcev izvirske vode z okusom

3.2.2.2.1 Standardna metoda IFU brez obogatitve

Pri standardni metodi IFU brez obogatitve smo preizkusili dve različici (slika 8) tako, da smo vzorec izvirske vode z okusom analizirali brez toplotne aktivacije (postopek 4A) in s toplotno aktivacijo (postopek 4B). Pri postopku 4A smo sterilno prefiltrirali 500 ml vzorca

izvirske vode z okusom, skozi filter z velikostjo por $0,2\ \mu\text{m}$ ter ga aseptično položili na gojišče BAT. Nato smo gojišče inkubirali 3 – 5 dni v inkubatorju pri $45\ ^\circ\text{C}$. Kolonije smo po inkubaciji sterilno precepili na gojišči PC in na BAT. Petrijevke smo inkubirali 3-5 dni v inkubatorju pri temperaturi $45\ ^\circ\text{C}$.

Pri postopku 4B smo 500 ml vzorca izvirske vode z okusom najprej segrevali eno uro v vodni kopeli pri $60\ ^\circ\text{C}$. Po toplotni aktivaciji spor samo analizo nadaljevali enako kot v postopku 4A.

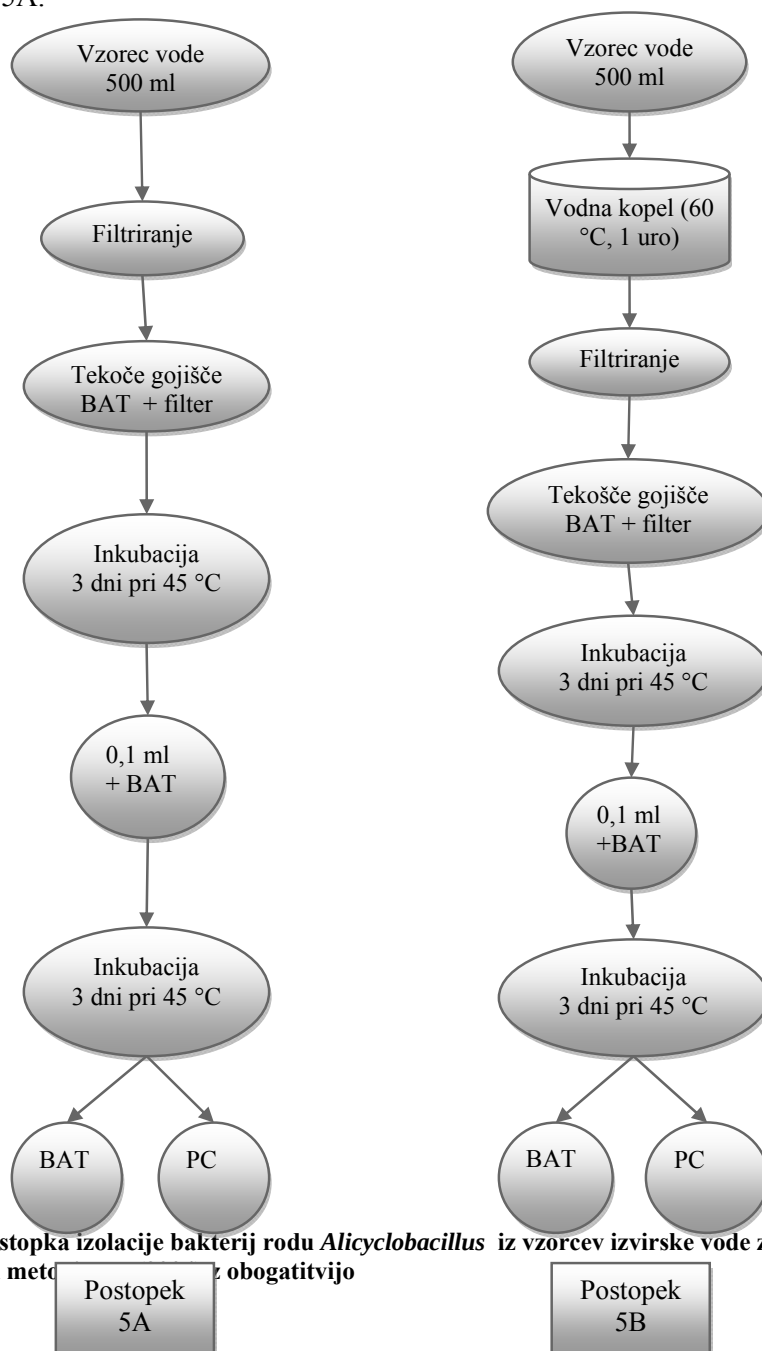


Slika 8: Postopka izolacije bakterij rodu *Alicyclobacillus* iz vzorcev izvirske vode z okusom po standardni metodi IFU (2004) brez obogatitve

3.2.2.2.2 Standardna metoda IFU z obogatitvijo

Pri standardni metodi IFU z obogatitvijo smo preizkusili dve različici (slika 9) tako, da smo vzorec izvirske vode z okusom analizirali brez toplotne aktivacije (postopek 5A) in z toplotno aktivacijo (postopek 5B). Pri postopku 5A smo sterilno prefiltrirali 500 ml vzorca izvirske vode z okusom, skozi filter z velikostjo por $0,2\ \mu\text{m}$ ter ga aseptično prenesli v 20 ml tekočega gojišča BAT. Po inkubaciji smo nato cepili $0,1\ \text{ml}$ suspenzije na gojišče BAT ter ga inkubirali pri $45\ ^\circ\text{C}$. Kolonije smo po inkubaciji sterilno precepili na gojišči PC in na BAT. Petrijevke smo inkubirali 3-5 dni v inkubatorju pri temperaturi $45\ ^\circ\text{C}$.

Pri postopku 5B smo 500 ml vzorca izvirske vode z okusom najprej segrevali eno uro v vodni kopeli pri 60 °C. Po toplotni aktivaciji spor smo analizo nadaljevali enako kot v postopku 5A.



Slika 9: Postopka izolacije bakterij rodu *Alicyclobacillus* iz vzorcev izvirske vode z okusom po standardni metodi z obogatitvijo

3.2.3 Identifikacija bakterij rodu *Alicyclobacillus*

Za identifikacijo bakterij rodu *Alicyclobacillus* smo določili morfološke lastnosti, naredili test rasti pri različnih temperaturah in preverili biokemijske lastnosti.

3.2.3.1 Morfološke lastnosti

Določali smo naslednje makromorfološke lastnosti: velikost kolonij, barvo kolonij, obliko roba, izbočenost ali ploščatost in odsev kolonij.

Za določitev mikromorfoloških lastnosti smo najprej morali pripraviti razmaze izolatov na stekelcih. Nato smo jih barvali po Gramu in po Schaeffer – Fultonu.

Postopek barvanja po Gramu (Prescott in sod., 2002):

1. Razmaz smo fiksirali nad plamenom.
2. Preparat smo barvali s kristal vijoličnim barvilom dve minuti.
3. Pod rahlim curkom vode smo preparat sprali.
4. Preparat smo barvali z lugolom dve minuti.
5. Preparat smo potopili v etanol (96 % alkohol).
6. Pod rahlim curkom vode smo preparat sprali.
7. Preparat smo obarvali s safraninom, 30 sekund.
8. Na koncu smo še enkrat sprali pod rahlim curkom vode in preparat posušili.

Postopek barvanja bakterijskih spor po Schaefferju in Fultonu (Prescott in sod., 2002):

1. Razmaz smo fiksirali nad ognjem.
 2. Razmaz smo pokrili s papirnatno brisačko.
 3. Preparat smo prelili s 5 % raztopino malahit zelenilo ter pustili 1 minuto, nato smo jo segrevali 5 minut, ter sproti dodajali barvilo in pazili na to da barvilo ni zavrelo ali pa se posušilo.
 4. Preparat smo temeljito sprali pod rahlim curkom vode.
 5. Preparat smo prelili z 0,5 % raztopino safranina in barvali 30 sekund.
 6. Na koncu smo preparat še enkrat sprali pod rahlim curkom vode in ga posušili.
- Spore so se obarvale zeleno, celice pa rdeče.

3.2.3.2 Metoda različnih temperatur

Ta metoda temelji na dejstvu, da imajo bakterije vrste *A. acidoterrestris* v primerjavi z drugimi vrstami istega rodu nižjo optimalno temperaturo rasti. Metoda omogoča v 24 urah določitev vrste *A. acidocaldarius* in *A. acidoterrestris* (vključno z vrsto *A. acidiphilus* in *A. hesperidum*) (Goto, 2007b).

V primeru, da so na gojišču BAT zrastle kolonije, smo le – te precepili na dve petrijevi plošči z gojiščem BAT. Eno ploščo smo 24 ur inkubirali pri 45 °C, eno pa pri 65 °C. Glede na rast pri različnih temperaturah smo lahko okvirno določili vrsto:

- rast kolonij pri 45 °C in ni rasti pri 65 °C, pomeni da gre za vrsto *A. acidoterrestris*,
- ni rasti pri 45 °C in rast kolonij pri 65 °C, pomeni da gre za vrsto *A. acidocaldarius*,
- rast pri obeh temperaturah pomeni, da sta v vzorcu obe vrsti *A. acidoterrestris* in *A. acidocaldarius*,
- ni rasti pri obeh temperaturah pomeni, da v vzorcu ni vrst *A. acidoterrestris* in *A. acidocaldarius*, ampak so v vzorcu bile prisotne druge vrste bakterij iz rodu *Alicyclobacillus*. Pri tem je potrebno vedeti, da za vrste *A. acidiphilus*, *A. cycloheptanicus*, *A. hesperidum* veljajo podobne značilnosti kot za vrsto *A. acidoterrestris*.

3.2.3.3 Biokemijski testi

Kot biokemijske teste smo za določitev vrste uporabili teste API 50 CH. API 50 CH je sestavljen iz 49 dehidriranih ogljikovih hidratov in njihovih derivatov (alkoholov, polialkoholov, monosaharidov, disaharidov, polisaharidov, glikozidov, mineralov) ter 1 negativne kontrole (preglednica 11).

Preglednica 11: Sestava biokemijskih testov API 50 CH

TUBA	OKRAJŠAVA	VSEBINA
0	/	Kontrola
1	GLY	Glicerol
2	ERY	Eritritol
3	DARA	D-Arabetoza
4	LARA	L-Arabetoza
5	RIB	D-Ribitoza
6	DXYL	D-Ksilitoza
7	LXYL	L-Ksilitoza
8	ADO	D-Adonitol
9	MDX	Metil-βD-ksilopiranozid
10	GAL	D-Galaktoza
11	GLU	D-Gluktoza
12	FRU	D-Fruktoza
13	MNE	D-Manoza
14	SBE	L-Sorboza
15	RHA	L-Ramnoza
16	DUL	Dulcitol
17	INO	Inositol
18	MAN	D-Manitol
19	SOR	D-Sorbitol
20	MDM	Metil-αD-manopiranozid
21	MDG	Metil-αD-glukopiranozid
22	NAG	N-Acetilglukozamin
23	AMY	Amigdalina
24	ARB	Arbutin
25	ESC	Eskulin železov citrat
26	SAL	Salicin
27	CEL	D-Celobioza
28	MAL	D-Maltoza
29	LAC	D-Laktoza
30	MEL	D-Melibioza
31	SAC	D-Saharoza
32	TRE	D-Trehaloza
33	INU	Inulin
34	MLZ	D-Melecitoza
35	RAF	D-Rafinoza
36	AMD	Amidon
37	GLYG	Glikogen
38	XLT	Ksilitol
39	GEN	Gentiobioza
40	TUR	D-Turanoza
41	LYX	D-Liksoza
42	TAG	D-Tagatoza
43	DFRUC	D-Fukoza
44	LFRUC	L-Fukoza
45	DARL	D-Arabitol
46	LARL	L-Arabitol
47	GNT	Kalijev glukonat
48	2KG	Kalijev-2-keto-glukonat
49	5KG	Kalijev-5-keto-glukonat

Priprava kulture:

Posamezen izolat smo cepili v gojišče BAM z indikatorjem brom fenol modro. Predhodno smo izolat inkubirali 20 ur pri 45 °C ali 65 °C v gojišču AM.

Izvedba biokemijskih testov:

20-urno kulturo smo prenesli v ploščico API 50 CH in inkubirali pri 45 °C in 65 °C, 24 do 48 ur. Inkubacijo na dveh različnih temperaturah smo izvedli zato, ker so določeni izolati rasli le pri temperaturi 45 °C in drugi pri 65 °C. Rast bakterij in izkoriščanje substratov se kaže v spremembi barve, v našem primeru iz modre v rumeno in se označi kot pozitivno (+). Če bakterije ne izkoriščajo substrata in po inkubaciji ni spremembe barve, se rezultat označi kot negativno (-).

Identifikacija bakterijske vrste:

Rezultate, ki smo jih izrazili s pozitivno (+) in negativno (-) bi nato morali vnesti v podatkovno bazo, katera ima za posamezne vrste znane rezultate, in s pomočjo računalniškega programa bi določili vrsto bakterij. Ker podatkovna baza ni vsebovala podatkov za bakterije rodu *Alicyclobacillus*, smo podatke obdelali ročno glede na literaturne podatke. Nato smo podatke vnesli v preglednico (preglednica 23) in izračunali največjo verjetnost identifikacije posamezne vrste.

Največjo verjetnost identifikacije posamezne vrste smo v našem primeru določili na sledeči način: najprej smo v literaturi poiskali podatke o fermentaciji različnih spojin za določeno vrsto. Nato smo primerjali naše podatke z literaturnimi, katerih je bilo določeno število in tako smo lahko izračunali koliko naših rezultatov se je ujemalo z literaturnimi. Tako smo za vsak posamezen izolat posebej računali verjetnost za identifikacijo več različnih vrst. Upoštevali smo tudi da določene vrste ne rastejo pri določeni temperaturi v našem primeru pri 45 °C ali pri 65 °C. S pomočjo tega nam je bilo tudi lažje določiti tiste vrste, ki rastejo pri posameznih temperaturah.

Odstotek verjetnosti posamezne vrste smo preračunali po sledeči enačbi:

$$\text{odstotek verjetnosti vrste } x_3 (\%) = \frac{\text{število rezultatov, ki so enaki literaturnim podatkom } (x_1)}{\text{število literaturnih podatkov } (*)} \times 100 \quad \dots (1)$$

Podatke, ki smo jih dobili s testi API 50 CH, torej pozitivnih in negativnih rezultatov vseh 49 spojin, smo nato primerjali z literaturnimi podatki. Tako smo dobili število podatkov ki so se ujemali z literaturnimi (x_1). Te podatke (x_1) smo nato delili z vsemi danimi podatki iz literature (*) in tako dobili kot rezultat odstotek verjetnosti vrste (x_3).

4 REZULTATI

Čeprav so bile razvite različne metode za izolacijo bakterij rodu *Alicyclobacillus*, niso vse enako učinkovite. Vrsta gojišča, metoda nanosa in uporaba dodatnih postopkov, kot so na primer membranska filtracija, toplotna aktivacija spor, lahko igrajo pomembno vlogo pri učinkovitosti metode za izolacijo in odkrivanje bakterij *Alicyclobacillus* iz različnih živil.

Kot so številne študije pokazale je standardna metoda IFU, ki jo je razvila delovna skupina mikrobiologov Mednarodnega združenja proizvajalcev sadnih sokov (The Federation of Fruit Juice Producers) najprimernejša za izolacijo bakterij rodu *Alicyclobacillus* (Witthuhn in sod., 2011).

4.1 IZOLACIJA BAKTERIJ RODU *Alicyclobacillus*

Za izolacijo bakterij rodu *Alicyclobacillus* smo uporabili standardno metodo IFU in 10 različnih postopkov. Želeli smo ugotoviti, kateri postopek je najbolj primeren za izolacijo.

4.1.1 Makromorfološke značilnosti izolatov

Izolat, ki smo jih dobili po postopkih 1B – izolacija bakterij rodu *Alicyclobacillus* iz vzorcev sladkorja po standardni metodi IFU brez obogatitve (preglednica 13), 3B – izolacija bakterij rodu *Alicyclobacillus* iz vzorcev sladkorja po standardni metodi IFU z obogatitvijo (preglednica 12), 5A – izolacija bakterij rodu *Alicyclobacillus* iz vzorcev izvirske vode z okusom po standardni metodi IFU z obogatitvijo brez predhodne toplotne aktivacije (preglednica 14) in 5B – izolacija bakterij rodu *Alicyclobacillus* iz vzorcev izvirske vode z okusom po standardni metodi IFU z obogatitvijo z predhodno toplotno aktivacijo (preglednica 15), smo najprej določili makromorfološke značilnosti na trdnem gojišču BAT in sicer: barvo kolonij (krem, krem bela, krem rumena, krem prozorna, krem rjava, krem rumeno prozorna), velikost kolonij (od 0,5 mm pa vse do 4 mm), obliko roba kolonij (kolonije z ravnim robom, kolonije z nazobčanim robom), izbočenost ali ploščatost kolonij in odsev kolonij (svetleč ali ne svetleč, rahlo svetleč).

Preglednica 12: Makromorfološke značilnosti izolatov izoliranih iz vzorcev sladkorja s standardno metodo IFU (2004) z obogatitvijo (postopek 3B)

OZNAKA IZOLATA	LASTNOSTI KOLONIJE				
	BARVA	VELIKOST	ROB	IZBOČENOST	ODSEV

		(mm)			
1a	krem bela	od 1,5 do 2	raven	izbokel	svetleč
1b	krem	od 0,5 do 1,5	raven	ploščata	rahlo svetleč
2a	bel rob, sredina rumena	od 1,5 do 4	raven	ploščata	svetleč
2b	krem	od 2 do 4	nazobčan	ploščata	svetleč
3a	krem	do 3	nazobčan	ploščata	svetleč
3b	krem bela	do 3	raven	dvignjen	svetleč
5a	krem bela	nedoločljiva	raven	ploščata	svetleč
5b	prozorna krem	od 1 do 3	raven	dvignjen	svetleč
6a	krem bela	od 0,5 do 1,5	raven	ploščata	svetleč
6b	krem	od 1 do 3	nazobčan	dvignjen	svetleč
7a	krem	do 4	nazobčan	ploščata	svetleč
7b	krem	do 0,5	nazobčan	izbokel	svetleč
8a	krem	do 2	nazobčan	ploščata	svetleč
8b	krem	do 3	raven	ploščata	svetleč
10a	krem	od 1,5 do 4	raven	ploščata	svetleč
12b	krem rumena	od 0,5 do 3	nazobčan	izbokel	svetleč

Oznaka izolata je številka izolata oziroma številka vzorca npr.: številka 1 je vzorec 1. Ker pa smo vsak vzorec analizirali v paralelkah pomeni, da smo vzorcu dodali tudi oznake a in b. Tako smo pri dobljenih izolatih iz vzorcev sladkorja, ki smo jih izolirali s pomočjo standardne metode IFU z obogatitvijo dodali številki vzorca a za vzorec paralelke 1 in b vzorec druge paralelke.

Preglednica 13: Makromorfološke značilnosti izolatov izoliranih iz vzorcev sladkorja po standardni metodi IFU (2004) brez obogatitve (postopek 1B)

OZNAKA	LASTNOSTI KOLONIJE
--------	--------------------

IZOLATA	BARVA	VELIKOST (mm)	ROB	IZBOČENOST	ODSEV
3d	krem bela	od 1,5 do 3	raven	izbokel	svetleč
4c	krem rumena	od 0,5 do 2	nazobčan	ploščata	ne svetleč
5c	krem prozorna	od 1 do 3	nazobčan	izbokel	svetleč
5d	krem	od 2 do 4	nazobčan	ploščata	svetleč
6c	krem rumena	od 0,5 do 1	raven	ploščata	rahlo svetleč
6d	krem bela	od 3 do 4	raven	izbokel	ne svetleč
7c	krem	od 1 do 2,5	nazobčan	izbokel	svetleč
7d	krem prozorna	od 2 do 3	Nazobčan	ploščata	svetleč
9c	krem rumena	od 0,5 do 2	raven	ploščata	svetleč
9d	krem bela	od 2 do 4	raven	ploščata	ne svetleč
15c	krem prozorna	od 0,5 do 1	nazobčan	izbokel	rahlo svetleč

Pri izolatih iz vzorcev sladkorja, ki smo jih izolirali s pomočjo standardne metode IFU brez obogatitve (večinoma smo dobili mešane kulture) smo dodali številki vzorca oznako c kot paralelka 1 in oznako d kot druga paralelka.

Preglednica 14: Makromorfološke značilnosti izolatov izoliranih iz vzorcev izvirske vode z okusom po standardni metodi IFU (2004) z obogatitvijo brez predhodnega segrevanja (po postopku 5A)

OZNAKA IZOLATA	LASTNOSTI KOLONIJE				
	BARVA	velikost (mm)	ROB	IZBOČENOST	ODSEV
1e	rumeno krem prozorne	do 0,5	raven	izbokel	svetleč
2e	krem bela	od 1 do 3	nazobčan	ploščata	ne svetleče
3e	krem rjava	od 0,5 do 1	nazobčan	izbokel	svetleč
4e	krem rumena	od 0,5 do 4	nazobčan	ploščata	svetleč
5e	krem bela	od 2 do 3	nazobčan	izbokel	svetleč

Pri izolatih iz vzorcev izvirske vode z okusom, smo dodali številkam vzorcev oznaki e in f. Oznaka e pomeni da vzorec ni bil predhodno segret, f pa da smo vzorce predhodno segreti.

Preglednica 15: Makromorfološke značilnosti izolatov izoliranih iz vzorcev izvirske vode z okusom s standardno metodo IFU (2004) z obogatitvijo s predhodnim segrevanjem (po postopku 5B)

OZNAKA	LASTNOSTI KOLONIJE
--------	--------------------

IZOLATA	BARVA	VELIKOST (mm)	ROB	IZBOČENOST	ODSEV
1f	krem prozorna	do 2	nazobčan	ploščata	svetleč
2f	krem rumena	do 1	raven	ploščata	svetleč
3f	krem rumena	od 0,5 do 1,5	raven	izbokel	svetleč
4f	krem rumeno prozorna	do 0,5	raven	ploščata	rahlo svetleč
5f	krem rumeno prozorna	do 1	raven	izbokel	svetleč

Makromorfološke lastnosti izolatov iz preglednic 12-15 so značilne za bakterije rodu *Alicyclobacillus*, saj je barva kolonij krem bela ali krem rumena. Velikost kolonij se giblje med 0,5 do 4 mm, kar se tudi ujema z literaturnimi podatki (preglednica 1). Rob kolonij je večinoma raven, kar se prav tako ujema z literaturnimi podatki.

4.1.2 Število izolatov dobljenih po različnih postopkih izolacije

Iz 20 vzorcev sladkorja smo dobili 11 izolatov izoliranih s standardno metodo IFU brez obogatitve (po postopku 1B) in 16 izolatov izoliranih s standardno metodo IFU z obogatitvijo (po postopku 3B). Iz vzorcev izvirske vode z okusom, smo dobili 5 izolatov izoliranih s standardno metodo IFU z obogatitvijo brez predhodnega segrevanja (po postopku 5A) in prav tako 5 izolatov izoliranih s standardno metodo IFU z obogatitvijo z predhodnim segrevanjem (po postopku 5B). Pri postopkih 1A, 2A, 2B, 3A, 4A in 4B nismo dobili izolatov (preglednica 16 in preglednica 17).

Preglednica 16: Število izolatov bakterij rodu *Alicyclobacillus* dobljenih po različnih postopkih izolacije iz vzorcev sladkorja

VZOREC	POSTOPEK
--------	----------

Živilo	Številka vzorca	Oznaka izolata	1A	1B	2A	2B	3A	3B
Sladkor	1	1a						✓
		1b						✓
	2	2a						✓
		2b						✓
	3	3a						✓
		3b						✓
		3d		✓				
	4	4c		✓				
	5	5a						✓
		5b						✓
		5c		✓				
		5d		✓				
	6	6a						✓
		6b						✓
		6c		✓				
		6d		✓				
	7	7a						✓
		7b						✓
		7c		✓				
		7d		✓				
	8	8a						✓
		8b						✓
	9	9c		✓				
		9d		✓				
	10	10a						✓
	11	/						
	12	12b						✓
	13	/						
	14	/						
	15	15c		✓				
	16	/						
	17	/						
	18	/						
	19	/						
	20	/						
			0	11	0	0	0	16

Legenda: 1A: 100 g vzorca, matična raztopina, toplotna aktivacija spor, izolacija na gojišču BAT, identifikacija; 1B: 100 g vzorca, matična raztopina, toplotna aktivacija spor, membranska filtracija 500 ml, izolacija na gojišču BAT, identifikacija; 2A: 10 g vzorca, matična raztopina, toplotna aktivacija spor, izolacija na gojišču BAT, identifikacija; 2B: 10 g vzorca, matična raztopina, toplotna aktivacija spor, membranska filtracija, izolacija na gojišču BAT, identifikacija; 3A: 10 g vzorca, obogatitev v gojišču BAT, izolacija na gojišču BAT, identifikacija; 3B: 10 g vzorca, obogatitev v gojišču BAT, membranska filtracija, izolacija na gojišču BAT, identifikacija

Preglednica 17: Število izolatov bakterij rodu *Alicyclobacillus* dobljenih po različnih postopkih izolacije iz vzorcev izvirske vode z okusom

VZOREC			POSTOPEK			
Izvirska voda z okusom	Številka vzorca	Oznaka izolata	4A	4B	5A	5B
	1	1e			✓	
		1f				✓
	2	2e			✓	
		2f				✓
	3	3e			✓	
		3f				✓
	4	4e			✓	
		4f				✓
	5	5e			✓	
		5f				✓
			0	0	5	5

Legenda: 4A: 500 ml vzorca, membranska filtracija 500 ml, izolacija na gojišču BAT, identifikacija; 4B: 500 ml vzorca, toplotna aktivacija spor, membranska filtracija 500 ml, izolacija na gojišču BAT, identifikacija; 5A: 500 ml vzorca, membranska filtracija 500 ml, obogatitev v gojišču BAT, izolacija (0,1 ml) na gojišču BAT, identifikacija; 5B: 500 ml vzorca, toplotna aktivacija spor, membranska filtracija 500 ml, obogatitev v gojišču BAT, izolacija (0,1 ml) na gojišču BAT, identifikacija

4.2 IDENTIFIKACIJA IZOLATOV

Identifikacijo bakterij rodu *Alicyclobacillus* smo izvedli z analizo morfoloških značilnosti celic in kolonij, s proučevanjem rasti v različnih razmerah (temperatura in pH) in z biokemijskimi testi.

4.2.1 Mikromorfološke lastnosti izolatov

Za identifikacijo izolatov smo določili mikromorfološke lastnosti in zato smo uporabili barvanje po Gram-u in barvanje po Schaeffer – Fulton-u. Mikromorfološke značilnost bakterij rodu *Alicyclobacillus* so grampozitivne palčke enakih velikosti, ki imajo endospore (priloga A-1, priloga A-2). Z barvanjem celic po Gram-u smo določili obliko in velikost celic. Z barvanjem po Schaeffer – Fulton-u smo določili spore (priloga B-1, priloga B-2).

Preglednica 18: Mikromorfološke lastnosti izolatov izoliranih iz vzorcev sladkorja s standardno metodo IFU (2004) z obogatitvijo (po postopku 3B)

OZNAKA IZOLATA	ČISTA KULTURA	OBLIKA CELIC	VELIKOST	REAKCIJA PO GRAMU	SPORE
1a	+	palčke	Enaka velikost	+	+
1b	+	palčke	Enaka velikost	+	+
2a	+	palčke	Enaka velikost	+	+
2b	+	palčke	Enaka velikost	+	+
3a	+	palčke	Enaka velikost	+	+
3b	+	palčke	Enaka velikost	+	+
5a	+	palčke	Enaka velikost	+	+
5b	+	palčke	Enaka velikost	+	+
6a	+	palčke	Enaka velikost	+	+
6b	+	palčke	Enaka velikost	+	+
7a	+	palčke	Enaka velikost	+	+
7b	+	palčke	Enaka velikost	+	+
8a	+	palčke	Enaka velikost	+	+
8b	+	palčke	Enaka velikost	+	+
10a	+	palčke	Enaka velikost	+	+
12b	+	palčke	Enaka velikost	+	+

V preglednici 18 so prikazane mikromorfološke lastnosti izolatov izoliranih iz vzorcev sladkorja s standardno metodo IFU z obogatitvijo (po postopku 3B). Lastnosti izolatov iz preglednice 18 se ujemajo z literaturnimi podatki, saj so grampozitivni, imajo spore, so enake velikosti in oblika celice je palčka.

Preglednica 19: Mikromorfološke lastnosti izolatov izoliranih iz vzorcev sladkorja s standardno metodo IFU (2004) brez obogatitve (po postopku 1B).

OZNAKA IZOLATA	ČISTA KULTURA	OBLIKA CELIC	VELIKOST	REAKCIJA PO GRAMU	SPORE
3d	Mešana	Palčke in kifeljčki	Različna velikost	+	+
4c	mešana	Palčke	Različna velikost	+	+
5c	Mešana	Palčke in koki	Različna velikost	+	+
5d	Mešana	Palčke in koki	Različna velikost	+	+
6c	Mešana	Palčke in kifeljčki	Različna velikost	+	+
6d	Mašana	Palčke	Različna velikost	+	+
7c	Mešana	Palčke	Različna velikost	+	+
7d	Mešana	Palčke	Različna velikost	+	+
9c	Mešana	Koki	Različna velikost	+	+
9d	Mešana	Palčke	Različna velikost	+	+
15c	Mešana	Palčke in koki	Različna velikost	+	+

Preglednica 19 prikazuje rezultate mikromorfoloških lastnosti izolatov izoliranih iz vzorcev sladkorja s standardno metodo IFU brez obogatitve (po postopku 1B). Lastnosti izolatov v preglednici 19 se delno ujemajo z literaturnimi podatki, saj je oblika celic različna, palčke in koki, čeprav so grampozitivni in imajo spore. Torej smo sklepali da so to mešane kulture.

Preglednica 20: Mikromorfološke lastnosti izolatov izoliranih iz vzorcev izvirske vode z okusom s standardno metodo IFU (2004) z obogatitvijo brez predhodnega segrevanja (po postopku 5A).

OZNAKA IZOLATA	ČISTA KULTURA	OBLIKA CELIC	VELIKOST	GRAM	SPORE
1e	+	palčke	Enaka velikost	+	+
2e	+	palčke	Enaka velikost	+	+
3e	+	palčke	Enaka velikost	+	+
4e	+	palčke	Enaka velikost	+	+
5e	+	palčke	Enaka velikost	+	+

Preglednica 20 prikazuje mikromorfološke lastnosti izolatov izoliranih iz vzorcev izvirske vode z okusom s standardno metodo IFU z obogatitvijo brez predhodnega segrevanja (po

postopku 5A). Lastnosti izolatov iz preglednice 20 se ujemajo z literaturnimi podatki, saj so grampozitivne palčke, imajo spore in po velikosti so enake.

Preglednica 21: Mikromorfološke lastnosti izolatov izoliranih iz vzorcev izvirske vode z okusom s standardno metodo IFU (2004) z obogatitvijo s predhodnim segrevanjem (po postopku 5B).

OZNAKA IZOLATA	ČISTA KULTURA	OBLIKA CELIC	VELIKOST	GRAM	SPORE
1f	+	palčke	Enaka velikost	+	+
2f	+	palčke	Enaka velikost	+	+
3f	+	palčke	Enaka velikost	+	+
4f	+	palčke	Enaka velikost	+	+
5f	+	palčke	Enaka velikost	+	+

Preglednica 21 prikazuje mikromorfološke lastnosti izolatov izoliranih iz vzorcev izvirske vode z okusom s standardno metodo IFU z obogatitvijo s predhodnim segrevanjem (po postopku 5B). Lastnosti izolatov iz preglednice 21 se prav tako ujemajo z literaturnimi podatki, saj so izolati grampozitivne sporogene palčke enake velikosti.

4.2.2 Rast izolatov pri različnih temperaturah

Z metodo rasti pri različnih temperaturah, smo želeli določiti bakterije vrste *A. acidocaldarius*, saj metoda temelji na dejstvu, da imajo bakterije vrste *A. acidoterrestris* v primerjavi z drugimi vrstami istega rodu nižjo optimalno temperaturo rasti. Tako smo v 24 urah lahko določili vrste *A. acidocaldarius* in *A. acidoterrestris* (vključno z vrsto *A. acidophilus* in *A. hesperidum*).

Preglednica 22: Identifikacija bakterij rodu *Alicyclobacillus* z določitvijo rasti na gojišču BAT pri različnih temperaturah

OZNAKA IZOLATA	RAST PRI 45 °C	RAST PRI 65 °C	VRSTA
1a	raste	ne raste	<i>A. acidoterrestris</i>
1b	raste	ne raste	<i>A. acidoterrestris</i>
2a	raste	ne raste	<i>A. acidoterrestris</i>
2b	raste	ne raste	<i>A. acidoterrestris</i>
3a	raste	ne raste	<i>A. acidoterrestris</i>
3b	raste	ne raste	<i>A. acidoterrestris</i>
5a	raste	ne raste	<i>A. acidoterrestris</i>
5b	raste	ne raste	<i>A. acidoterrestris</i>
6a	raste	ne raste	<i>A. acidoterrestris</i>
6b	raste	ne raste	<i>A. acidoterrestris</i>
7a	raste	ne raste	<i>A. acidoterrestris</i>
7b	raste	ne raste	<i>A. acidoterrestris</i>
8a	raste	ne raste	<i>A. acidoterrestris</i>
8b	raste	ne raste	<i>A. acidoterrestris</i>
10a	raste	ne raste	<i>A. acidoterrestris</i>
12b	raste	ne raste	<i>A. acidoterrestris</i>
3d	raste	ne raste	<i>A. acidoterrestris</i>
4c	raste	ne raste	<i>A. acidoterrestris</i>
5c	raste	ne raste	<i>A. acidoterrestris</i>
5d	raste	ne raste	<i>A. acidoterrestris</i>
6c	raste	ne raste	<i>A. acidoterrestris</i>
6d	raste	ne raste	<i>A. acidoterrestris</i>
7c	raste	ne raste	<i>A. acidoterrestris</i>
7d	raste	ne raste	<i>A. acidoterrestris</i>
9c	raste	ne raste	<i>A. acidoterrestris</i>
9d	raste	ne raste	<i>A. acidoterrestris</i>
15c	raste	ne raste	<i>A. acidoterrestris</i>
1e	raste	ne raste	<i>A. acidoterrestris</i>
1f	raste	ne raste	<i>A. acidoterrestris</i>
2e	ne raste	raste	<i>A. acidocaldarius</i>
2f	raste	ne raste	<i>A. acidoterrestris</i>
3e	raste	raste	<i>A. acidoterrestris</i> / <i>A. acidocaldarius</i> *
3f	raste	raste	<i>A. acidoterrestris</i> / <i>A. acidocaldarius</i> *
4e	raste	ne raste	<i>A. acidoterrestris</i>
4f	raste	raste	<i>A. acidoterrestris</i> / <i>A. acidocaldarius</i> *
5e	ne raste	raste	<i>A. acidocaldarius</i>
5f	raste	raste	<i>A. acidoterrestris</i> / <i>A. acidocaldarius</i> *

* mešana kultura

V preglednici 22 so zbrani okvirni rezultati identifikacije naših izolatov. Zaradi rasti izolatov pri različnih temperaturah smo lahko okvirno določili vrsto. Kar pa še ne pomeni,

da smo določili vrsto saj za vrste *A. acidiphilus*, *A. cycloheptanicus*, *A. hesperidum* veljajo podobne značilnosti kot za vrsto *A. acidoterrestris*.

4.2.3 Biokemijski testi

Rezultate biokemijskih testov, ki smo jih za posamezen izolat dobili s testi API 50 CH (priloga C-1 in priloga C-2) po 24 in 48 urah inkubacije pri 45 °C in 65 °C smo pregledali in preračunali v odstotek verjetnosti posamezne vrste (preglednica 23). Z rdečim obarvanjem pa smo označili največjo verjetnost za identifikacijo posamezne vrste v rodu *Alicyclobacillus*.

Slika 10 prikazuje test API 50 CH, katerega smo uporabili za identifikacijo vsakega izolata. Spremembo barve gojišča iz modre v rumeno, smo smatrali kot pozitiven rezultat in je to rezultat fermentacije določenega substrata. Prav tako se je sprememba barve iz modre v črno, tuba številka 25 (Eskulin železov citrat) smatrala za pozitiven rezultat.



Slika 10: Primer testa API 50 CH z izolatom 5f (ŽMJ 196).

Preglednica 23: Identifikacija izolatov bakterij rodu *Alicyclobacillus*

	A. <i>acidocaldarius</i> (49)*			A. <i>herbarius</i> (38)*			A. <i>vulcanalis</i> (46)*			A. <i>sendaiensis</i> (45)*			A. <i>acidoterrestris</i> (49)*			A. <i>cycloheptanicus</i> (41)*			A. <i>hesperidum</i> (48)*			A. <i>acidiphilus</i> (40)*			A. <i>pomorum</i> (35)*			A. <i>mali</i> (20)*		
	x ₁	x ₂	x ₃	x ₁	x ₂	x ₃	x ₁	x ₂	x ₃	x ₁	x ₂	x ₃	x ₁	x ₂	x ₃	x ₁	x ₂	x ₃	x ₁	x ₂	x ₃	x ₁	x ₂	x ₃	x ₁	x ₂	x ₃	x ₁	x ₂	x ₃
1a	36	13	73,5	21	17	55,3	32	14	69,6	31	14	68,9	33	16	67,4	29	12	70,7	34	14	70,8	22	18	55,0	19	16	54,3	13	7	65,0
1b	28	21	57,1	18	20	47,4	27	19	58,7	25	20	55,6	25	24	51,0	27	14	65,9	30	18	62,5	17	23	42,5	22	13	62,9	13	7	65,0
2a	37	12	75,5	22	16	57,9	33	13	71,7	33	12	73,3	32	17	65,3	28	13	68,3	33	15	68,8	25	15	62,5	20	15	57,1	12	8	60,0
2b	36	13	73,5	22	16	57,9	32	14	69,6	34	11	75,5	34	15	69,4	24	17	58,5	35	13	72,9	26	14	65,0	20	15	57,1	12	8	60,0
3a	37	12	75,5	22	16	57,9	33	13	71,7	33	12	73,3	32	17	65,3	27	14	65,9	33	15	68,8	25	15	62,5	18	17	51,4	13	7	65,0
3b	35	14	71,4	22	16	57,9	31	15	67,4	32	13	71,1	34	15	69,4	27	14	65,9	35	13	72,9	24	16	60,0	20	15	57,1	14	6	70,0
5a	36	13	73,5	22	16	57,9	33	13	71,7	33	12	73,3	32	17	65,3	27	14	65,9	35	13	72,9	23	17	57,5	20	15	57,1	13	7	65,0
5b	35	14	71,4	22	16	57,9	31	15	67,4	32	13	71,1	34	15	69,4	27	14	65,9	35	13	72,9	23	17	57,5	20	15	57,1	14	6	70,0
6a	31	18	63,3	18	20	47,4	29	17	63,0	29	16	64,4	28	21	57,1	24	17	58,5	31	17	64,6	23	17	57,5	21	14	60,0	15	5	75,0
6b	33	16	67,4	19	19	50,0	30	16	65,2	31	14	68,9	34	15	69,4	27	14	65,9	36	12	75,0	24	16	60,0	19	16	54,3	13	7	65,0
7a	35	14	71,4	21	17	55,3	33	13	71,7	33	12	73,3	33	16	67,4	25	16	60,9	35	13	72,9	30	10	75,0	22	13	62,9	12	8	60,0
7b	35	14	71,4	24	14	63,2	31	15	67,4	32	13	71,1	34	15	69,4	25	16	60,9	33	15	68,8	23	17	57,5	22	13	62,9	13	7	65,0
8a	29	20	59,2	16	22	42,1	25	21	54,3	25	20	55,6	27	22	55,1	28	13	68,3	30	18	62,5	19	21	47,5	20	15	57,1	13	7	65,0
8b	36	14	71,4	20	18	52,6	31	15	67,4	31	14	68,9	30	19	61,2	29	12	70,7	33	15	68,8	23	17	57,5	19	16	54,3	13	7	65,0
1e	38	11	77,6	24	14	63,2	32	14	69,6	32	13	71,1	41	8	83,7	20	21	48,8	35	13	72,9	30	10	75,0	20	15	57,1	12	8	60,0
1f	33	16	67,4	22	16	57,9	32	14	69,6	29	16	64,4	36	13	73,5	23	18	56,1	30	18	62,5	24	16	60,0	19	16	54,3	13	7	65,0
2e	34	15	69,4	19	19	50,0	30	16	65,2	29	16	64,4	29	20	59,2	28	13	68,3	32	16	66,7	19	21	47,5	24	11	68,6	15	5	75,0
2f	30	19	61,2	19	19	50,0	30	16	65,2	27	18	60,0	33	16	67,4	26	15	63,4	31	17	64,6	22	18	55,0	19	16	54,3	13	7	65,0
3e	35	14	71,4	28	10	73,7	33	13	71,7	35	10	77,8	32	17	65,3	16	25	39,0	32	16	66,7	27	13	67,5	21	14	60,0	12	8	60,0
3f	32	17	65,3	23	15	60,5	31	15	67,4	28	17	62,2	36	13	73,5	23	18	56,1	29	19	60,4	23	17	57,5	18	17	51,4	12	8	60,0
4e	34	15	69,4	21	17	55,3	32	14	69,6	30	15	66,7	39	10	79,6	26	15	63,4	32	16	66,7	26	14	65,0	17	18	48,6	12	8	60,0
4f	31	18	63,3	20	18	52,6	29	17	63,0	27	18	60,0	37	12	75,5	27	14	65,9	31	17	64,6	23	17	57,4	16	19	45,7	11	9	55,0
5e	35	14	71,4	27	11	71,1	33	13	71,7	35	10	77,8	31	18	63,3	20	21	48,8	32	16	66,7	29	11	72,5	24	11	68,6	13	7	65,0
5f	32	17	65,3	22	16	57,9	29	17	63,0	29	16	64,4	37	12	75,5	24	17	58,5	31	17	64,6	24	16	60,0	16	19	45,7	11	9	55,0

Legenda: * = število podatkov iz literature za test API 50 CH, x₁= število rezultatov, ki so enaki literaturnim podatkom; x₃= % verjetnosti vrste; številka obarvana rdeče = izolat z največjim odstotkom ujemanja rezultatov za posamezno vrsto; x₂ – je število rezultatov, ki se ne ujemajo z literaturnimi podatki

4.3 IDENTIFICIRANI SEVI BAKTERIJ RODU *Alicyclobacillus* DOBLJENI PO RAZLIČNIH POSTOPKIH IZOLACIJE

Iz 20 vzorcev sladkorja smo dobili 11 izolatov bakterij rodu *Alicyclobacillus* izoliranih s standardno metodo IFU brez obogatitve (po postopku 1B: 100 g vzorca, matična raztopina, toplotna aktivacija spor, membranska filtracija 500 ml, izolacija na gojišču BAT, identifikacija), ampak identifikacija ni bila mogoča, saj so bili vsi izolati mešane kulture. Iz istih 20 vzorcev sladkorja smo dobili 16 izolatov izoliranih s standardno metodo IFU z obogatitvijo po postopku 3B (10 g vzorca, obogatitev v gojišču BAT, membranska filtracija, izolacija na gojišču BAT, identifikacija), od tega smo identificirali 14 izolatov (preglednica 24).

Preglednica 24: Število izolatov in identificirani sevi bakterij rodu *Alicyclobacillus* iz 20 vzorcev sladkorja dobljenih po različnih postopkih izolacije

ŠTEVILKA VZORCA	OZNAKA IZOLATA	IZOLATI DOBLJENI PO POSTOPKU		IDENTIFICIRANI SEVI
		1B	3B	
1	1a		✓	✓ <i>A. acidocaldarius</i>
	1b		✓	✓ <i>A. cycloheptanicus</i>
2	2a		✓	✓ <i>A. acidocaldarius</i>
	2b		✓	✓ <i>A. sendaiensis</i>
3	3a		✓	✓ <i>A. acidocaldarius</i>
	3b		✓	✓ <i>A. hesperidum</i>
	3d	✓		/
4	4c	✓		/
5	5a		✓	✓ <i>A. acidocaldarius</i>
	5b		✓	✓ <i>A. hesperidum</i>
	5c	✓		/
	5d	✓		/
6	6a		✓	✓ <i>A. hesperidum</i>
	6b		✓	✓ <i>A. hesperidum</i>
	6c	✓		/
	6d	✓		/
7	7a		✓	✓ <i>A. acidiphilus</i>
	7b		✓	✓ <i>A. acidocaldarius</i>
	7c	✓		/
	7d	✓		/
8	8a		✓	✓ <i>A. cycloheptanicus</i>
	8b		✓	✓ <i>A. acidocaldarius</i>
9	9c	✓		/
	9d	✓		/
10	10a		✓	/
12	12b		✓	/
15	15c	✓		/
	Σ	11	16	14

Legenda: 1B: 100 g vzorca, matična raztopina, toplotna aktivacija spor, membranska filtracija 500 ml, izolacija na gojišču BAT, identifikacija; 3B: 10 g vzorca, obogatitev v gojišču BAT, membranska filtracija, izolacija na gojišču BAT, identifikacija; / izolat ni bil identificiran

Pri postopkih 1A (100 g vzorca, matična raztopina, toplotna aktivacija spor, izolacija na gojišču BAT, identifikacija), 2A (10 g vzorca, matična raztopina, toplotna aktivacija spor,

izolacija na gojišču BAT, identifikacija), 2B (10 g vzorca, matična raztopina, toplotna aktivacija spor, membranska filtracija, izolacija na gojišču BAT, identifikacija) in 3A (10 g vzorca, obogatitev v gojišču BAT, izolacija na gojišču BAT, identifikacija) nismo dobili izolatov.

Iz 5 vzorcev izvirske vode z okusom smo dobili 5 izolatov izoliranih s standardno metodo IFU po postopku 5A (500 ml vzorca, membranska filtracija 500 ml, obogatitev v gojišču BAT, izolacija (0,1 ml) na gojišču BAT, identifikacija), vse izolate smo tudi identificirali. Iz istih vzorcev izvirske vode z okusom smo 5 izolatov izolirali s standardno metodo IFU po postopku 5B (500 ml vzorca, toplotna aktivacija spor, membranska filtracija 500 ml, obogatitev v gojišču BAT, izolacija (0,1 ml) na gojišču BAT, identifikacija) in jih tudi identificirali (preglednica 25).

Pri postopkih 4A (500 ml vzorca, membranska filtracija 500 ml, izolacija na gojišču BAT, identifikacija) in 4B (500 ml vzorca, toplotna aktivacija spor, membranska filtracija 500 ml, izolacija na gojišču BAT, identifikacija) nismo dobili izolatov.

Preglednica 25: Število izolatov in identificirani sevi bakterij rodu *Alicyclobacillus* iz 5 vzorcev izvirske vode z okusom dobljenih po različnih postopkih izolacije

ŠTEVILKA VZORCA	OZNAKA IZOLATA	IZOLATI DOBLJENI PO POSTOPKU		IDENTIFICIRANI SEVI	
		5A	5B		
1	1e	✓		✓	<i>A. acidoterrestris</i>
	1f		✓	✓	<i>A. acidoterrestris</i>
2	2e	✓		✓	<i>A. mali</i>
	2f		✓	✓	<i>A. acidoterrestris</i>
3	3e	✓		✓	<i>A. sendaiensis</i>
	3f		✓	✓	<i>A. acidoterrestris</i>
4	4e	✓		✓	<i>A. acidoterrestris</i>
	4f		✓	✓	<i>A. acidoterrestris</i>
5	5e	✓		✓	<i>A. sendaiensis</i>
	5f		✓	✓	<i>A. acidoterrestris</i>
	Σ	5	5	10	

Legenda: 5A: 500 ml vzorca, membranska filtracija 500 ml, obogatitev v gojišču BAT, izolacija (0,1 ml) na gojišču BAT, identifikacija; 5B: 500 ml vzorca, toplotna aktivacija spor, membranska filtracija 500 ml, obogatitev v gojišču BAT, izolacija (0,1 ml) na gojišču BAT, identifikacija

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Namen naloge je bila izolacija in identifikacija bakterij rodu *Alicyclobacillus* iz naravno kontaminiranih vzorcev sladkorja in vzorcev izvirske vode z okusom. Bakterije rodu *Alicyclobacillus* so izolirali iz termalnih kislih okolij, iz različnih vrst tal, zeliščnega čaja, ledenega čaja in njegovih sestavin, iz koncentriranih sadnih sokov, tekočega sladkorja, iz vode ki se dodaja sokovom in s površin sadja (Nicolaus in sod., 1998; Groenewald in sod., 2008). Na podlagi raziskav smo se odločili, da bomo pri našem delu za izolacijo bakterij *Alicyclobacillus* uporabili vzorce sladkorja in izvirske vode z okusom. Za izolacijo smo uporabili standardno metodo IFU in 10 različnih postopkov.

5.1.1 Vpliv velikosti vzorca in toplotne aktivacije spor pri standardni metodi IFU

Za izolacijo in štetje bakterij *Alicyclobacillus* je delovna skupina mikrobiologov Mednarodnega združenja proizvajalcev sadnih sokov (The Federation of Fruit Juice Producers) razvila standardno metodo izolacije. Poimenovali so jo standardna metoda IFU, vključuje pa uporabo gojišča *Bacillus acidocaldarius* (BAM), imenovano tudi *Bacillus acidocaldarius* termofilni medij (Murray in sod., 2007).

Standardna metoda IFU predpisuje reprezentativen vzorec 10 g (minimalna količina), ki se ga toplotno obdela s toplotnim šokom pri 80 °C za 10 minut. Enak učinek toplotnega šoka dosežemo s segrevanjem pri 60 °C za 1 uro. Postopku sledi direktna nacepitev na gojišče ali obogatitev. Pri našem eksperimentalnem delu smo vzporedno iz vzorcev sladkorja uporabili 10 g vzorca (postopek 2A) in 100 g vzorca (postopek 1A). V obeh primerih smo opravili toplotno aktivacijo spor in nato izolacijo na gojišču BAT. Ne glede na velikost vzorca pri postopkih 1A in 2A nismo dobili izolatov bakterij rodu *Alicyclobacillus* (preglednica 16).

Ker bakterije rodu *Alicyclobacillus* oblikujejo endospore, se pogosto uporablja toplotna aktivacija (šok), da se aktivirajo neaktivne mirujoče spore in da se spodbudi kalivost. Tako se mora mirujoče endospore aktivirati in spodbuditi, da skalijo v vegetativne celice. Za aktivacijo endospore jo moramo izpostaviti toplotnemu šoku. Koncentracija celic določena s klasično mikrobiološko preiskavo je ponavadi višja po toplotni aktivaciji, če so mikrobi prisotni v obliki spor. Splittstoesser in sodelavci (1998) so ugotovili, da aktivacija pri 60 °C za 30 minut podvoji število celic bakterij vrste *A. acidoterrestris* določenih v vzorcu, kar kaže na to, da je okoli 50 % celic bilo prisotnih v obliki endospor. Zato smo tudi pri našem eksperimentalnem delu pri vseh postopkih uporabljenih za preiskave sladkorja uporabili aktivacijo endospor s toplotnim šokom - 60 °C za 60 minut. Za aktiviranje endospor so bili predlagani različni postopki toplotne aktivacije (Smit in sod., 2011). Splittstoesser in sodelavci (1998) so predlagali 60 °C za 30 minut, Eiroa in sodelavci (1999) so predlagali 70 °C za 10 minut. Walls in Chuyate (1998) sta predlagala 80 °C za 10 minut in Terano in sodelavci pa so predlagali 80 °C za 20 minut. Med tem ko so Eiroa in sodelavci (1999) ugotovili, da je toplotna aktivacija spor pri 70 °C za 10 minut, boljša v primerjavi z toplotno aktivacijo pri 60 °C za 60 minut, 60 °C za 30 minut, 80 °C za 5 minut, 80 °C za 10 minut, 80 °C za 30 minut in 100 °C za 5 minut. Vendar pa so razlike med posameznimi postopki toplotne aktivacije zelo majhne. Terano in sodelavci (2005) so ugotovili, da je izpostavljenost

toplotnemu šoku pripomogla k kaljenju endospor. Čeprav so drugi avtorji poročali, da lahko endospore kalijo brez toplotne obdelave (Pettipher in sod., 1997).

Vpliva toplotne aktivacije spor iz naših rezultatov ne moremo potrditi, saj lahko vidimo iz rezultatov identificiranih sevov bakterij rodu *Alicyclobacillus* pri vzorcih izvirske vode z okusom, da po postopku 4A (brez toplotne aktivacije spor) in postopek 4B (s toplotno aktivacijo spor) nismo dobili nobenega izolata bakterij rodu *Alicyclobacillus* (preglednica 17), medtem, ko smo pri postopkih 5A (brez toplotne aktivacije spor) in 5B (s toplotno aktivacijo spor) dobili po 5 izolatov ne glede na izvedeno ali ne izvedeno toplotno aktivacijo spor (preglednica 17). Standardna metoda IFU (2004) predpisuje za končne izdelke inkubacijo v njihovi prvotni embalaži pri 45 °C za 7 dni. Nato se vzorec direktno cepi (0,1 ml) na gojišče BAT in se inkubira pri 45 °C za 3 do 5 dni. Če je potrebno, se lahko vzorce podvrže obogatitveni metodi pri 45 °C za 7 dni. Metoda za analizo vzorcev vode (Eguchi in sod., 1999) predpisuje razredčen vzorec vode 10 ml, ki se toplotno aktivira pri 80 °C za 10 minut in nato filtrira skozi filter (velikost por 0,45 µm) in filter se nato aseptično prenese na gojišče BAT, ter se vse skupaj inkubira pri 50 °C za 4 dni.

5.1.2 Vpliv vrste selektivnega gojišča pri standardni metodi IFU

Za koncentrate sokov in drugih surovin standardna metoda IFU (IFU, 2004), priporoča uporabo gojišča BAT s pH 4,0, gojišče YSG s pH 3,7 ali gojišče K-agar s pH 3,7 ter inkubacijo pri 45 °C za 2 do 5 dni. Gojišče BAT in YSG omogočata rast vseh trenutno znanih vrst bakterij *Alicyclobacillus*, medtem ko gojišče K-agar pa pretežno omogoča rast bakterij vrste *A. acidoterrestris* (Steyn in sod., 2011). Pri našem delu smo uporabili gojišče BAT, ker podpira rast vseh vrst bakterij rodu *Alicyclobacillus*.

5.1.3 Vpliv membranske filtracije vzorca pri standardni metodi IFU

Standardna metoda IFU (IFU, 2004), navaja filtracijo, vendar ta ni obvezen korak, zahteva pa najmanj 100 ml segretega vzorca in razredčenega v razmerju 1:10 z de-mineralizirano sterilno destilirano vodo. Vzorec se filtrira skozi filter z velikostjo por 0,45 µm. Filtracijska membrana se nato aseptično prenese na gojišče K-agar, BAT ali YSG. V študiji delovne skupine JFJA (Japan Fruit Juice Association), sta gojišči YSG in BAT priporočeni za revitalizacijo (obnovo) bakterij rodu *Alicyclobacillus*, vendar niso zaznali razlik v rasti na obeh gojiščih, in tudi ne med direktnim nanosom vzorca in nanosu vzorca po filtriranju (Yokota in sod., 2007).

Pri našem eksperimentalnem delu pri postopku 1A nismo uporabili membranske filtracije vzorca, medtem ko smo pri postopku 1B uporabili membransko filtracijo. Rezultati izolacije in identifikacije sevov bakterij rodu *Alicyclobacillus* (preglednica 16 in preglednica 24) jasno potrjujejo večjo občutljivost postopka, ki vključuje membransko filtracijo, saj brez membranske filtracije nismo dobili nobenega izolata, medtem ko smo pri postopku z membransko filtracijo dobili 11 izolatov. Vsi dobljeni izolati pa so bile mešane kulture bakterij rodu *Alicyclobacillus*, in posameznih sevov nismo mogli identificirati. Pri postopkih 2A (brez membranske filtracije) in 2B (z membransko filtracijo) nismo dobili nobenega izolata in ne moremo sklepati na vpliv filtracije na učinkovitost postopka izolacije bakterij rodu *Alicyclobacillus* (preglednica 16). Pri postopku 3A nismo uporabili membranske filtracije, medtem ko smo jo uporabili pri postopku 3B in iz dobljenih rezultatov (preglednica 16 in preglednica 24) lahko nazorno vidimo, da smo z uporabo membranske filtracije zelo povečali občutljivost standardne metode IFU.

5.1.4 Vpliv obogatitve vzorca pri standardni metodi IFU

Standardna metoda IFU (2004) priporoča, da se težko ali ne filtrirajoče vzorce podvrže obogatitveni metodi, katera vsebuje inkubacijo toplotno obdelanih vzorcev (približno 100 ml) pri 45 °C. Albuquerque in sodelavci (2000) so vzorce prefiltrirali skozi filter z velikostjo por 0,45 µm in nato filter aseptično prenesli v tekoče gojišče BAM (*Bacillus acidocaldarius* medium) z znižanim pH (4,0). Grande in sodelavci (2005) so za rehidracijo kupljenih sevov uporabili tekoče gojišče AAM (*Alicyclobacillus acidocaldarius* medium) ter vzorce inkubirali 48 ur pri 37 °C. Člani tehničnega odbora ABECitrus (Steyn in sod., 2011) so za izolacijo bakterij rodu *Alicyclobacillus* iz koncentriranih sadnih izdelkov uporabili metodo obogatitve, pri katerem so za obogatitev uporabili tekoče gojišče BAT. 10 ml posameznega vzorca so cepili v 90 ml tekočega gojišča BAT, ga termično aktivirali pri 80 °C za 10 min in nato cepili na BAT gojišče, ter inkubirali pri 50 °C za 4 dni.

Pri našem eksperimentalnem delu smo za obogatitev uporabili tekoče gojišče BAT, katerega smo 5 dni inkubirali pri 45 °C. V primeru obogatitve vzorcev sladkorja, smo zaznali rast le pri uporabi filtracijske tehnike (postopek 3B), pri direktnem nanosu na gojišče pa rasti ni bilo (postopek 3A). Pri postopku 3B smo dobili 16 izolatov (preglednica 16), od katerih smo jih 14 identificirali (preglednica 24). V primerih obogatitve vzorcev izvirske vode z okusom smo pri postopku 4A uporabili direktno izolacijo na gojišču BAT, medtem ko smo pri postopku 5A uporabili obogatitev pred izolacijo. Pri postopku 4A (brez obogatitve) nismo dobili nobenega izolata, medtem ko smo pri postopku 5A izolirali 5 sevov (preglednica 17) in jih tudi identificirali (preglednica 25). Enake rezultate smo dobili tudi pri primerjavi postopkov 4B (brez obogatitve) in 5B (z obogatitvijo). Glede na dobljene rezultate lahko sklepamo, da je vključitev obogatitvene kulture vzorca vplivala na boljšo občutljivost standardne metode IFU.

5.1.5 Vpliv pH gojišča na rast bakterij *Alicyclobacillus*

Posamezne kolonije, ki so rasle na površini gojišča BAT smo precepili na sveža gojišča in sicer na gojišče PC (angl. plate count) s pH (7,0) in na gojišče BAT s pH 4,0. Gojišča smo inkubirali 48 do 72 ur pri 50 °C in tako potrdili acidofilno naravo izolatov (preglednice 12-15). Na gojišču PC niso zrastle kolonije pri vseh testiranih postopkih, razen pri postopku 1B (100 g vzorca, matična raztopina, toplotna aktivacija spor, membranska filtracija 500 ml, izolacija na gojišču BAT, identifikacija), kjer smo izolirali mešane kulture.

5.1.6 Vpliv temperature na rast bakterij *Alicyclobacillus*

Identifikacija bakterij *Alicyclobacillus* se izvaja z analizo morfoloških značilnosti celic in kolonij, z določitvijo rasti v različnih razmerah (temperatura in pH), in z biokemijskimi testi izkoriščanja različnih substratov (Eguchi in sod., 1999).

Metoda rasti pri različnih temperaturah (45 °C in 65 °C) temelji na dejstvu, da imajo bakterije vrste *A. acidoterrestris* v primerjavi z drugimi vrstami istega rodu nižjo optimalno temperaturo rasti. Metoda omogoča določitev vrst *A. acidocaldarius* in *A. acidoterrestris* (vključno z vrsto *A. acidiphilus* in *A. hesperidum*) v 24 urah. Glede na rast pri različnih temperaturah se lahko okvirno določi vrsto:

– rast kolonij pri 45 °C in ni rasti pri 65 °C, pomeni da gre za vrsto *A. acidoterrestris*,

- ni rasti pri 45 °C in rast kolonij pri 65 °C, pomeni da gre za vrsto *A. acidocaldarius*,
- rast pri obeh temperaturah pomeni, da sta v vzorcu obe vrsti *A. acidoterrestris* in *A. acidocaldarius*,
- ni rasti pri obeh temperaturah pomeni, da v vzorcu ni vrst *A. acidoterrestris* in *A. acidocaldarius*, ampak so v vzorcu bile prisotne druge vrste bakterij iz rodu *Alicyclobacillus*. Pri tem je potrebno vedeti, da za vrste *A. acidiphilus*, *A. cycloheptanicus*, *A. hesperidum* veljajo podobne značilnosti kot za vrsto *A. acidoterrestris* (Goto, 2007b).

Pri našem eksperimentalnem delu smo uporabili metodo rasti pri različnih temperaturah za okvirno določitev vrste izolatov, vendar smo namesto gojišča YSG uporabili gojišče BAT. Ugotovili smo, da vsi izolati rastejo pri 45 °C, razen izolata 2e in 5e, kateri rasteta pri 65 °C, ter izolati 3e, 3f, 4f, 5f, ki rastejo pri obeh temperaturah (preglednica 22).

5.2 SKLEPI

Glede na rezultate izolacije in identifikacije bakterij rodu *Alicyclobacillus* iz naravno kontaminiranih vzorcev živil po različnih postopkih standardne metode IFU smo ugotovili:

- da so v vzorcih sladkorja in izvirske vode z okusom, prisotne bakterije rodu *Alicyclobacillus* (v 60 % vzorcev sladkorja in v vseh vzorcih izvirske vode z okusom)
- da je na večjo učinkovitost izolacije bakterij rodu *Alicyclobacillus* vplivala vključitev membranske filtracije in obogatitvene kulture
- da na učinkovitost izolacije bakterij rodu *Alicyclobacillus* ni vplivala (a) velikost trdnega vzorca živila (vzorci sladkorja; 10 g ali 100 g) pri standardni metodi IFU brez obogatitve in (b) toplotna aktivacija
- da je standardna metoda IFU z vključitvijo filtracije in obogatitve najbolj primerna za izolacijo in identifikacijo bakterij rodu *Alicyclobacillus*
- da je glede števila identificiranih izolatov za trdna živila najbolj primeren postopek, ki vključuje obogatitev, membransko filtracijo, izolacijo, identifikacijo (postopek 3B), in za tekoča živila postopek, ki vključuje toplotno aktivacijo, membransko filtracijo, obogatitev, izolacijo, identifikacijo, (postopek 5A ali 5B).

6 POVZETEK

Bakterije rodu *Alicyclobacillus* so termo-acidofilne, grampozitivne, aerobne in sporogene bakterije. Najdemo jih v zemlji in vodi, katera sta tudi glavna vira kontaminacije z bakterijami rodu *Alicyclobacillus* v proizvodnji sadnih sokov in sadnih koncentratov. Bakterije rodu *Alicyclobacillus* so vse pogostejše kvarljivci sadnih in zelenjavnih sokov, saj njihove spore preživijo temperature pasterizacije in so sposobne rasti pri zelo nizki vrednosti pH (2,5-6). Niso patogene, vendar pa povzročajo veliko škodo proizvajalcem sadnih sokov in sadnih koncentratov, saj tvorijo gvajakol, ki ima neprijetno aromo in zaradi tega so proizvodi nesprejemljivi (Smit in sod., 2011).

Čeprav so bile razvite različne metode za izolacijo bakterij rodu *Alicyclobacillus*, niso vse enako učinkovite. Vrsta gojišča, metoda nanosa in uporaba dodatnih postopkov, kot sta na primer membranska filtracija in toplotna aktivacija spor, lahko igrajo pomembno vlogo pri učinkovitosti metode za izolacijo in odkrivanje bakterij *Alicyclobacillus* iz različnih izdelkov. Kot so številne študije pokazale je standardna metoda IFU, ki ga je razvila delovna skupina mikrobiologov Mednarodnega združenja proizvajalcev sadnih sokov (The Federation of Fruit Juice Producers) najprimernejša za izolacijo bakterij rodu *Alicyclobacillus* (Witthuhn in sod., 2011).

Namen naloge je bila izolacija in identifikacija bakterij rodu *Alicyclobacillus* iz naravno kontaminiranih vzorcev sladkorja in vzorcev izvirske vode z okusom, z vzporednimi različnimi izvedbami standardne metode IFU (IFU, 2004). Cilj naloge je bil, ugotoviti, kateri postopek je najbolj primeren za izolacijo.

Za izolacijo bakterij rodu *Alicyclobacillus* smo uporabili standardno metodo IFU in 10 različnih postopkov. Pri tem smo uporabili standardne tehnike izolacije, metodo obogatitve, toplotno aktivacijo spor in tehniko membranske filtracije. S pomočjo makromorfoloških in mikromorfoloških značilnosti smo potrdili, da smo izolirali bakterije rodu *Alicyclobacillus*. Za identifikacijo smo uporabili metodo rasti na gojiščih z različnimi vrednostmi pH (4,0 in 7,0), saj bakterije rodu *Alicyclobacillus* niso zmožne rasti na gojiščih z nevtralnim pH. Z metodo rasti pri različnih temperaturah in s testi API 50 CH, smo določili vrsto bakterij rodu *Alicyclobacillus*.

Glede na rezultate izolacije bakterij rodu *Alicyclobacillus*, smo ugotovili, da je standardna metoda izolacije z vključitvijo membranske filtracije in obogatitve živila najbolj učinkovita in primerna za izolacijo in identifikacijo bakterij rodu *Alicyclobacillus*. Vključitev membranske filtracije in obogatitve, sta postopka, ki sta povečala občutljivost standarne metode IFU. Prav tako smo ugotovili, da velikost trdnega živila vzorca (vzorci sladkorja, 10 g in 100 g) pri standardni metodi IFU brez obogatitve ni imela vpliva na učinkovitost izolacije. Iz rezultatov identificiranih izolatov, smo ugotovili, da je za izolacijo iz trdnih živil najbolj primeren postopek 3B (10 g vzorca, obogatitev v gojišču BAT, membranska filtracija, izolacija na gojišču BAT, identifikacija) in za izolacijo iz tekočih živil, sta najbolj primerna postopka 5A (500 ml vzorca, membranska filtracija 500 ml, obogatitev v gojišču BAT, izolacija (0,1 ml) na gojišču BAT, identifikacija) in 5B (500 ml vzorca, toplotna aktivacija spor, membranska filtracija 500 ml, obogatitev v gojišču BAT, izolacija (0,1 ml) na gojišču BAT, identifikacija).

Bakterije rodu *Alicyclobacillus* smo določili v 12 vzorcih sladkorja (60 %) in v vseh vzorcih vode z okusom.

7 VIRI

- Albuquerque L., Rainey F.A., Chung A.P., Sunna A., Nobre M.F., Grote R., Antranikian G. da Costa M.S. 2000. *Alicyclobacillus hesperidum* sp. nov., and a related genomic species from solfataric soils of Sao Miguel in the Azores. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50: 451–457
- Blocher J.C., Busta F.F. 1983. Bacterial spore resistance to acid. *Food Technology*, 37: 87-99
- Brown K.L. 2000. Control of bacterial spores. *British Medical Bulletin*, 56: 158-171
- Borlinghaus A., Engel R. 1997. *Alicyclobacillus* incidence in commercial apple juice concentrate (AJC) supplies: Method development and validation. *Fruit Processing*, 7: 262-266
- Boyd M.A., Antonio M.A.D, Hiller S.L. 2005. Comparison of API 50 CH strips to whole-cromosomal DNA probes for identification of *Lactobacillus* species. *Journal of Clinical Microbiology*, 43: 5309-5311
- Cerny G., Hennlich W., Poralla K. 1984. Fruchtsaftverderb durch Bacillen: isolierung und charakterisierung des verderbserrengers. *Zeitschrift fuer Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung*, 179: 224-227
- Chang S., Kang D. 2004. *Alicyclobacillus* spp. in the fruit juice industry: History, characteristics, and current isolation/detection procedures. *Critical Reviews in Microbiology*, 30: 55-74
- Darland G., Brock T.D. 1971. *Bacillus acidocaldarius* sp. nov., an acidophilic thermophilic spore-forming bacterium. *Journal of General Microbiology*, 67: 9-15
- Deák T. 2008. Handbook of food spoilage yeasts. 2nd ed. Boca Raton, CRC Press, Taylor&Francis Group: 117-173
- Deinhard G., Blanz P., Poralla K. Altan E. 1987a. *Bacillus acidoterrestris* sp. nov., a new thermotolerant acidophile isolated from different soils. *Systematic and Applied Microbiology*, 10: 47-53
- Deinhard G., Saar J., Krischke W., Poralla K. 1987b. *Bacillus cycloheptaicus* sp. nov., a new thermoacidophile containing ω -cycloheptane fatty acids. *Systematic and Applied Microbiology*, 10: 68-73
- Duong H.A., Jensen N. 2000. Spoilage of iced tea by *Alicyclobacillus*. *Food Australia*, 52: 292-292
- Dutka B.J. 1981. Membrane filtration: Applications, techniques, and problems. New York, Marcel Dekker Inc: 567 str.

- Milipore Corporation. 2001. Effect of membrane filter pore size on microbial recovery and colony morphology. Bedford, Milipore Corporation: 4 str.
<http://www.millipore.com/techpublications/tech1/tb1025en00> (5.dec.2011)
- Eiroa M.N.U., Junqueira V.C.A., Schmidt F.L. 1999. *Alicyclobacillus* in orange juice: Occurrence and heat resistance of spores. Journal of Food Protection, 62: 883-886
- Eguchi S.Y., Manfio G.P., Pinhatti M.E, Azuma E., Variane S.F. 1999. Report of the research project: Acidothermophilic Sporeforming Bacteria (ATSB) in orange juices: Detection methods, ecology, and involvement in the deterioration of fruit juices. Sao Paulo, ABECitrus: 52 str.
- Goto K. Matsubara H., Mochida K., Matsumura T., Hara Y., Niwa M, Yamasato K. 2002. *Alicyclobacillus herbarius* sp. nov. a novel bacterium containing ω -cycloheptane fatty acids, isolated from herbal tea. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 52: 109-113
- Goto K., Mochida K., Asahara M., Suzuki M., Kasai H., Yokota A. 2003. *Alicyclobacillus pomorum* sp. nov., a novel thermo-acidophilic, endospore-forming bacterium that does not possess ω -alicyclic fatty acids, and emended description of the genus *Alicyclobacillus*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 53: 1537-1544
- Goto K., Mochida K., Kato Y., Asahara M., Ozawa C., Kasai H., Yokota A. 2006. Diversity of *Alicyclobacillus* isolated from fruit juices and their raw material, and emended description of *Alicyclobacillus acidocaldarius*. Microbiology and Culture Collections, 22, 1: 1-14
- Goto K. 2007a. Characteristics of *Alicyclobacillus*. V: *Alicyclobacillus*: Thermophilic acidophilic bacilli. Yokota A., Fujii T., Goto K. (eds.). Tokyo, Springer Science + Business Media: 9-48
- Goto K. 2007b. Differentiation and identification of *Alicyclobacillus* species. V: *Alicyclobacillus*: Thermophilic acidophilic bacilli. Yokota A. Fujii T., Goto K. (eds.). Tokyo, Springer Science + Business Media: 79-91
- Goto K., Mochida K., Kato Y., Asahara M., Fujita R., An S.Y., Kasai H., Yokota A. 2007. Proposal of six species of moderately thermophilic, acidophilic, endospore-forming bacteria: *Alicyclobacillus contaminans* sp. nov., *Alicyclobacillus fastidiosus* sp. nov., *Alicyclobacillus kakegawensis* sp. nov., *Alicyclobacillus macrosporangiidus* sp. nov., *Alicyclobacillus sacchari* sp. nov. and *Alicyclobacillus shizuokensis* sp. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 57: 1276 – 1285
- Grande M.J., Lucas R., Abriouel H., Ben Omar N. Maqueda M., Martinez-Bueno M., Martinez-Cañamero M., Valdivia E., Gálvez A. 2005. Control of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in fruit juices by enterocin AS-48. International Journal of Microbiology, 104: 289-297

- Groenewald W.H., Gouws P.A., Witthuhn R.C. 2008. Isolation and identification of species *Alicyclobacillus* from orchard soil in the Western Cape, South Africa. *Extremophiles*, 12: 159-263
- Hippchen B., Röhl A., Poralla K. 1981. Occurance in soil of thermo-acidophilic bacilli possessing ω -cyclohexane fatty acids and hapanoids. *Archives of Microbiology*, 129: 53-55
- Hiraishi A., Inagaki K., Tanimoto Y., Iwasaki M., Kishimoto N., Tanaka H. 1997. Phylogenetic characterization of a new thermo-acidophilic bacterium isolated from hot spring in Japan. *Journal of General and Applied Microbiology*, 43: 295-304
- Hui Y.H., Barta J., Cano M.P., Gusek T.W., Sidhu J.S., Sinha N. 2006. Handbook of fruits and fruit processing. Iowa, Blackwell Publishing: 205-217
- IFU. 2004. IFU Method No. 12: Method on the detection of *Alicyclobacillus* in fruit juices. First Standard IFU. Paris, International Federation of Fruit Juice Producers: 6 str.
- Imperio T. Viti C., Marri L. 2008. *Alicyclobacillus pohliae* sp. nov., a thermophilic, endospore-forming bacterium isolated from geothermal soil of the north-west slope of Mount Melbourne (Antarctica). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58: 221-225
- Jay J.M., Loessner M.J., Golden D.A. 2005. Modern food microbiology. 7th ed. New York, Springer Science + Business Media: 39-59, 125-147, 415-441
- Jensen N. 2000. *Alicyclobacillus* in Australia. *Food Australia*, 52: 282 - 285
- Karavaiko G.I., Bogdanova T.I., Tourova T.P., Kondrat'eva T.F., Tsaplina I.A., Egorova M.A., Krasil'nikova E.N., Zakharchuk L.M. 2005. Reclassification of *Sulfobacillus thermosulfoxidans* subsp. *thermotolerans* strain K1 as *Alicyclobacillus tolerans* sp. nov. and *Sulfobacillus disulfidooxidans* Dufnese et al. 1996 as *Alicyclobacillus disulfidooxidans* comb. nov., and emended description of the genus *Alicyclobacillus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55: 941-947
- Lee S.Y., Chang S.S., Shin J.H., Kang D.H. 2007. Membrane filtration method for enumeration and isolation of *Alicyclobacillus* spp. from apple juice. *Letters in Applied Microbiology*, 45: 540-546
- Logan N.A., Berkeley R.C.W. 1984. Identification of *Bacillus* strains using the API system. *Journal of General Microbiology*, 130: 1871-1882
- Matsubara H., Goto K., Matsumura T., Mochida K., Iwaki M., Niwa M., Yamasato K. 2002. *Alicyclobacillus acidiphilus* sp. nov., a novel thermo-acidophilic, ω -alicyclic fatty acid-containing bacterium isolated from acidic beverages. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52: 1681-1685
- Murakami M., Tedzuka H., Yamazaki K. 1998. Thermal resistance of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores in different buffers and pH. *Food Microbiology*, 15: 577-582

- Murray M.B., Gurtler J.B., Ryu J.H., Harrison M.A., Beuchat L.R. 2007. Evaluation of direct plating methods to enumerate *Alicyclobacillus* in beverages. *International Journal of Food Microbiology*, 115: 59-69
- Nicolaus B., Importa R., Manca M.C., Lama L., Esposito E., Gambacorta A. 1998. *Alicyclobacilli* from an unexpected geothermal soil in Antarctica. *Mount Rittmann. Polar Biology*, 19: 133-141
- Nigatu A. Ahrné S., Melin G. 2000. Temperature-dependent variation in API 50 CH fermentation profiles of *Lactobacillus* species. *Current Microbiology*, 41: 22-26
- Pettipher G.L., Osmundson M.E., Murphy J.M. 1997. Methods for the detection and enumeration of *Alicyclobacillus acidoterrestris* and investigation of growth and production of taint in fruit juices-containing drinks. *Letters in Applied Microbiology*, 24: 185-189
- Pettipher G.L., Osmundson M.E. 2000. Methods for the detection, enumeration and identification of *Alicyclobacillus acidoterrestris*. *Food Australia*, 57: 293-295
- Pinhatti M.E.M.C., Variane S., Eguchi S.Y., Manfio G.P. 1997. Detection of acidothermophilic bacilli in industrialized fruit juices. *Fruit Processing*, 9: 350-353
- Pontius A.J., Rushing J.E., Foegeding P.M. 1998. Heat resistance of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores as affected by various Ph values and organic acids. *Journal of Food Protection*, 61: 41-46
- Prescott L.M., Harley J.P., Klein D.A. 2002. *Microbiology*. 5th ed. Boston, The McGraw-Hill Companies: 109-109, 118-118
- Prescott L.M., Harley J.P. 2002. *Laboratory exercises in microbiology*. 5th ed. Boston, The McGraw-Hill Companies: 43-47, 57-59
- Silva F.V.M, Gibbs P. 2004. Target selection in designing pasteurisation processes for shelf-stable high-acid fruit products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44: 353-360
- Simbahan J., Drijber R., Blum P. 2004. *Alicyclobacillus vulcanalis* sp. nov., a thermophilic acidophilic bacterium isolated from Coso Hot Springs, California, USA. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54: 1703–1707
- Simpson R.F., Amon J.M., Daw A.J. 1986. Off-flavour in wine caused by guaiacol. *Food Technology in Australia*, 38: 31-33
- Smit Y., Cameron M., Venter P., Witthuhn R.C. 2011. *Alicyclobacillus* spoilage and isolation: A review. *Food Microbiology*, 28: 331-349
- Splittstoesser D.F., Churey J.J., Lee C.Y. 1994. Growth characteristics of aciduric sporeforming bacilli isolated from fruit juices. *Journal of Food Protection*, 57: 1080-1083

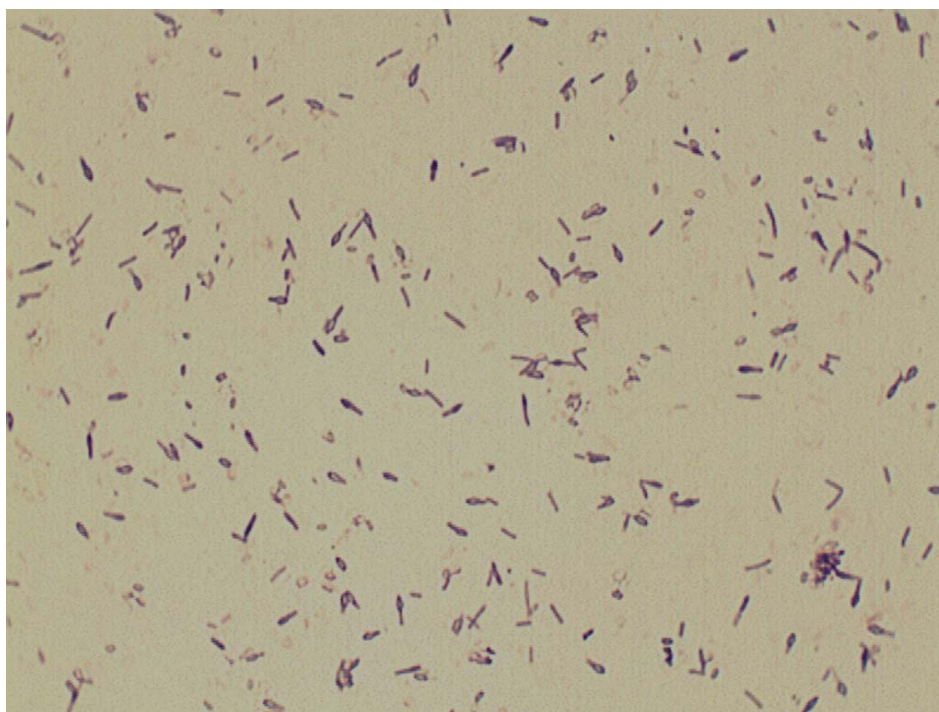
- Splittstoesser D.F., Lee C.Y., Churey J.J. 1998. Control of *Alicyclobacillus* in the juice industry. Dairy, Food and Environmental Sanitation, 18: 585-587
- Steyn C.E., Cameron M., Witthuhn R.C. 2011. Occurance of *Alicyclobacillus* in the fruit processing environment – A review. International Journal of Food Microbiology, 147: 1-11
- Terano H., Takahashi K., Sakakibara Y. 2005. Characterization of spore germination of a thermoacidophilic spore-forming bacterium, *Alicyclobacillus acidoterrestris*. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 69:1217-1220
- Tortura G.J., Funke B.R., Case C.L. 2010. Microbiology: an introduction. 10th ed. San Francisco, Pearson Education Inc.: 54-75
- Tsuruoka N., Isono Y., Shida O., Hemmi H., Nakayama T., Nishino T. 2003. *Alicyclobacillus sendaiensis* sp. nov., a novel acidophilic, slightly thermophilic species isolated from soil in Sendai, Japan. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 53: 1081-1084
- Vieira M.C., Teixeira A.A., Silva F.M., Gaspar N., Silva C.L.M. 2002. *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores as a target for Cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) nectar thermal processing: Kinetic parameters and experimental methods. International Journal of Food Microbiology, 77: 71-81
- Walls I., Chuyate R. 1998. *Alicyclobacillus* – historical prespective and preliminary characterization study. Dairy, Food and Environmental Sanitation, 18: 499-503
- Witthuhn R.C., Smit Y., Cameron M., Venter P. 2011. Isolation of *Alicyclobacillus* and the influence of different growth parameters. International Journal of Food Microbiology, 146, 1: 63-68
- Wisotzkey J.D., Jurtshuk J.R.P., Fox G.E., Deinhard G., Poralla K., 1992. Comparative sequence analyses on the 16S rRNA (rDNA) of *Bacillus acidocaldarius*, *Bacillus acidoterrestris* and *Bacillus cycloheptanicus* and proposal for creation of a new genus, *Alicyclobacillus* gen. nov. International Journal of Systematic Bacteriology, 42: 263-269
- Yamazaki K., Kawai Y., Inoue N., Shinano H. 1997. Influence of sporulation medium and divalent ions on the heat reistance of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores. Letters in Applied Microbiology, 25: 153-156
- Yokota A. 2007. Parameters for detection of *Alicyclobacillus* and test methods. V: *Alicyclobacillus: Thermophillic acidophilic bacilli*. Yokota A., Fujii T., Goto K. (eds.). Tokyo, Springer Science + Business Media: 49-78

ZAHVALA

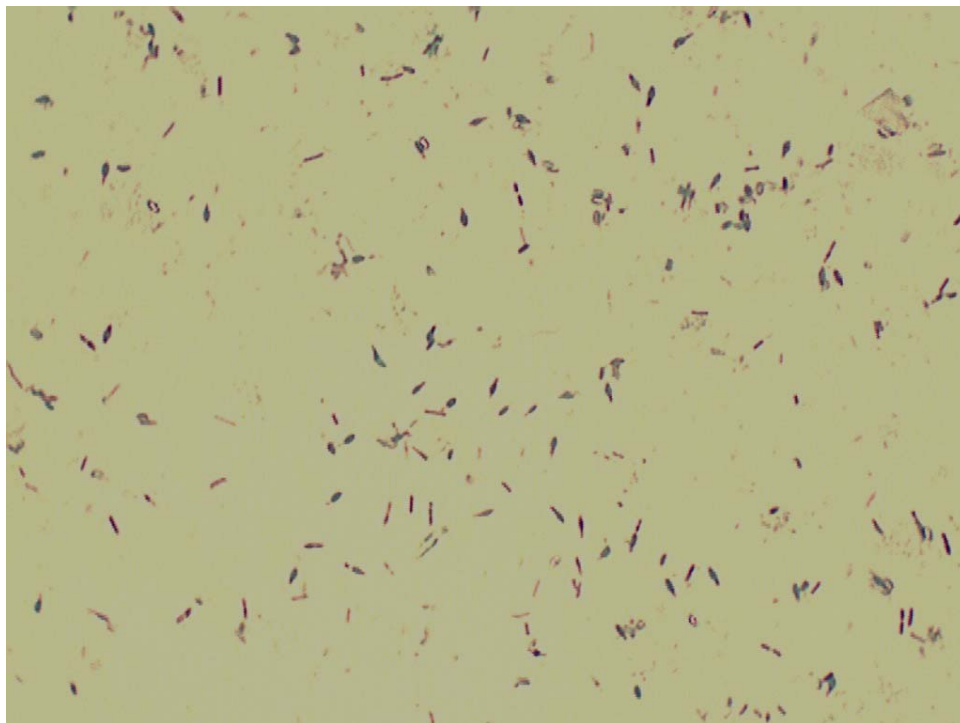
PRILOGE



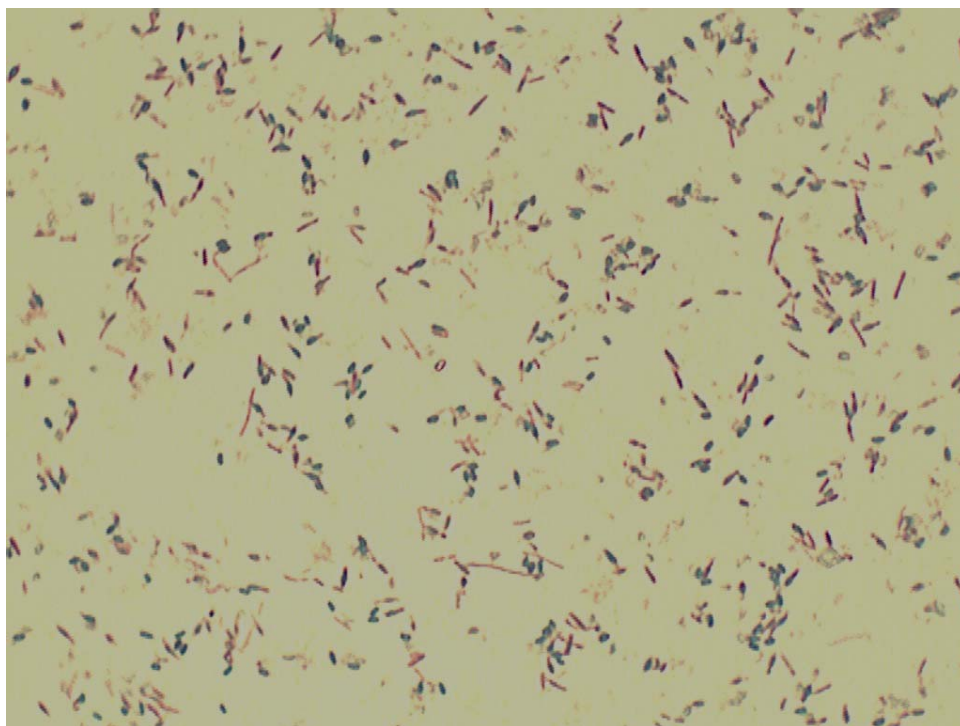
Priloga A 1: Izolat 1a-vzorec sladkorja (ŽMJ 199) barvan po Gramu



Priloga A 2: Izolat 2a-vzorec sladkorja(ŽMJ 201) barvan po Gramu



Priloga B 1: Izolat 5b-vzorec sladkorja (ŽMJ 206) barvan po Schaeffer-Fulton



Priloga B 2: Izolat 6b-vzorec sladkorja (ŽMJ 208) barvan po Schaeffer-Fulton



Priloga C 1: Primer testa API 50 CH z izolatom 2f (ŽMJ 195)



Priloga C 2: Primer testa API 50 CH z izolatom 2e (ŽMJ 201)