

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Katja KUM

**DOLOČANJE BAKTERIJ RODU *Alicyclobacillus* S PCR V
REALNEM ČASU**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

DETECTION OF *Alicyclobacillus* WITH REAL-TIME PCR

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.

Študijska komisija Oddelka za živilstvo je za mentorico diplomskega dela imenovala doc. dr. Barbaro Jeršek in za recenzentko prof. dr. Natašo Poklar Ulrich.

Mentorica: doc. dr. Barbara Jeršek

Recenzentka: prof. dr. Nataša Poklar Ulrich

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Katja Kum

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn
DK UDK 579.24.083+579.67:577.2.083(043)=163.6
KG mikrobiološke metode/določanje bakterij/kvarljivci živil/*Alicyclobacillus*/
Alicyclobacillus acidoterrestris/PCR v realnem času/občutljivost PCR v realnem
času/specifičnost PCR v realnem času
AV KUM, Katja
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 DOLOČANJE BAKTERIJ RODU *Alicyclobacillus* S PCR V REALNEM ČASU
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP XI, 66 str., 20 pregl., 17 sl., 3 pril., 99 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Bakterije rodu *Alicyclobacillus* so termo-acidofilne, grampozitivne, aerobne in sporogene bakterije. Določanje bakterij rodu *Alicyclobacillus* s klasičnimi mikrobiološkimi metodami je zamudno in neprimerno za analizo velikega števila vzorcev. V našem delu smo postavili protokol za PCR v realnem času za določanje bakterij rodu *Alicyclobacillus*. V prvem delu smo za PCR uporabili oligonukleotidna začetnika CC16S-F/CC16S-R (Connor in sod., 2005) in nespecifično metodo določanja pomnožkov. Ugotovili smo, da sta zaradi slabe specifičnosti oligonukleotidna začetnika neprimerna za določanje bakterij rodu *Alicyclobacillus* s PCR v realnem času. V nadaljevanju smo uvedli PCR v realnem času z oligonukleotidno sondijo CC16S. Tako smo izboljšali specifičnost metode (100 %) in s tem potrdili njeno primernost za določanje bakterij rodu *Alicyclobacillus*. Ugotovili smo tudi, da s spremembijo temperaturno-časovnega programa encimske reakcije in s spremembijo koncentracije oligonukleotidnih začetnikov CC16S-F/CC16S-R (900 nM) ter oligonukleotidne sonde CC16S (200 nM) izboljšamo občutljivost določanja bakterij rodu *Alicyclobacillus* s PCR v realnem času iz $5,15 \times 10^2$ cfu/ml na $1,9 \times 10^1$ cfu/ml. Bakterije rodu *Alicyclobacillus* smo določili s specifično metodo določanja pomnožkov tudi v vzorcih živil ne da bi uporabili obogatitev živila ali kakršenkoli poseben postopek priprave DNA. V vzorcih vode z okusom je bila občutljivost $1,5 \times 10^2$ cfu/ml in v vzorcih jabolčnega soka $1,47 \times 10^3$ cfu/ml. PCR v realnem času s specifično oligonukleotidno sondijo za določanje bakterij rodu *Alicyclobacillus* je v primerjavi s klasičnimi mikrobiološkimi metodami in tudi v primerjavi s klasičnim PCR bolj občutljiva in specifična metoda, hkrati pa se skrajša in poenostavi postopek določanja bakterij, kar je tudi bil osnovni namen naloge.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDC 579.24.083+579.67:577.2.083(043)=163.6
CX microbiological methods/bacteria detection/food spoiling bacteria/
Alicyclobacillus/Alicyclobacillus acidoterrestris/real-time PCR/sensitivity of real-
time PCR/ specificity of real-time PCR
AU KUM, Katja
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 DETECTION OF *Alicyclobacillus* WITH REAL-TIME PCR
DT Graduation Thesis (University studies)
NO XI, 66 p., 20 tab., 17 fig., 3 ann., 99 ref.
LA sl
AL sl/en
AB *Alicyclobacillus* species are thermo-acidophilic, gram-positive, aerobic and spore-
forming bacteria. The detection of these bacteria with classical microbiological
methods can be extremely time-consuming and unsuitable for analyzing large
number of samples. For the purpose of this research the real-time PCR protocol
for detection of these bacteria was applied. In the first part we used CC16S-
F/CC16S-R primers (Connor et al., 2005) and non-specific detection method. We
found out that, primers had low specificity and therefore unsuitable for detection
of *Alicyclobacillus* spp. with real-time PCR. In addition we introduced real-time
PCR with CC16S probe. On that way we improved the specificity of the method
(100%) and confirmed its suitability for the determination of *Alicyclobacillus* spp.
It was also found out that by changing the temperature-time program of
enzymatic reaction and by modifying the concentrations of CC16S-F/CC16S-R
primers (900 nM) and CC16S probe (200 nM) improved sensitivity of detection
was achieved (from $5,15 \times 10^2$ cfu/ml to $1,9 \times 10^1$ cfu/ml). *Alicyclobacillus* spp.
were detected also in samples of foods without enrichment and without any
special procedure for the preparation of DNA. The sensitivity of real-time PCR
with specific probe in samples of water with taste was $1,5 \times 10^2$ cfu/ml and in
samples of apple juice was $1,47 \times 10^3$ cfu/ml. Real-time PCR for detection of
Alicyclobacillus spp. is in comparison with the classical microbiological methods
and with the classic PCR more sensitive and specific method. Introduced
detection procedure for *Alicyclobacillus* spp. shortens and simplifies the process
of detection, which was the basic purpose of our research.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	II
KEY WORDS DOCUMENTATION	III
KAZALO VSEBINE	IV
KAZALO PREGLEDNIC	VII
KAZALO SLIK	VIII
KAZALO PRILOG	IX
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	X
1 UVOD	1
1.1 CILJI NALOGE	2
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 BAKTERIJE RODU <i>Alicyclobacillus</i>	3
2.1.1 Zgodovina in klasifikacija	3
2.1.2 Lastnosti bakterij rodu <i>Alicyclobacillus</i>	4
2.1.2.1 Splošne lastnosti	4
2.1.2.2 Struktura membran	6
2.1.2.3 Toplotna odpornost spor	7
2.1.3 Bakterije rodu <i>Alicyclobacillus</i> kot kvarljivci	8
2.1.3.1 Gvajakol	9
2.1.3.2 Halofenoli	10
2.2 VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO	11
2.2.1 Princip PCR	11
2.3 VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO V REALNEM ČASU	13
2.3.1 Princip PCR v realnem času	13
2.3.2 Metode določanja pomnožkov	15
2.3.2.1 Nespecifične metode določanja pomnožkov	15
2.3.2.2 Specifične metode določanja pomnožkov	16
2.4 DOLOČANJE BAKTERIJ RODU <i>Alicyclobacillus</i>	16
2.4.1 Klasične mikrobiološke metode	16
2.4.2 Alternativne metode	18
3 MATERIAL IN METODE	20
3.1 POTEK DELA	20
3.2 MATERIJAL	21
3.2.1 Bakterijski sevi	21
3.2.2 Mikrobiološka gojišča	21
3.2.2.1 Neselektivna gojišča	21

3.2.2.2 Selektivna gojišča	22
3.2.2.3 Fiziološka raztopina	23
3.2.3 Reagenti.....	23
3.2.3.1 Reagenti za lizo bakterijskih celic	23
3.2.3.2 Reagenti za PCR v realnem času z nespecifično metodo določanja pomnožkov	24
3.2.3.3 Reagenti za PCR v realnem času s specifično metodo določanja pomnožkov	24
3.2.3.4 Reagenti za agarozno elektroforezo	24
3.2.3.5 Reagenti za izolacijo DNA (Flamm in sod., 1984).....	25
3.2.3.6 Druge kemikalije	26
3.2.4 Živila.....	26
3.2.5 Laboratorijska oprema.....	26
3.3 METODE	27
3.3.1 Potek eksperimentalnega dela.....	27
3.3.1.1 Določitev občutljivosti PCR v realnem času za določanje bakterij rodu <i>Alicyclobacillus</i>	28
3.3.1.2 Določitev specifičnosti PCR v realnem času za določanje bakterij rodu <i>Alicyclobacillus</i>	29
3.3.1.3 Določitev občutljivosti PCR v realnem času za določanje bakterij rodu <i>Alicyclobacillus</i> v živilu	30
3.3.2 Revitalizacija bakterij.....	31
3.3.3 Namnožitev bakterijskih kultur.....	32
3.3.4 Umetna kontaminacija vode in živil	32
3.3.5 Določitev števila bakterij z metodo štetja kolonij na trdnem gojišču.....	32
3.3.6 Priprava bakterijske DNA s topotno lizo bakterijskih celic	33
3.3.7 Izolacija DNA	33
3.3.8 Potek PCR v realnem času	34
3.3.8.1 Priprava reakcijske mešanice za PCR v realnem času	34
3.3.8.2 PCR v realnem času	35
3.3.9 Dokazovanje pomnožkov z agarozno gelsko elektroforezo	36
3.3.10 Vrednotenje rezultatov PCR v realnem času	36
4 REZULTATI IN RAZPRAVA	38
4.1 PCR V REALNEM ČASU Z NESPECIFIČNO METODO DOLOČANJA POMNOŽKOV	38
4.1.1 Optimizacija koncentracije oligonukleotidnih začetnikov CC16S-F/CC16S-R za določanje bakterij rodu <i>Alicyclobacillus</i>	38
4.1.2 Določanje bakterij rodu <i>Alicyclobacillus</i> s PCR v realnem času	39
4.1.3 Občutljivost PCR v realnem času za določanje bakterij rodu <i>Alicyclobacillus</i>	41

4.1.4 Specifičnost oligonukleotidnih začetnikov CC16S-F/CC16S-R za določanje bakterij rodu <i>Alicyclobacillus</i> s PCR v realnem času	42
4.1.5 Določanje bakterij rodu <i>Alicyclobacillus</i> s PCR v realnem času v umetno kontaminirani pitni vodi.....	44
4.2 PCR V REALNEM ČASU S SPECIFIČNO METODO DOLOČANJA POMNOŽKOV	46
 4.2.1 Optimizacija koncentracije sonde CC16S za določanje bakterij rodu <i>Alicyclobacillus</i>.....	46
 4.2.2 Občutljivost PCR v realnem času za določanje bakterij rodu <i>Alicyclobacillus</i>.....	47
 4.2.3 Specifičnost PCR v realnem času s sondno CC16S za določanje bakterij rodu <i>Alicyclobacillus</i>	50
 4.2.4 Določanje bakterij rodu <i>Alicyclobacillus</i> s PCR v realnem času v umetno kontaminirani vodi z okusom.....	51
 4.2.5 Določanje bakterij rodu <i>Alicyclobacillus</i> s PCR v realnem času v umetno kontaminiranem jabolčnem soku	51
4.3 MOLEKULARNA IDENTIFIKACIJA ŽIVILSKIH IZOLATOV RODU <i>Alicyclobacillus</i> S PCR V REALNEM ČASU	53
5 SKLEPI	54
6 POVZETEK.....	55
7 VIRI.....	57
ZAHVALA	
PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Primeri določanja bakterij rodu <i>Alicyclobacillus</i> s klasičnimi mikrobiološkimi metodami	17
Preglednica 2: Primeri določanja bakterij rodu <i>Alicyclobacillus</i> z alternativnimi metodami	19
Preglednica 3: Sestava dela A gojišča <i>Alicyclobacillus</i> medium	22
Preglednica 4: Sestava dela B gojišča <i>Alicyclobacillus</i> medium	22
Preglednica 5: Sestava dela C gojišča <i>Alicyclobacillus</i> medium	23
Preglednica 6: Sestava gojišča <i>Bacillus acidocaldarius</i> medium	23
Preglednica 7: Laboratorijski aparati	27
Preglednica 8: Optimizacija PCR v realnem času pri koncentracijah CC16S-F/CC16S-R od 50 nM do 900 nM	39
Preglednica 9: Določanje tipskih sevov bakterij rodu <i>Alicyclobacillus</i> s PCR v realnem času	40
Preglednica 10: Občutljivost PCR v realnem času z oligonukleotidnimi začetniki CC16S-F/CC16S-R	41
Preglednica 11: Specifičnost oligonukleotidnih začetnikov CC16S-F/CC16S-R za določanje bakterij rodu <i>Alicyclobacillus</i> s PCR v realnem času	43
Preglednica 12: Občutljivost PCR v realnem času za določanje bakterij rodu <i>Alicyclobacillus</i> v umetno kontaminirani vodi	44
Preglednica 13: Optimizacija PCR v realnem času pri koncentracijah sonde CC16S od 50 nM do 200 nM	46
Preglednica 14: Občutljivost PCR v realnem času s sondom CC16S za določanje čiste DNA bakterij vrste <i>A. acidoterrestris</i>	47
Preglednica 15: Občutljivosti PCR v realnem času s sondom CC16S za določanje bakterij rodu <i>Alicyclobacillus</i>	48
Preglednica 16: Občutljivost PCR v realnem času s sondom CC16S za določanje bakterij rodu <i>Alicyclobacillus</i> s spremenjenimi temperaturno-časovnim programom encimske reakcije	49
Preglednica 17: Specifičnost sonde CC16S za določanje PCR v realnem času za bakterije rodu <i>Alicyclobacillus</i>	50
Preglednica 18: Določanje bakterij rodu <i>Alicyclobacillus</i> s PCR v realnem času v umetno kontaminirani vodi z okusom	51
Preglednica 19: Določanje bakterij rodu <i>Alicyclobacillus</i> s PCR v realnem času v umetno kontaminiranem jabolčnem soku	52
Preglednica 20: Molekularna identifikacija živilskih izolatov rodu <i>Alicyclobacillus</i> s PCR v realnem času	53

KAZALO SLIK

Slika 1: Struktura formula ω -alicikličnih maščobnih kislin: ω -cikloheksilne in ω -cikloheptilne maščobne kisline (Goto in sod., 2007b)	3
Slika 2 (levo): Celice bakterij rodu <i>Alicyclobacillus</i> (A: Mohamed in ElSersy, 2009; B: Mavromatis in sod., 2010)	5
Slika 3: Strukturne formule spojin, ki povzročajo neprijetne vonjave (Goto in sod., 2007b)	9
Slika 4: Poenostavljeni shema razgradnje ferulne kisline do gvajakola z bakterijami vrste <i>A. acidoterrestris</i> (Goto in sod., 2007b)	10
Slika 5: Princip metode PCR (Jeršek, 2009)	12
Slika 6: Princip PCR v realnem času (Applied Biosystems, 2005)	14
Slika 7: Prikaz vezave barvila SYBR® Green I na dvoverižno DNA molekulo med fazo podaljševanja pri PCR v realnem času (Applied Biosystems, 2005)	15
Slika 8: Shema eksperimentalnega dela	20
Slika 9: Velikost fragmentov molekularnega označevalca dolžin pomnožkov na agaroznem gelu (PCR 20 bp Low Ladder, P1598, Sigma, ZDA)	25
Slika 10: Velikost fragmentov molekularnega označevalca dolžin pomnožkov na agaroznem gelu (100 bp DNA Ladder, 15628-019, Invitrogen, ZDA)	25
Slika 11: Shema glavnih stopenj določitve občutljivosti PCR v realnem času za določanje bakterij rodu <i>Alicyclobacillus</i>	29
Slika 12: Shema glavnih stopenj določitve specifičnosti PCR v realnem času za določanje bakterij rodu <i>Alicyclobacillus</i>	30
Slika 13: Shema določitve občutljivosti PCR v realnem času za določanje bakterij rodu <i>Alicyclobacillus</i> v živilu	31
Slika 14: Agarozna gelska elektroforeza pomnožkov bakterij vrst <i>A. acidocaldarius</i> , <i>A. acidoterrestris</i> (A) in <i>A. acidophilus</i> (B)	40
Slika 15: Standardna krivulja PCR v realnem času za določanje bakterij rodu <i>Alicyclobacillus</i> pri 600 nM koncentraciji oligonukleotidnih začetnikov CC16S-F/CC16S-R	42
Slika 16: Standardna krivulja PCR v realnem času za določanje bakterij rodu <i>Alicyclobacillus</i> v umetno kontaminirani vodi	45
Slika 17: Standardna krivulja PCR v realnem času za določanje čiste DNA bakterij vrste <i>A. acidoterrestris</i>	47

KAZALO PRILOG

Priloga A: Občutljivost PCR v realnem času za določanje bakterij rodu *Alicyclobacillus* z oligonukleotidnimi začetniki CC16S-F/CC16S-R (600 nM)

Priloga B: Občutljivost PCR v realnem času za določanje bakterij rodu *Alicyclobacillus* z oligonukleotidnimi začetniki CC16S-F/CC16S-R (900 nM) in s sondom CC16S (200 nM) ter s spremenjenimi temperaturno-časovnim programom encimske reakcije.

Priloga C: Temperature taljenja pomnožkov dobljenih s PCR v realnem času za določanje bakterij rodu *Alicyclobacillus* z oligonukleotidnimi začetniki CC16S-F/CC16S-R (600 nM)

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

A	adenin
ALI	angl. <i>Alicyclobacillus</i> medium
AM	gojišče <i>Alicyclobacillus</i> tekoči ali trdni medij
BAM	gojišče <i>Bacillus acidocaldarius</i> medij
BAT	gojišče <i>Bacillus acidoterrestris</i> medij
BHI	angl. Brain Heart Infusion Broth
bp	bazni par
C	citozin
CC16S-F/CC16S-R	oligonukleotidna začetnika za določanje bakterij rodu <i>Alicyclobacillus</i>
CC16S	oligonukleotidna sonda za določanje bakterij rodu <i>Alicyclobacillus</i>
cfu	kolonijska enota (angl. Colony Forming Unit)
D-vrednost	čas ki je potreben, da se pri določeni temperaturi zmanjša populacija celic za 10 %
DNA	deoksiribonukleinska kislina
EDTA	etylendiamin tetraocetna kislina
EtBr	etidijev bromid
G	gvanin
H ₂ O _{KEM}	bi-destilirana sterilna voda
H ₂ O _{PCR}	sterilna, deionizirana, DNA prosta voda
HGYE	angl. Hiraishi Glucose Yeast Extract medium
MEA	angl. Malt Extract Agar
N ₀	začetno število bakterij
NTC	negativna kontrola
OSA	angl. Orange Serum Agar
PCR	verižna reakcija s polimerazo
PDA	angl. Potato Dextrose Agar
pomnožek	kopija DNA (angl. amplicon)
T	timin
TA	angl. Thermoacidurans Agar
TAE	elektroforetski pufer: tris, ocetna kislina, EDTA
TSA	gojišče triptični soja agar (angl. Tryptic Soya Agar)
YSG	angl. Yeast Starch Glucose medium
ZIM	zbirka industrijskih mikroorganizmov Laboratorijsa za biotehnologijo na Oddelku za živilstvo Biotehniške fakultete
z-vrednost	nam pove za koliko se mora dvigniti temperatura, da se D-vrednost poveča za 10 enot
ŽMJ	mikrobiološka zbirka Laboratorijsa za živilsko mikrobiologijo na Oddelku za živilstvo Biotehniške fakultete

1 UVOD

Pijače so v splošnem razdeljene v dve skupini, na pijače z vrednostjo pH med 3,70 in 4,60 ter na pijače z vrednostjo pH pod 3,70. Večina sadnih pijač spada v drugo skupino, medtem ko paradižnikov, hruškov in figov sok spadajo v prvo skupino. Nizka vrednost pH služi kot naravna obramba proti kvaru, saj je le nekaj mikroorganizmov, ki lahko preživijo v takih razmerah. Ene izmed teh izjem so tudi bakterije rodu *Alicyclobacillus*, ki so termo-acidofilne, aerobne, nepatogene ter sporogene bakterije (Smit in sod., 2011).

Pred leti so bili za kvar sadnih sokov glavni krivci kvasovke, plesni in mlečno-kislinske bakterije. Leta 1984 so v Nemčiji poročali o prvem večjem kvaru jabolčnega soka zaradi bakterij vrste *Alicyclobacillus acidoterrestris* in vse do danes so se primeri vrstili po celi svetu. Do danes so bakterije rodu *Alicyclobacillus* kot povzročitelje kvara povezali z kvarom jabolčnega, hruškovega, pomarančnega, breskovega, mangovega soka ter soka belega grozdja. Prav tako so jih povezali z kvarom mešanih sokov ter paradižnikovega soka in paradižnika v konzervah (Groenewald in sod., 2009; Smit in sod., 2011).

Bakterije vrste *A. acidoterrestris* lahko rastejo pri vrednosti pH 2,5-6. Spore teh bakterij in tudi vegetativne celice, lahko preživijo standardni postopek pasterizacije, kar je velika nevarnost za proizvajalce sadnih sokov. Na podlagi teh raziskav razmišljajo o razvoju novega postopka pasterizacije kislih produktov. Glavni vir okužbe z bakterijami rodu *Alicyclobacillus* je zemlja na površini sadja ter kontaminirana procesna voda. (Groenewald in sod., 2008; Smit in sod., 2011; Steyn in sod., 2011a)

Klasične mikrobiološke metode za izolacijo in identifikacijo bakterij rodu *Alicyclobacillus* so najenostavnnejše in najcenejše metode za rutinske analize, vendar so dolgotrajne in neprimerne za analizo velikega števila vzorcev, saj so rezultati znani šele v 3-7 dneh. Problem klasičnih mikrobioloških metod je tudi v selektivnosti gojišč za bakterije rodu *Alicyclobacillus*, saj ta lahko poleg spodbujanja rasti preiskovanih bakterij in inhibicije rasti drugih bakterij, inhibirajo tudi določene vrste bakterij rodu *Alicyclobacillus*. Neprimernost za analizo velikega števila vzorcev in dolgotrajnost klasičnih metod pri določanju bakterij rodu *Alicyclobacillus* je vzrok za razvoj vrsto alternativnih metod, kot so metode, ki temeljijo na verižni reakciji z polimerazo (PCR) (Steyn in sod., 2011c).

Pri našem eksperimentalnem delu smo uporabili alternativno metodo PCR v realnem času, ki je izboljšan klasični PCR. PCR v realnem času je bolj občutljiva in specifična metoda, kjer se uporablajo specifični oligonukleotidni začetniki in specifične oligonukleotidne sonde. Metoda PCR v realnem času je primerna za analizo velikega števila vzorcev in s tem primerna tudi za rutinske analize v industrijskem merilu. Za metodo PCR v realnem času je značilna tudi dobra ponovljivost in omogoča kvantitativno merjenje (Arya in sod., 2005).

1.1 CILJI NALOGE

Namen našega dela je bil postaviti protokol za PCR v realnem času za določanje bakterij rodu *Alicyclobacillus*. Za izhodišče smo vzeli protokol za klasičen PCR in ga prilagodili tako, da bi optimalno deloval pri PCR v realnem času.

Z uvedbo in postavitvijo PCR v realnem času za določanje bakterij rodu *Alicyclobacillus* bomo glede na klasičen PCR:

- skrajšali in poenostavili potek določanja omenjenih bakterij,
- povečali specifičnost določanja omenjenih bakterij,
- in izboljšali občutljivost določanja omenjenih bakterij.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

Predpostavljam, da bomo s postavitvijo in uvedbo PCR v realnem času za določanje bakterij rodu *Alicyclobacillus* glede na klasičen PCR povečali specifičnost in izboljšali občutljivost določanja, ter da bomo v primerjavi s klasičnimi mikrobiološkimi metodami določanja bakterij rodu *Alicyclobacillus*, skrajšali in poenostavili postopek določanja omenjenih bakterij.

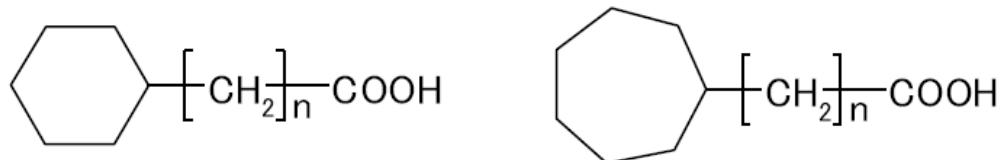
2 PREGLED OBJAV

2.1 BAKTERIJE RODU *Alicyclobacillus*

2.1.1 Zgodovina in klasifikacija

Uchino in Doi (1967) sta prva izolirala in opisala termofilne in acidofilne bakterije iz termalnega vrelca na Japonskem. Kljub temu da so bile njihove endospore drugače oblikovane in so bile bakterije bolj acidofilne in aerobne kot *Bacillus coagulans* in *Bacillus stearothermophilus*, ki sta bili najbolj poznani termofilni vrsti tistega časa, so jih na podlagi morfološki lastnosti uvrstili kot nove seve bakterije *B. coagulans*.

Nekaj let kasneje so znastveniki odkrili morfološko podobne organizme v gejzirju v nacionalnem parku Yellowstone in v zemlji v nacionalnem parku Hawaii Volcanoes (Darland in Brock, 1971) ter v termalnem vrelcu v Pisciarelli v Italiji (De Rosa in sod., 1971). Darland in Brock sta izolirala bakterije iz različnih vzorcev zemlje in vode, ki so bile zelo podobne bakterijam, ki sta jih nekaj let prej izolirala Uchino in Doi. Le-te so klasificirali v novo vrsto *Bacillus acidocaldarius*. Te bakterije so poleg termofilnih-acidofilnih lastnosti vsebovale še aliciklične končne skupine v strukturi maščobnih kislin. Te izrazite ω -cikloheksilne maščobne kisline (slika 1) so glavna komponenta esencialnih maščobnih kislin teh bakterij.



Slika 1: Strukturna formula ω -alicikličnih maščobnih kislin: ω -cikloheksilne in ω -cikloheptilne maščobne kisline (Goto in sod., 2007b)

Hippchen in sod. (1981) so poskušali najdi organizme sorodne bakterijam *B. acidocaldarius* in so izolirali ducat termo-acidofilnih bakterij iz zemlje. Ti organizmi so imeli podobno sestavo kot bakterije vrst *B. acidocaldarius*, vendar točne povezanosti niso uspeli določiti. Opazili so tudi, da so bili ti organizmi vključeni v kvar živil (Uchino in Doi, 1967) in leta 1984 so ga Cerny in sod. tudi dokazali. Iz pokvarjenega jabolčnega soka so izolirali bakterijske seve sorodnim tistim, ki so jih Hippchen in sod. leta 1981 izolirali. Naknadno so te organizme uvrstili v novo vrsto *Bacillus acidoterrestris* (Deinhard in sod., 1987). Tretje termo-acidofilne bakterije, ki so bile drugačne od bakterij vrst *B. acidocaldarius* in *B. acidoterrestris* sta opisala Poralla in König (1983). Razlikovale so se po tem, da so imele membrano sestavljeno pretežno iz ω -cikloheptilnih maščobnih kislin.

Naknadno so bile uvrščene v novo vrsto *Bacillus cycloheptanicus* (Poralla in König, 1983; Deinhard in sod., 1987).

Wisotzkey in sod. (1992) so izvedli 16S rRNA sekvenčno analizo na termofilnih vrstah *Bacillus acidocaldarius*, *Bacillus acidoterrestris* in *Bacillus cycloheptanicus*. Analiza je pokazala, da so te tri vrste bakterij bolj podobne med seboj kot z ostalimi vrstami bakterij rodu *Bacillus*. Bakterije vrst *B. acidocaldarius*, *B. acidoterrestris* in *B. cycloheptanicus* so poleg sorodnosti vsebovale še posebne ω -aliciklične maščobne kisline, zato rej so Wisotzkey in sod. (1992) predlagali, da se preimenujeno v nov rod *Alicyclobacillus*.

V nadaljnjih letih se je trem vrstam rodu *Alicyclobacillus* dodajalo vedno nove vrste, ki so bile izolirane iz različnih okolijih. Bakterije rodu *Sulfbacillus* so uvrstile v rod *Alicyclobacillus* (Karavaiko in sod., 2005). Izolacija bakterij vrste *Alicyclobacillus pomorum* je pripeljala so spremembe opisa bakterij rodu *Alicyclobacillus*, saj vrsta ni vsebovala ω -alicikličnih maščobnih kislin (Goto in sod., 2003). Goto in sod. so (2006) predlagali spremembo opisa bakterij vrste *A. acidocaldarius* z vključitvijo podvrste *A. acidocaldarius* subsp. *rittmannii* (Nicolaus in sod., 1998) in še dandanes je poznana kot podvrsta vrste *A. acidocaldarius*.

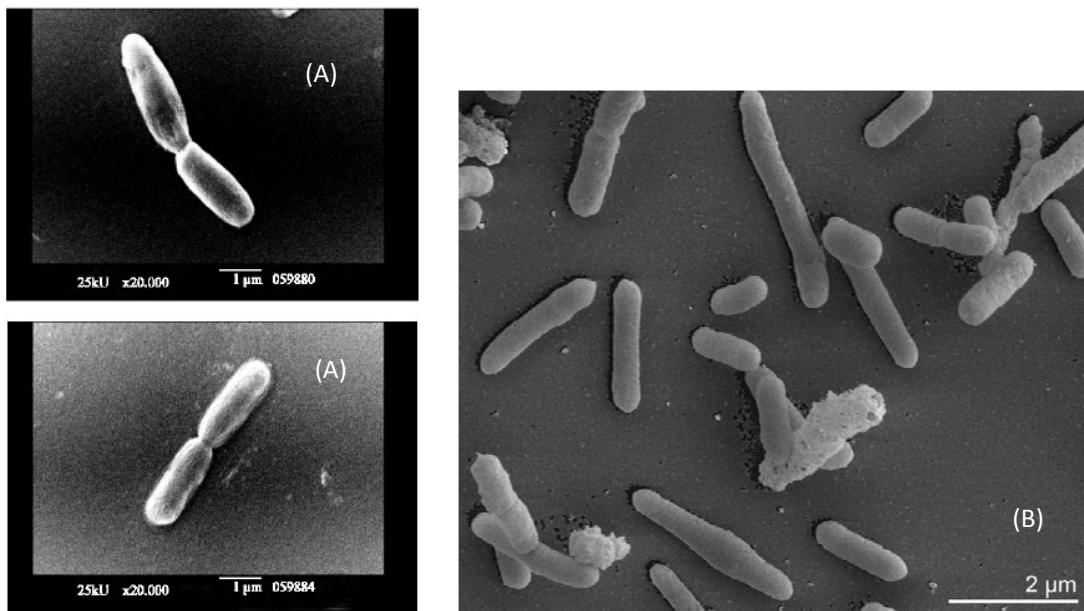
Do danes je v rod *Alicyclobacillus* vključenih 19 vrst, dve podvrsti in dve genomske vrsti. Poleg zgoraj omenjenih so še: *A. mali* (Kusano in sod., 1997, cit. po Goto in sod., 2007b), *A. hesperidum* (Albuquerque in sod., 2000), *Alicyclobacillus* genomska vrsta 1 (Albuquerque in sod., 2000), *Alicyclobacillus* genomska vrsta 2 (Albuquerque in sod., 2000), *A. acidiphilus* (Matsubara in sod., 2002), *A. herbarius* (Goto in sod., 2002a), *A. sendaiensis* (Tsuruoka in sod., 2003), *A. vulcanalis* (Simbahan in sod., 2004), *A. disulfidooxidans* (Karavaiko in sod., 2005), *A. tolerans* (Karavaiko in sod., 2005), *A. contaminans* (Goto in sod., 2007a), *A. fastidiosus* (Goto in sod., 2007a), *A. kakegewensis* (Goto in sod., 2007a), *A. macrosporangioides* (Goto in sod., 2007a), *A. sacchari* (Goto in sod., 2007a), *A. shizuokensis* (Goto in sod., 2007a), *A. ferrooxydans* (Jiang in sod., 2008), *A. pohliae* (Imperio in sod., 2008) in *A. aeris* (Guo in sod., 2009).

2.1.2 Lastnosti bakterij rodu *Alicyclobacillus*

2.1.2.1 Splošne lastnosti

Bakterije rodu *Alicyclobacillus* so termo-acidofilne, aerobne, nepatogene ter paličaste oblike, ki formirajo endospore (slika 2). Vse vrste so grampozitivne z izjemo vrste *Alicyclobacillus sendaiensis*, ki je gramnegativna (Tsuruoka in sod., 2003). Pri večini vrst je analiza starejših kultur pokazala da so bakterije gramvariabilne (Darland in Brock, 1971; Karavaiko in sod., 2005; Goto in sod., 2007). Uvrstitev vrst kot gramvariabilne bi bilo sporno, saj dejavniki kot so starost kulture, čas razbarvanja celic po barvanju ter fiziologija

celične stene in membrane, vplivajo na rezultat. Vse vrste so aerobne razen bakterij vrste *Alicyclobacillus pohliae*, ki so včasih fakultativno aerobne (Imperio in sod., 2008). Večina je gibljivih z izjemo bakterij vrst *A. acidocaldarius* subsp. *rittmanni* (Nicolaus in sod., 1998), *A. herperidum*, *Alicyclobacillus* genomska vrsta 1 (Albuquerque in sod., 2000), *A. sendaiensis* (Tsuruoka in sod., 2003), *A. tolerans*, *A. disulfidooxidans* (Karavaiko in sod., 2005), *A. fastidiosus* (Goto in sod., 2007), *A. ferrooxydans* (Jiang in sod., 2008).



Slika 2 (levo): Celice bakterij rodu *Alicyclobacillus* (A: Mohamed in ElSersy, 2009; B: Mavromatis in sod., 2010)

Temperatura rasti je za vse vrste 20-70 °C (Wisotzkey in sod., 1992; Goto in sod., 2007; Jiang in sod., 2008). Izjeme so bakterije vrst *A. disulfidooxidans*, *A. tolerans* (Karavaiko in sod., 2005) in *A. ferrooxydans* (Jiang in sod., 2008), ki so sposobne rasti tudi pri temperaturi pod 20 °C. Optimalno območje rasti za bakterije rodu *Alicyclobacillus* je med 35-65°C (Albuquerque in sod., 2000; Goto in sod., 2003; Imperio in sod., 2008). Območje vrednosti pH, kjer so bakterije sposobne rasti je med 2,00 in 6,50 (Wisotzkey in sod., 1992; Simbahan in sod., 2004; Jiang in sod., 2008). Ponovno izjemi sta vrsti *A. disulfidooxidans* in *A. tolerans* (Karavaiko in sod., 2005), ki sta sposobni rasti pri pH vrednosti pod 1,50. Optimalno območje vrednosti pH je med 3,00 in 5,50 (Walls in Chuyate, 1998; Matsubara in sod., 2002), z izjemo vrst *A. disulfidooxidans* in *A. tolerans*, ki imata optimum med 1,50 in 2,00 (Karavaiko in sod., 2005).

Tako kot pri bakterijah rodu *Bacillus* tudi bakterije rodu *Alicyclobacillus* potrebujejo visoko vodno aktivnost ($a_w > 0,9$). V sadnih sokovih (odvisno od vrste) so odkrili, da celice lahko rastejo pri 10 °Brix z zgornjo mejo 18-20 °Brix (Splittstoesser in sod., 1994; Walls in Chuyate, 1998). Spore preživijo tudi pri 60 °Brix, kljub temu da je to območje brez

celične rasti (na primer koncentrirani sadni sokovi). Splitstoesser in sod. so (1998) potrdili, da se toplotna odpornost spor bakterij rodu *Alicyclobacillus* postopoma zvišuje z zviševanjem stopinj °Brix (Goto in sod., 2007b).

Bakterije rodu *Alicyclobacillus* so striktni aerobni organizmi. Koncentracija raztopljenega kisika, ki še dovoljuje rast celic je 0,1 %, kar je odvisno od stanja kulture (Cerny in sod., 2000). Rast celic poneha, če se kisik izčrpa, kljub temu da so ostala hranila na voljo. V tej točki vegetativne celice sporulirajo (Goto in sod., 2007b). Rast bakterij rodu *Alicyclobacillus* je bila v celoti ustavljena pri 6 % koncentraciji etanola (Splitstoesser in Churey, 1996), medtem ko etanol ni vplival na spore (Goto in sod., 2007b).

2.1.2.2 Struktura membran

Ena izmed lastnosti, ki razlikuje bakterije rodu *Alicyclobacillus* od bakterij rodu *Bacillus*, je prevladajoča vsebnost ω -alicikličnih maščobnih kislin v celičnih membranah. Pri sevih *A. acidocaldarius*, izoliranih v Italiji, so našli kar 70 % vsebnost ω -cikloheksalnih maščobnih kislin (De Rosa in sod., 1971). Oshima in Ariga (1975) sta ugotovila, da sevi *A. acidocaldarius* izolirani iz termalno-kislega okolja na Japonskem, vsebujejo v celičnih membranah med 74-93 % ω -cikloheksilnih maščibnih kislin. Raziskava zgradbe celičnih membran bakterij vrste *A. acidoterrestris* so pokazale, odvisno od seva, da ω -cikloheksalne maščobne kisline predstavljajo 15-91 % vsebnosti vseh maščobnih kislin (Hippchen in sod., 1981).

Vrsta ω -alicikličnih maščobnih kislin najdenih v membranah bakterij rodu *Alicyclobacillus* ni omejena na ω -cikloheksalne maščobne kisline, saj so bile najdene tudi ω -cikloheptilne maščobne kisline (Poralla in König, 1983; Deinhard in sod., 1987b). Izmed do sedaj znanih 23 vrst, podvrst in genomskeh vrst, jih 14 vsebuje ω -cikloheksalne maščobne kisline kot prevladajočo komponento med maščobnimi kislinami. To so vrste *A. acidocaldarius* (Uchino in Doi, 1967; Wisotzkey in sod., 1992), *A. acidocaldarius* subsp. *acidocaldarius* (Goto in sod., 2006), *A. acidoterrestris* (Hippchen in sod., 1981; Wisotzkey in sod., 1992; Walls in Chuyate, 1998), *A. hesperidum*, *Alicyclobacillus* genomska vrsta 1 (Albuquerque in sod., 2000), *Alicyclobacillus* genomska vrsta 2 (Goto in sod., 2002b), *A. acidocaldarius* subsp. *rittmannii* (Nicolaus in sod., 1998), *A. acidiphilus* (Matsubara in sod., 2002), *A. sendaiensis* (Tsuruoka in sod., 2003), *A. vulcanalis* (Simbahan in sod., 2004), *A. tolerans* (Karavaiko in sod., 2005), *A. disulfidooxidans* (Dufresne in sod., 1996; Karavaiko in sod., 2005), *A. fastidiosus* ter *A. sacchari* (Goto in sod., 2007a). Štiri vrste bakterij rodu *Alicyclobacillus* vsebujejo ω -cikloheptilne maščobne kisline kot prevladujočo komponento: *A. cycloheptanicus* (Poralla in König, 1983; Deinhard in sod., 1987b; Wisotzkey in sod., 1992), *A. herbarius* (Goto in sod., 2002a), *A. kakegawensis* ter *A. shizuokensis* (Goto in sod., 2007a).

V zgradbi membran bakterije vrste *A. pomorum* se namesto ω -alicikličnih maščibnih kislin nahajajo nasičene ravne in/ali razvejane verige maščobnih kislin, podobno kot pri bakterijah rodu *Bacillus*. Na podlagi rezultatov sekvenčne analize 16S RNA so bakterije vrste *A. pomorum* nazadnje le uvrstili v rod *Alicyclobacillus*. To odkritje je spremenilo opis lastnosti bakterij rodu *Alicyclobacillus*, saj v rod uvrstili tudi bakterije ki ne vsebujejo ω -alicikličnih maščobnih kislin (Goto in sod., 2003). Podobno zgradbo celične membrane imajo še 4 vrste rodu *Alicyclobacillus* in to so *A. contaminans*, *A. macrosporangioides* (Goto in sod., 2007a), *A. pohliae* (Imperio in sod., 2008) ter *A. ferrooxydans* (Jiang in sod., 2008).

2.1.2.3 Toplotna odpornost spor

Ravno tako kot pri bakterijah rodov *Bacillus* in *Clostridium* je toplotna odpornost spor bakterij rodu *Alicyclobacillus* odvisna od temperature med formiranjem endospor, časa dozorevanja spor, hranil v mediju ter drugih dejavnikov. Toplotna odpornost spor bakterij rodu *Alicyclobacillus* naj bi bila nižja kot toplotna odpornost spor bakterij vrst *Bacillus stearothermophilus*, *B. subtilis*, *Clostridium botulinum* in *Cl. tetani*. Z današnjimi pasterizacijskimi tehnikami za kisla živila je možnost, da spore preživijo in lahko povzročijo kvar le-tega (Goto in sod., 2007b).

Izvedene so bile številne raziskave temperaturne odpornosti endospor bakterij rodu *Alicyclobacillus* v različnih razmerah in medijih. Za različne seve *A. acidoterrestris* so določali dve D-vrednosti, D_{95} in D_{90} . V jabolčnem soku, grozdnem soku, brusničnem soku, pomarančnem soku, sadnem napitku, sadnem nektarju, ekstraktu kakavovca, soku grenivke, mangovi kaši, bistrem limoninem soku in motnem limoninem soku je bila D_{95} -vrednost določena v območju med 1,00 in 9,98 min. D_{90} -vrednost se je določala v jabolčnem soku, grozdnem soku, pomarančnem soku, soku grenivke, bistrem jabolčnem napitku, pomarančnem napitku, jabolčni nektar brez askorbinske kisline, jabolčni nektar z askorbinsko kislino ter mangovi kaši, kjer so določili vrednost med 5,95 in 23,10 min (Smit in sod., 2011). V sadnih produktih je bila določena Z-vrednost v območju med 6,90 in 21,27 °C (Splittstoesser in sod., 1994; McIntyre in sod., 1995; Komitopoulou in sod., 1999; Bahçeci in Acar, 2007; De Carvalho in sod., 2008) in v pufrih je bila določena v območju med 5,90 in 10,00 °C (Pontius in sod., 1998; Murakami in sod., 1998; Alpas in sod., 2003; Bahçeci in Acar, 2007).

Toplotna odpornost spor bakterij rodu *Alicyclobacillus* je odvisna od temperature, vrednosti pH, vsebnosti suhe snovi, vrste ali seva bakterij, vodne aktivnosti, prisotnosti divalentnih kationov, sporulacijske temperature, temperaturne obdelave spor, prisotnosti organskih kislin, tipa sadnega soka, vpliva drugih snovi (nizin, lizocim, emulgator ipd), starosti spor, modulov za napovedanje toplotne odpornosti (Goto in sod., 2007b; Smit in sod., 2011).

2.1.3 Bakterije rodu *Alicyclobacillus* kot kvarljivci

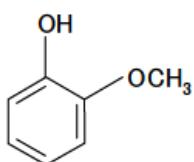
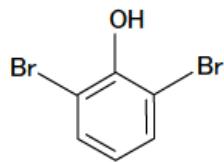
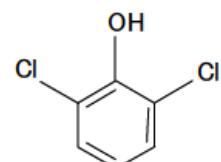
Leta 1984 so Cerny in sod. v Nemčiji kot prvi dokumentirali bakterije *Alicyclobacillus* kot povzročitelje kvarjenja jabolčnega soka. Vse do danes so se bakterije rodu *Alicyclobacillus* kot povzročitelji kvarjenja pojavljale v različnih sadnih sokovih (Splittstoesser in sod., 1994; Yamazaki in sod., 1996b; Jensen, 2000; Matsubara in sod., 2002), mešanih sadnih sokovih (Splittstoesser in sod., 1994; Jensen in Whitfield, 2003; Goto in sod., 2003), gaziranih sadnih pijačah (Pettipher in Osmundson, 2000; Gouws in sod., 2005), sadnih kašah (Gouws in sod., 2005), vodi z limonado in izotonični vodi (Yamazaki in sod., 1996b), ledenem času (Doung in Jensen, 2000) in celo v narezanih konzerviranih paradižnikih (Walls in Chuyate, 1998) po celem svetu.

Težave povezane z bakterijami rodu *Alicyclobacillus* so razširjene po vsem svetu. V ZDA je leta 1998 GMA (Grocery Manufacturers Association), prej imenovana NFPA (National Food Processors Association), izvedla anketo, ki je pokazala, da je kar 35 % proizvajalcev sadnih sokov že imelo opravka z kvarjenjem, ki so ga povzročile bakterije rodu *Alicyclobacillus* (Walls in Chuyate, 1998). Kvarjenje se je največkrat pojavilo spomladsi ali poleti in najpogosteje v jabolčnem soku, kjer se je kvarjenje kazalo kot prisotnost neprijetnega vonja in aroma, z ali brez usedline (Doung in Jensen, 2000) ter kot razbarvanost in motnost produkta. Bakterije rodu *Alicyclobacillus* povzročajo kvarjenje brez proizvodnje plina (Splittstoesser in sod., 1994; Doung in Jensen, 2000), zato je kvarjenje težje določiti (Walls in Chuyate, 1998). Leta 2005 je AIJN (European Fruit Juice Association) tudi izvedla anketo, ki je poleg predelovalcev sadja vključevala tudi proizvajalce embalaže, sadja in konzerv. V treh letih trajanja ankete je kar 45 % predelovalcev poročalo o kvarjenju zaradi bakterij rodu *Alicyclobacillus* (Smit in sod., 2011).

Neprijetne vonjave in arome, ki so posledica aktivnosti bakterij rodu *Alicyclobacillus*, so določili kot kemijsko spojino gvajakol (Yamazaki in sod., 1996b; Jensen, 2000; Gocmen in sod., 2005; Siegmund in Pöllinger-Zierler, 2006), ki je bil opisan kot zdravilen, dezinfekcijski, antiseptrični ter z vonjem po dimu (Wasserman, 1966; Duong in Jensen, 2000; Pettipher in Osmundson, 2000; Gocmen in sod., 2005). Kot povzročitelji nezaželenih arom so poleg prevladujočega gvajakola prisotni tudi halofenoli, med katere spadata 2,6-diklorofenol (2,6-DCP) (Jensen in Whitfield, 2003; Gocmen in sod., 2005) in 2,6-dibromofenol (2,6-DBP) (slika 3) (Borlinghaus in Engel, 1997; Jensen, 2000; Gocmen in sod., 2005; Siegmund in Pöllinger-Zierler, 2006).

Bakterije vrste *A. acidoterrestris* so glavne povzročiteljice kvarjenja (Yamazaki in sod., 1996b; Walls in Chuyate, 1998; Jensen in Whitfield, 2003), vendar so tudi druge vrste kazale sposobnost proizvajanja gvajakola in halofenolov ali pa so bile le izolirane iz pokvarjenih živil. Te vrste so *A. acidophilic* (Matsubara in sod., 2002; Goto in sod., 2008),

A. pomorum (Goto in sod., 2003), *A. hesperidum*, *A. herbarius* (Goto in sod., 2008), *A. cycloheptanicus* (Gocmen in sod., 2005) in *A. acidocaldarius* (Gouws in sod., 2005). Bakterije vrste *A. acidocaldarius* so našli kot povzročitelje kvara v nekoncentriranih paradižnikovih produktih. V le-teh niso našli gvajakola, ampak so s plinsko kromatografijo in masno spektrometrijo (GC-MS) našli 2-metiltetrahidrotifoen-3-ena kot razlog za neprijetne aromе (Lottici in sod., 2006). Neprijetne vonjave in aromе niso omejene na bakterije vrste *A. acidoterrestris* in gvajakol, vendar so razširjene tudi na druge vrste bakterij *Alicyclobacillus* in druge povzročitelje neprijetnih vonjav.

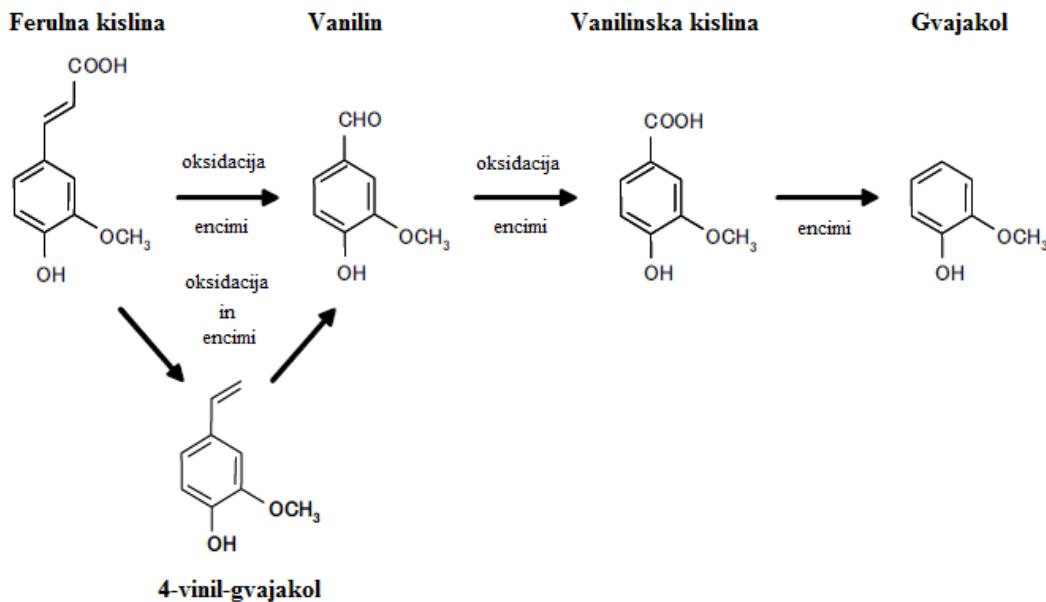
**2-metoksifenol****2,6-dibromofenol****2,6-diklorofenol**

Slika 3: Strukturne formule spojin, ki povzročajo neprijetne vonjave (Goto in sod., 2007b)

2.1.3.1 Gvajakol

Gvajakol (2-metoksifenol) je aromatska ogljikova spojina neprijetnega vonja, ki je lahko v živilih zaželenata ali nezaželenata. Zaradi svoje aromе po dimu je zaželen v produktih kot so pražena kava (Mayer in sod., 1999), dimljem losos (Varlet in sod., 2006), ječmenov slad (Chang in Kang, 2004). Bolje je poznan gvajakol kot neprijetna aroma vin (Simpson in sod., 1986; Álvarez-Rodríguez in sod., 2003), čokoladnega mleka (Jensen in sod., 2001), čokoladnega sladoleda (Saxby, 1996), vanilijevega jogurta (Whitfield, 1998) ter sadnih sokov (Cerny in sod., 1984; Splitstoesser in sod., 1994; Walls in Chuyate, 1998).

Prisotnost gvajakola v živilih je lahko posledica toplotne razgradnje prekurzorjev gvajakola (pri pečenih živilih) (Mayer in sod., 1999) ter metabolne aktivnosti mikrobov (Chang in Kang, 2004). Gvajakol je produkt pri razgradnji ferulne kisline, ki je zelo razširjena v naravi in je tudi sestavina lignina. Bakterije vrste *A. acidoterrestris* lahko z svojimi encimi proizvedejo gvajakol iz vanilina in vanilinske kisline (Smit in sod., 2011) (slika 4).



Slika 4: Poenostavljena shema razgradnje ferulne kisline do gvajakola z bakterijami vrste *A. acidoterrestris* (Goto in sod., 2007b)

2.1.3.2 Halofenoli

Bakterije rodu *Alicyclobacillus* lahko proizvajajo poleg prevladujočega gvajakola tudi halofenole, med katere spadata 2,6-dibromofenol in 2,6-diklorofenol. Le-te imajo medicinske, dezinfekcijske ali antiseptične vonjave in arome (Jensen, 2000; Gocmen in sod., 2005). Halofenoli so prisotni v nižjih koncentracijah kot gvajakol, kar je lahko razlog, da se ga lažje zaznava (Jensen, 2000).

Halofenoli so prisotni v živilih zaradi kemijske kontaminacije (Mottram, 1998) ali zaradi aktivnosti organizmov (Chang in Kang, 2004). Do kemijske kontaminacije lahko pride pri čiščenju proizvodnjih linij, kadar se uporablja šibke halogenske raztopine. Posledica je tvorba halofenolov (Mottram, 1998). Nekateri organizmi lahko sintetizirajo halofenole, zatorej tudi bakterije rodu *Alicyclobacillus* lahko vsebujejo encime, ki lahko sintetizirajo te komponente (Chang in Kang, 2004).

Kljudno temu, da so v večini primerov zaznali prisotnost halofenolov skupaj z prisotnostjo gvajakola (Gocmen in sod., 2005), so jih zaznali tudi v odsotnosti gvajakola (Baumgart in sod., 1997; Borlinghaus in Engel, 1997; Jensen, 2000). Tvorba halofenolov je specifična glede na sev ali vrsto (Gocmen in sod., 2005). Gocmen in sod. (2005) so ugotovili, da so tri vrste bakterij rodu *Alicyclobacillus* tvorile poleg gvajakola tudi 2,6-dibromofenol in 2,6-diklorofenol. Bakterije vrste *A. cycloheptanicus* so tvorile obe arome 2,6-dibromofenol in 2,6-diklorofenol, medtem ko *A. acidoterrestris* so tvorile samo 2,6-dibromofenol ter

bakterije vrste *A. hesperidum* samo 2,6-diklorofenol. V nekaterih primerih je bila tvorba teh komponent odvisna od časa. Bakterij vrste *A. cycloheptanicus* so do 14 dne raziskave tvorili samo gvajakol in 2,6-dibromofenol, vendar do 28 dne raziskave je bil prisoten tudi 2,6-diklorofenol.

2.2 VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO

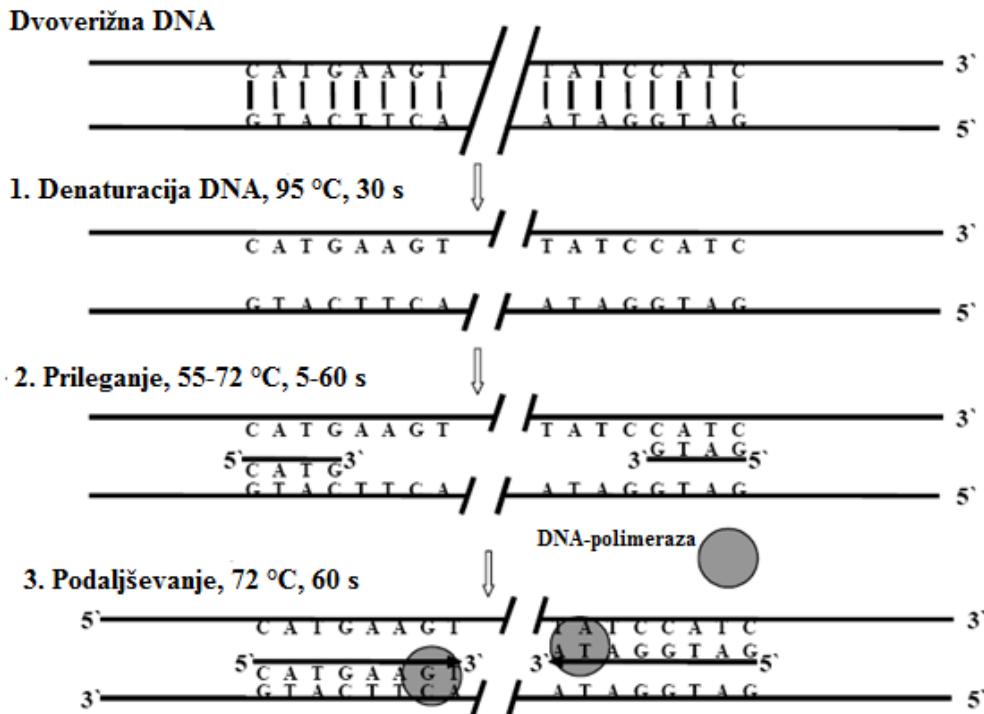
Verižna reakcija s polimerazo (angl. polymerase chain reaction, PCR) je ena izmed najbolj uporabnih metod v molekularni biologiji, ki se uporablja tudi za določanje in ugotavljanje mikroorganizmov v živilih in različnih drugih vzorcih. Pomembna področja uporabe metode PCR so tudi klinična diagnostika, genski inženiring in forenzične analize (Clark, 2005; Jeršek, 2009).

2.2.1 Princip PCR

Princip same reakcije PCR je *in vitro* pomnožitev dela tarčne DNA z DNA-polimerazo v cikličnem termostatu. Metoda omogoča pomnožitev specifičnih delov tarčne molekule DNA. Termostabilna DNA-polimeraza je encim, ki so ga izolirali iz termofilnih bakterij vrste *Thermus aquaticus*. Encim ima optimalno temperaturo 72 °C in ohranja svojo aktivnost tudi, če je krajši čas na višjih temperaturah, ki so potrebne za denaturacijo dvoverižne DNA. Poseben termostat zagotavlja zvezno spreminjanje temperature v ciklu, ki zajema tri faze (slika 5) (Clark, 2005; Jeršek, 2009):

- **1. Denaturacija DNA:**
Denaturacija dvojne vijačnice molekule DNA, tako da nastaneta dve enoverižni molekuli DNA. Prva faza poteka 30 s pri 95 °C
- **2. Prileganje oligonukleotidnih začetnikov:**
Prileganje specifičnih oligonukleotidnih začetnikov na komplementarno mesto tarčne molekule DNA. Druga faza poteka 5-60 s pri temperaturi 55-72 °C, ki je odvisna od sestave oligonukleotidnih začetnikov
- **3. Podaljševanje DNA:**
Podaljševanje molekule DNA s pomočjo termostabilne DNA-polimeraze. Sinteza poteka pri 72 °C, ki je tudi optimalna temperatura za delovanje DNA-polimeraze. Ker je termostabilen, ostane aktiven tudi med denaturacijo dvoverižne DNA, kjer se temperatura dvigne do 95 °C. Zadnja faza poteka 60 s, vendar je trajanje odvisno od dolžine pomnožka.

V vsakem ciklu se število tarčnih kopij podvoji. S 25-35 ponovitvami koncentracija pomnoženega dela DNA eksponentno pomnoži tudi do 10^9 kopij (Jeršek, 2009).



Slika 5: Princip metode PCR (Jeršek, 2009)

Za uspešno pomnoževanje dela DNA je potrebna reakcijska mešanica, ki poleg tarčnih molekul DNA, vsebuje termostabilno DNA-polimerazo, deoksinukleotid trifosfate (dNTP: dNTA, dNTT, dNTG, dNTC), ione Mg^{2+} , reakcijski pufer in par oligonukleotidnih začetnikov. Vsak potek PCR moramo glede na izvedbo in namen optimizirati (določiti temperature in čase v ciklusu, število ponovitev ciklusa in določiti sestavo reakcijske mešanice) (Jeršek, 2009).

Pomnožke PCR njenostavneje ugotovimo z agarozno gelsko elektroforezo tako, da njihovo velikost primerjamo z molekularnim označevalcem z znanimi velikostimi fragmentov. Specifičnost pomnožitve moramo kontrolirati s hibridizacijo z interno DNA-sodno, z restrikcijo ali s sekveniranjem pomnožka (Jeršek, 2009).

2.3 VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO V REALNEM ČASU

V analitiki živil so metode, ki temeljijo na preiskavah DNA, zelo pomembne zaradi visoke občutljivosti in specifičnosti. Ti dve lastnosti omogočajo, da lahko določimo zelo majhne količine DNA ali RNA v preiskovanem vzorcu. Z metodami na osnovi PCR lahko določamo patogene mikrobe, kvarljivce, gensko spremenjene organizme, alergene v živilih ter avtentičnost oz. potvorbe živil. PCR v realnem času je prisotna in pomembna na različnih področjih ter jo je mogoče v veliki meri standardizirati in avtomatizirati (Jeršek, 2009).

2.3.1 Princip PCR v realnem času

PCR v realnem času je izboljšava klasičnega PCR (Mackay, 2004). Reakcija poteka v cikličnem termostatu, kjer se temperatura zvezno spreminja v ponavljajočih se ciklih tako kot pri klasičnem PCR. Vsak cikel poteka v dveh fazah (Jeršek, 2009):

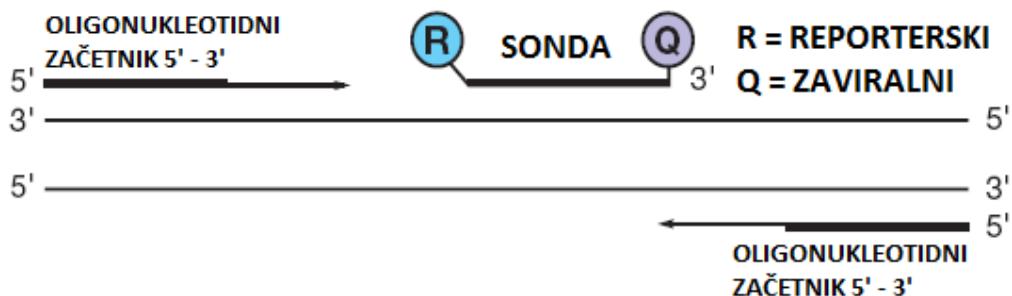
- denaturacija DNA pri temperaturi višji od 90 °C
- prileganje oligonukleotidnih začetnikov (in oligonukleotidne sonde) in podaljševanje DNA pri temperaturi 50-60 °C z DNA-polimerazo.

Nastale pomnožke določimo med samo encimsko reakcijo in s tem prihranimo delo, čas in material za določanje pomnožka z gelsko elektroforezo. Glavna razlika med klasičnim PCR in PCR v realnem času je ravno v določanju pomnožka. PCR v realnem času omogoča sprotno spremjanje nastajanja pomnožka in/ali količine pomnožka s fluorogenim označevanjem oligonukleotidnih začetnikov, sond ali pomnožkov. Povečanje količine pomnožka zaznamo kot povečanje fluorescentnega signala, ki je posledica povezave med fluorogenim barvilm in pomnožkom oz. njune hibridizacije (Mackay, 2004; Jeršek, 2009). Tako kot pri klasičnem PCR se tudi pri PCR v realnem času v vsakem ciklu število taršnih kopij podvoji. S 30-40 ponovitvami cikla se koncentracija pomnoženega dela DNA eksponentno pomnoži tudi do 10^9 kopij (Jeršek, 2009).

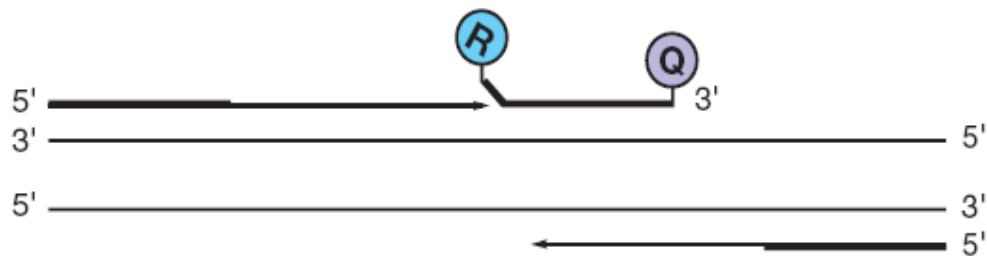
Zaradi fluorogenih barvil, ki so vezana na oligonukleotidne začetnike, specifične sonde ali pomnožke, je specifičnost PCR v realnem času večja kot pri klasičnem PCR. S PCR v realnem času lahko količino pomnožka tudi kvantificiramo. PCR v realnem času je zaprt sistem in zato so možnosti za kontaminacijo okolja in navzkrižno kontaminacijo vzorcev mnogo manjše kot pri klasičnem PCR (Jeršek, 2009).

Princip metode PCR v realnem času je prikazan na sliki 6.

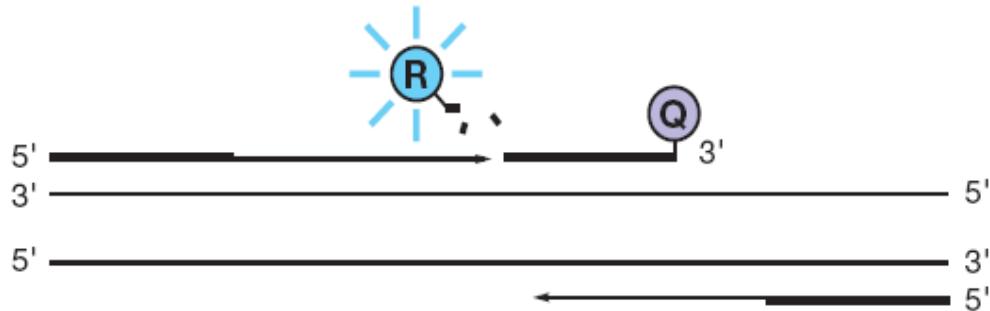
Faza 1: Prileganje oligonukleotidnih začetnikov in sonde na enoverižne DNA.



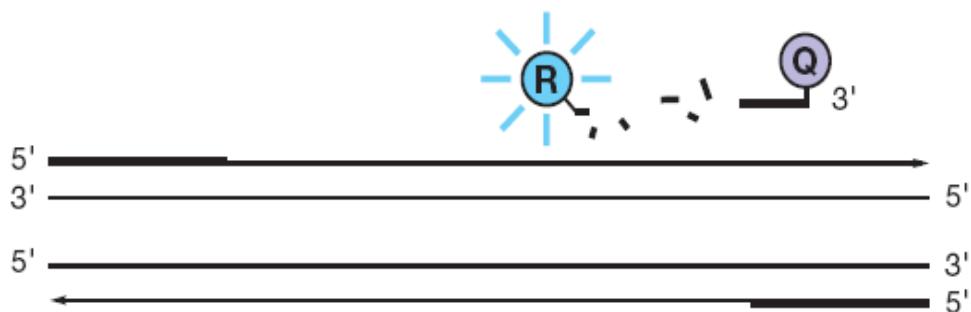
Faza 2: Eksonukleazna aktivnost DNA-polimeraze.



Faza 3: Odcepitev reporterskega fluorogena in oddajanje fluorescence.



Faza 4: Razpad oligonukleotidne sonde



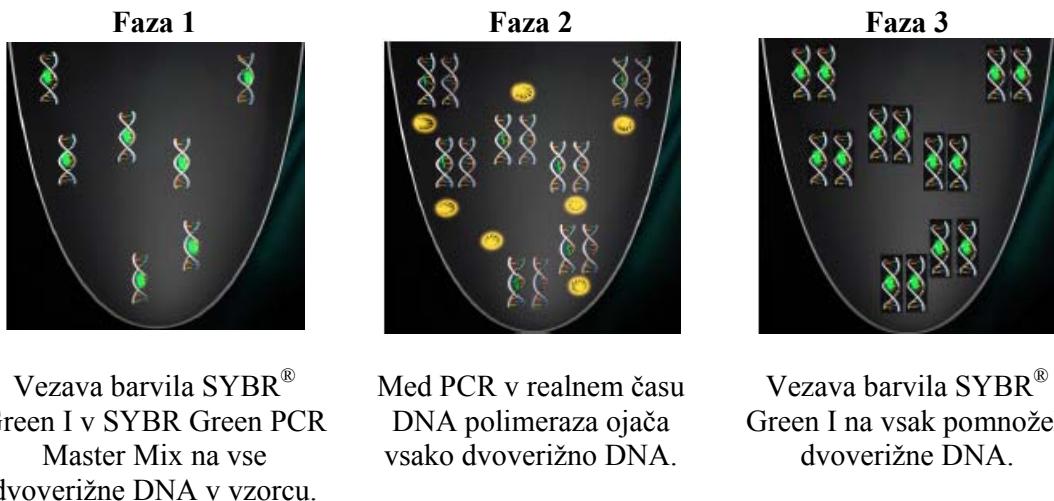
Slika 6: Princip PCR v realnem času (Applied Biosystems, 2005)

2.3.2 Metode določanja pomnožkov

Pri PCR v realnem času sta v uporabi dve različni skupini metod za določanje fluorescence pomnožkov. Prva skupina so nespecifične metode, ki so odvisne od uspešnosti vezave fluorogenega barvila, kot je na primer SYBR® Green I, na dvooverižno DNA molekulo ter njegove intenzitete fluoresciranja. Druga skupina so specifične metode, ki temeljijo na pojavu imenovanem fluorescentni resonančni prenos energije (FRET). Dve fluorogeni barvili sta vezani na oligonukleotidne sonde, oligonukleotidne začetnike ali pomnožke. Ločitev dveh fluorogenov vodi k povečanju intenzitete fluorescence pri določeni valovni dolžini (Saunders, 2004).

2.3.2.1 Nespecifične metode določanja pomnožkov

Princip nespecifičnih metod je v vezanju fluorogenih barvil v dvooverižno DNA ter fluorescenci vezanih barvil pri določeni valovni dolžini (slika 7). Barvilo SYBR® Green I je eno izmed teh barvil in se veže le na dvooverižno DNA ter fluorescira le, ko je vezano v DNA. Intenziteta fluorescence se premo sorazmerno povečuje z številom pomnožkov dvooverižne DNA (Ponchel, 2006). Pri tej metodi podobno kot pri klasičnem PCR potrebujemo le dva oligonukleotidna začetnika. Pri nespecifičnih metodah se fluorogeno barvilo veže na vse pomnožke, tako na specifične kot tudi nespecifične in različne dimere, kar je pa tudi njihova glavna slabost. Posledica so lažno pozitivni rezultati ali napačna interpretacija rezultatov (Arya in sod., 2005).



Slika 7: Prikaz vezave barvila SYBR® Green I na dvooverižno DNA molekulo med fazo podaljševanja pri PCR v realnem času (Applied Biosystems, 2005)

2.3.2.2 Specifične metode določanja pomnožkov

Specifične metode določanja pomnožkov temeljijo na procesu florescentni resonančni prenos energije (ang. fluorescence resonance energy transfer, FRET). Pri teh metodah sta v molekuli oligonukleotidne sonde, oligonukleotidnega začetnika ali pomnožka vezani dve fluorogeni barvili: reporterski (R) in zaviralni (Q) fluorogen. Rezultat podvojevanja specifičnega dela DNA ter eksonukleazne aktivnosti encima DNA-polimeraza je poleg pomnožka tudi ločitev reporterskega in zavirальнega fluorogena. Posledica je povečanje intenzitete fluorescence (Jeršek, 2009).

Glede na vezavo reporterskega in zavirальнega fluorogena razlikujejo več metod in med njimi je najpogostejsa in najbolj znana metoda dvojno označene oligonukleotidne sonde (*TaqMan*-sonda). Oligonukleotidna sonda ima kovalentno vezan reporterski fluorogen na 5' koncu in zaviralni fluorogen na 3' koncu (slika 6). V uporabi so različna fluorogena barvila in sicer kot reporterski fluorogen so v uporabi 6-karboksi-fluorescein (FAM), tetrakloro-6-karboksi-fluorescein (TET), heksakloro-6-karboksi-fluorescein (HEX) in VIC, kot zaviralni fluorogen pa 6-karboksi-tetrametil-rodamin (TAMRA) in 4,4-dimetil-azobenzenen-4'-karboksilna kislina (DABCYL). Dokler je oligonukleotidna sonda nerazgrajena sta fluorogeni barvili vezani nanjo in zaviralni fluorogen zavira oddajanje fluorescence reporterskega fluogena. Med podaljševanjem določene sekvene DNA, eksonukleazna aktivnost encima DNA-polimeraza razgradi oligonukleotidno sondu in s tem loči fluorogeni barvili. Rezultat tega je, da reporterski fluorogen fluorescira, kar lahko izmerimo (Arya in sod., 2005).

Osnova merjenja intenzitete fluorescence dvojno označenih oligonukleotidnih sond je proces FRET. To je spektroskopski proces, pri katerem gre za prenos energije med molekulami, ki so med seboj oddaljene 10-100 Å in imajo prekrivajoče emisijske in absorpcijske spektre. Prenos energije poteka od reporterskega k zavirальнemu fluorogenu, ki oddaja energijo pogosteje v obliki toplote kot fluorescence (Mackay, 2004). Specifičnost PCR v realnem času se v primerjavi z nespecifičnimi metodami določanja pomnožkov poveča, saj se poleg specifičnih oligonukleotidnih začetnikov uporablja tudi specifično oligonukleotidno sondu.

2.4 DOLOČANJE BAKTERIJ RODU *Alicyclobacillus*

2.4.1 Klasične mikrobiološke metode

Doung in Jensen (2000) sta določila bakterije rodu *Alicyclobacillus* v pokvarjenem ledenem čaju ter v surovinah šipkovega in hibiskusovega čaja. Izolati so rastli na DSMZ 402 mediju (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen), ki je podobne sestave kot gojišče BAM (preglednica 1).

Preglednica 1: Primeri določanja bakterij rodu *Alicyclobacillus* s klasičnimi mikrobiološkimi metodami

Rod/vrsta	Namen	Metoda	Živilo	Vir
<i>Alicyclobacillus</i>	določanje bakterij	direktno določanje na gojišču DSMZ 402	- šipkov čaj - hibiskus čaj	Doung in Jensen, 2000
<i>Alicyclobacillus</i>	pregled vseh izolacijskih in števnih metod za določanje bakterij	direktno določanje na gojiščih BAM, YSG, HGYE, PDA, OSA, K agar, SK agar	/	Smit in sod., 2011
<i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i>	razvoj metode za določitev teh bakterij	direktno določanje na gojiščih BAM, PDA, OSA, NA, TSA	/	Pettipher in sod., 1997
<i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i>	določiti bakterije v eksotičnih Brazilskih sadnih sokovih	- metoda najbolj verjetnega števila (MPN) - biokemični testi	- marakujin sok - ananasov sok	McKnight in sod., 2010
Spore <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i>	določiti najmanjše število spor potrebnih za povzročitev kvara živila	- direktno določanje bakterij v živilu na gojišču - različni razmere rasti	- jabolčni sok - hruškov sok - pomarančni sok - mešanice sokov - paradižnik v konzervah	Walls in Chuate, 2000
Spore <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i>	določanje bakterij v sadnih produktih in razvoj pasterizacijskega postopka	direktno določanje bakterij v živilu na gojišču MEA, OSA, TA, PDA	/	Silva in Gibbs, 2001
- <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> - <i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i> - <i>Alicyclobacillus cycloheptanicus</i>	razvoj metode direktnega določanja bakterij na gojiščih	direktno določanje bakterij na gojiščih	- različni sadni sokovi - različno sadje - različne hranilne podlage	Murray in sod., 2007

Legenda: DSMZ 402 - nem. Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen medium 402, BAM - angl. *Bacillus acidocaldarius* medium, YSG - angl. Yeast Starch Glucose medium, HGYE - angl. Hiraishi Glucose Yeast Extract medium, PDA - angl. Potato Dextrose Agar, OSA - angl. Orange Serum Agar, NA - hranilni agar, TSA - gojišče triptični soja agar, MEA - angl. Malt Extract Agar, TA - angl. Thermoacidurans Agar

Smit in sod. (2011) so ugotovili, da za določanje bakterij vrste *A. acidoterrestris* dajejo najboljše rezultate gojišča BAM, PDA in OSA. Metoda nacepljanja z razmazovanjem vzorca po površini trdnega gojišča je bolj učinkovita kot metoda z vmešavanjem vzorca v raztopljeno gojišče. Gojišče BAT je bolj učinkovito pri revitaliziranju bakterij vrste *A. acidocaldarius*, medtem ko gojišče K-agar daje dobre rezultate pri izolaciji bakterij vrste *A. acidoterrestris*. Gojišče YSG največ uporabljajo na Japonskem, kjer so določili bakterije rodu *Alicyclobacillus* v zeliščnem čaju, kislih pijačah, mešanicah sokov, pomarančnem soku, jabolčni sok, zemljji sadovnjakov, itd. Gojišče SK-agar so razvili na podlagi gojišča K-agar z namenom izboljšati revitalizacijo kulture in občutljivosti.

Pettipher in sod. (1997) so določili bakterije vrste *A. acidoterrestris* po 48-urni inkubaciji pri 44 °C na gojišči BAM ($1,8 \times 10^5$ cfu/ml), na gojišču PDA ($6,0 \times 10^4$ cfu/ml) in na gojišču OSA ($2,5 \times 10^5$ cfu/ml).

McKnight in sod. (2010) so določili bakterije vrste *A. acidoterrestris* z metodo najbolj verjetnega števila. Prvi so določili bakterije vrste *A. acidoterrestris* v marakujinem soku. Določili so več bakterij v sušnih mesecih kot v ostalih, in sicer kar >23 MNP/100 ml vzorca.

Walls in sod. (2000) so določili, da je za kvar jabolčnega soka in soka belega grozja potrebna le 1 spora na 10 ml soka. Kalitev spor in rast so Silva in sod. (2001) za bakterije vrste *A. acidoterrestris* določili pri koncentraciji 10^6 cfu/ml celic v pomarančnem soku skladisčenem 24 h pri 44 °C. Pri koncentraciji 10^5 - 10^6 celic/ml so zaznali dovolj gvajakola za določitev prisotnosti le-tega. Vonj so opazili tudi v jabolčnem, pomarančnem in grenivkinem soku po 4 dnevnom skladisčenju pri 30 °C, ko se je koncentracija celic povečala iz 10^2 cfu/ml na 10^5 cfu/ml. Murray in sod. (2007) so ugotovili, da so za kalitev spor bakterij vrst *A. acidoterrestris*, *A. acidocaldarius* in *A. cycloheptanicus* najbolj primerna gojišča K agar, ALI in BAT. Ugotovili so tudi da je en sev vsake vrste sposoben rasti v 10-ih negaziranih komercialno proizvedenih pihačah pri temperaturi med 30-43 °C.

2.4.2 Alternativne metode

Connor in sod. (2005) so razvili metodo PCR v realnem času z dvojno označeno oligonukleotidno sondijo (*Taq-Man* sonda) za določanje bakterij rodu *Alicyclobacillus* v sokovih z občutljivostjo 21-76 celic/ml. Leto prej so Luo in sod. razvili metodo PCR v realnem času z dvojno označeno oligonukleotidno sondijo (*Taq-Man* sonda) za določanje vegetativnih celic bakterij vrst *A. acidoterrestris* in *A. acidocaldarius* v jabolčnem soku z občutljivostjo <1 cfu/ml (preglednica 2).

Chen in sod. (2006) so z metodo 16S rDNA PCR-RFLP identificirali bakterije vrst *A. acidoterrestris* in *A. cycloheptanicus* izolirane iz industrijskega obrata za proizvodnjo jabolčnega soka, jabolčnega soka ter koncentrata jabolčnega soka.

Durak in sod. (2010) so določali bakterije rodu *Alicyclobacillus* s gensko analizo 16S rRNA. Ugotovili so, da so bakterije vrste *A. acidoterrestris* prisotne tako v jabolčnem soku, soku citrusov in drugih sokov ter koncentratih, medtem ko so bakterije vrste *A. acidocaldarius* subsp. *acidocaldarius* pretežno prisotne v soku citrusov. Izmed 141 izolatov, izoliranih iz jabolčnih sokov, sokov citrusov, industrijskih obratov, sladkorja, drugih sokovih, so določili tudi bakterije vrst *A. acidocaldarius*, *A. fastidiosus*, *A. sacchari*, *A. tengchongensis*, *A. hesperidum*, *A. acidiphilus*.

Bianchi in sod. (2010) so za določanje bakterij vrste *A. acidoterrestris* razvili metodo, ki je temeljila na analizi hlapnih komponent v pomaračnem soku z plinsko kromatografijo in masno spektroskopijo (GC-MS). Določili so prisotnost bakterij vrste *A. acidoterrestris* kljub temu, da ni bilo prisotnega gvajakola in 2,6-dibromofenola, ki sta znana znaka kontaminacije.

Preglednica 2: Primeri določanja bakterij rodu *Alicyclobacillus* z alternativnimi metodami

Rod/vrsta	Namen	Metoda	Živilo	Vir
<i>Alicyclobacillus</i>	postavitev oligonukleotidnih začetnikov in sodne	PCR v realnem času z dvojno označeno oligonukleotidno sondijo (<i>TaqMan</i> -sonda)	- pomarančni sok	Connor in sod., 2005
<i>Alicyclobacillus</i>	postavitev PCR v realnem času za določanje bakterij v sokovih	PCR v realnem času z dvojno označeno oligonukleotidno sondijo (<i>TaqMan</i> -sonda)	- jabolčni sok	Luo in sod., 2004
<i>Alicyclobacillus</i>	izolacija termo-acidofilnih bakterij iz jabolčnega soka	restrikijska analiza s PCR pomnoženih fragmentov (PCR-RFLP)	- jabolčni sok - koncentriran jabolčni sok	Chen in sod., 2006
<i>Alicyclobacillus</i>	identifikacija izolatov iz različnih živil	16S rRNA genska analiza	- jabolčni sok - citrusi - koncentrati sokov - industrijski obrat - zemlja sadovnjaka	Durak in sod., 2010
<i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i>	postavitev metode za preventivno določanje bakterij	plinska kromatografija z masno spektroskopijo (GC-MS)	- pomarančni sok	Bianchi in sod., 2010
- <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> - <i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i>	izolacija, identifikacija in tipizacija bakterij iz zemlje sadovnjaka in industrijskega obrata	pomnoževanje DNA z naključnimi začetnimi oligonukleotidi s PCR (RAPD-PCR)	- zemlja sadovnjaka - sadje - voda - vinska mušica - končni produkt	Groenewald in sod., 2009
- <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> - <i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i>	določanje bakterij z elektronskim nosom	elektronski nos	- breskov sok - pomarančni sok - jabolčni sok	Gobbi in sod., 2010

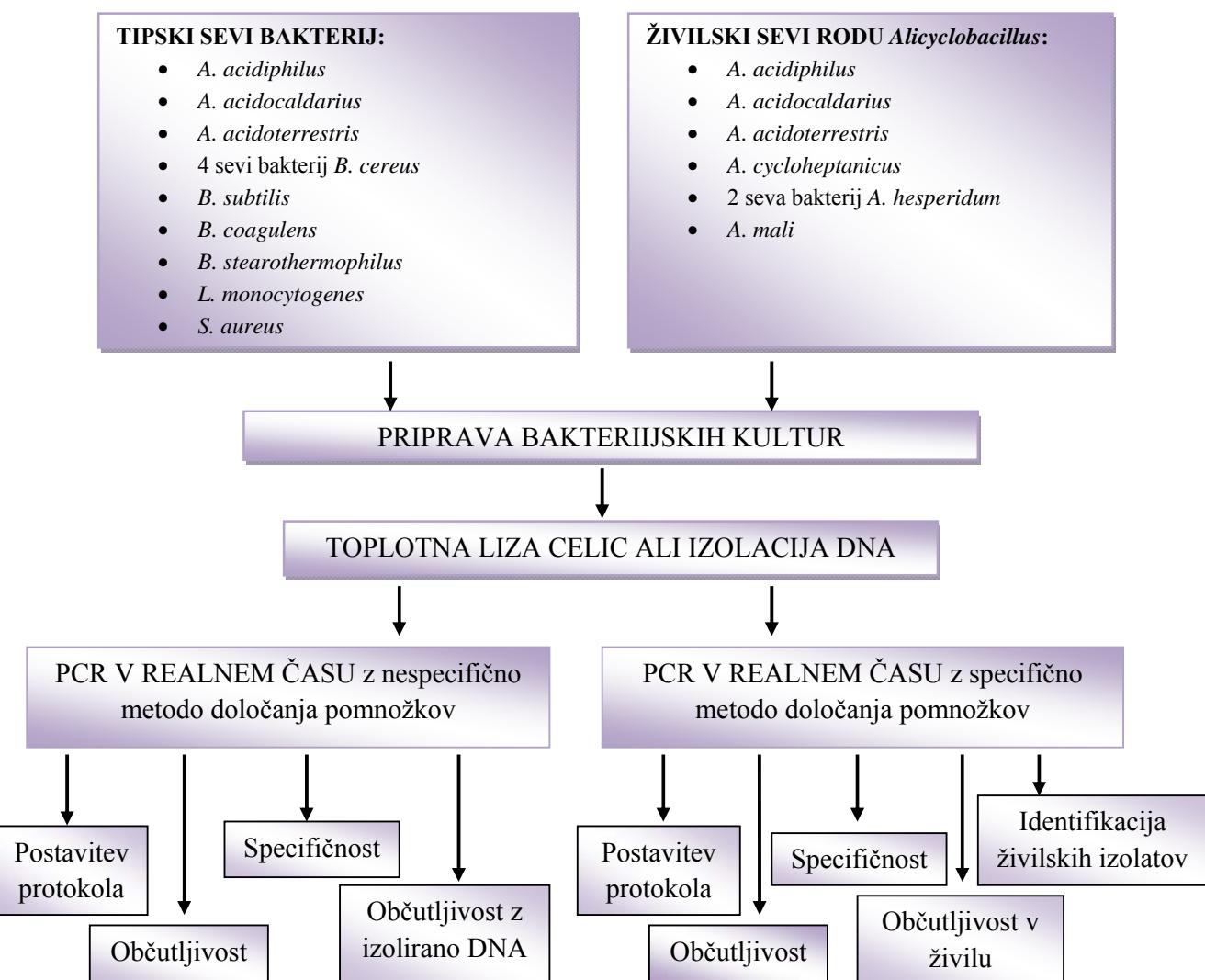
Groenewald in sod. (2009) so določali bakterije rodu *Alicyclobacillus* z metodo RAPD-PCR v zemljji sadovnjakov in industrijskih obratih za proizvodnjo sadnih koncentratov v južni Afriki. Kot prvi so izolirali bakterije vrste *A. acidoterrestris* iz vode za pranje in zemlje izven industrijskega obrata ter bakterije vrste *A. acidocaldarius* iz vinskih mušic.

Gobbi in sod. (2010) so uspeli določili bakterije vrst *A. acidoterrestris* in *A. acidocaldarius* z elektronskim nosom z semikonduktorskim senzorjem z kovinskim oksidom v breskovem, pomarančnem ter jabolčnem soku 24 h po inokulaciji pri koncentracijah $<10^2$ cfu/ml.

3 MATERIAL IN METODE

3.1 POTEK DELA

Namen našega dela je bil postaviti protokol za PCR v realnem času za določanje bakterij rodu *Alicyclobacillus*. Za izhodišče smo vzeli protokol za klasičen PCR in ga prilagodili tako, da bi optimalno deloval pri PCR v realnem času. Določili smo občutljivost in specifičnost PCR v realnem času z nespecifično in s specifično metodo določanja pomnožkov. Določili smo tudi občutljivost PCR v realnem času v živilu. Z izolirano DNA smo določili občutljivost in učinkovitost metode PCR v realnem času. Potek našega eksperimentalnega dela je prikazan na sliki 8.



Slika 8: Shema eksperimentalnega dela

3.2 MATERIAL

3.2.1 Bakterijski sevi

Pri eksperimentalnem delu smo uporabljali naslednje bakterijske seve zbirke Laboratorija za živilsko mikrobiologijo, Oddelka za živilstvo, Biotehniške fakultete (ŽM in ŽMJ) ter sev iz zbirke industrijskih mikroorganizmov Laboratorija za biotehnologijo na Oddelku za živilstvo Biotehniške fakultete (ZIM):

- *Alicyclobacillus acidiphilus* ŽMJ185 (14558, DSMZ, Nemčija)
- *Alicyclobacillus acidocaldarius* ŽMJ183 (446, DSMZ, Nemčija)
- *Alicyclobacillus acidoterrestris* ŽMJ184 (3922, DSMZ, Nemčija)
- *Bacillus cereus* ŽMJ91 (T1, SI(R28), Melle-Belgia), *Bacillus cereus* ŽMJ164 (IVZ, WSBC - 10530), *Bacillus cereus* ŽMJ165 (IVZ, WSBC - 10543), *Bacillus cereus* ŽMJ166 (IVZ, WSBC - 10549)
- *Bacillus subtilis* ŽMJ97 (T7)
- *Bacillus coagulans* ŽMJ98 (T8, LMG 6326T)
- *Bacillus stearothermophilus* ZIM102 (T12, LMG 6939T)
- *Listeria monocytogenes* ŽM58
- *Staphylococcus aureus* ŽM506

Izolati rodu *Alicyclobacillus* iz živili:

- *Alicyclobacillus acidiphilus* ŽMJ209
- *Alicyclobacillus acidocaldarius* ŽMJ187
- *Alicyclobacillus acidoterrestris* ŽMJ189
- *Alicyclobacillus cycloheptanicus* ŽMJ199
- *Alicyclobacillus hesperidum* ŽMJ193, *Alicyclobacillus hesperidum* ŽMJ202
- *Alicyclobacillus mali* ŽMJ207
- *Alicyclobacillus sendaiensis* ŽMJ191
- *Alicyclobacillus vulcanalis* ŽMJ186

3.2.2 Mikrobiološka gojišča

3.2.2.1 Neselektivna gojišča

Pri eksperimentalnem delu smo uporabljali neselektivna gojišča, ki smo jih pripravili po navodilih proizvajalcev:

- Gojišče BHI (Brain Heart Infusion Broth, 1.10493, Merck, Nemčija)
- Gojišče TSA (Tryptone Soya Agar, CM 0131, Oxoid, Anglija)

3.2.2.2 Selektivna gojišča

- **Gojišče AM (*Alicyclobacillus medium*)** (Darland in Brock, 1971; Wisse in Parish, 1998)

Priprava dela A:

Sestavine, navedene v preglednici 3, smo zatehtali v steklenico in dodali destilirano vodo. Vsebino smo premešali in ji nato znižali pH na 4,0 z 1 M H₂SO₄. Predhodno smo pH-meter umerili z pufrom pH 7,0 in pufrom pH 4,0. Ko smo vsebini znižali pH, smo jo sterilizirali v avtoklavu 20 min pri temperaturi 121 °C.

Preglednica 3: Sestava dela A gojišča *Alicyclobacillus medium*

Sestavina	Količina
CaCl ₂ x 2H ₂ O (1.02382.0500, Merck, Nemčija)	0,25 g
MgSO ₄ x 7H ₂ O (1.05826.0500, Merck, Nemčija)	0,50 g
(NH ₄) ₂ SO ₄ (Zorka Šabac, Jugoslavija/Srbija)	0,20 g
kvasni ekstrakt (412220, Biolife, Italija)	2,00 g
glukoz (0705007, Kemika, Hrvaška)	5,00 g
KH ₂ PO ₄ (1112408, Kemika, Hrvaška)	3,00 g
destilirana H ₂ O	500 ml

Priprava dela B:

Sestavine, navedene v preglednici 4, smo zatehtali v steklenico in dodali destilirano vodo ter premešali. Vsebino smo sterilizirali v avtoklavu 20 min pri temperaturi 121 °C.

Preglednica 4: Sestava dela B gojišča *Alicyclobacillus medium*

Sestavina	Količina
ZnSO ₄ x 7H ₂ O (1.08883.0500, Merck, Nemčija)	0,10 g
MnCl ₂ x 4H ₂ O (13225, Kemika, Hrvaška)	0,03 g
H ₃ BO ₃ (1.00165.0500, Merck, Nemčija)	0,30 g
CaCl ₂ x 6H ₂ O (20.218-50, Sigma Aldrich Chemie, Nemčija)	0,20 g
CuCl ₂ x 2H ₂ O (22.178-3, Sigma Aldrich Chemie, Nemčija)	0,01 g
NiCl ₂ x 6H ₂ O (N-5756, Sigma, ZDA)	0,02 g
Na ₂ MoO ₄ x 2H ₂ O (14189, Kemika, Hrvaška)	0,03 g
destilirana H ₂ O	1000 ml

Priprava dela C:

Sestavine navedene v preglednici 5 smo zatehtali v steklenico in dodali destilirano vodo ter premešali. Vsebino smo sterilizirali v avtoklavu 20 min pri temperaturi 121 °C.

Preglednica 5: Sestava dela C gojišča *Alicyclobacillus medium*

Sestavina	Količina
agar (411030, BioLife, Italija)	15,0 g
destilirana H ₂ O	500 ml

Končna priprava:

V steklenico s 500 ml dela A smo aseptično odpipetirali 1 ml dela B. Vse skupaj smo premešali in dolili še 500 ml dela C in vsebino ponovno premešali. Tako pripravljeno gojišče smo aseptično razlili v sterilne petrijevke in jih hranili v hladilniku.

- **Gojišče BAM** (*Bacillus acidocaldarius medium*) (Darland in Brock, 1971; Silva in sod., 1999)

Sestavine, navedene v preglednici 6, smo zatehtali v steklenico in dodali destilirano vodo ter vsebino dobro premešali. Tako pripravljeno gojišče smo razdelili v epruvete po 4 ml. Zaprete epruvete z gojiščem smo sterilizirali v avtoklavu 15 min pri temperaturi 121 °C in jih hranili v hladilniku.

Preglednica 6: Sestava gojišča *Bacillus acidocaldarius medium*

Sestavina	Količina
kvasni ekstrakt (412220, BioLife, Italija)	1,00 g
(NH ₄) ₂ SO ₄ (Zorka Šabac, Jugoslavija/Srbija)	0,20 g
MgSO ₄ x 7H ₂ O	0,50 g
CaCl ₂ x 2H ₂ O (1.02382.0500, Merck, Nemčija)	0,25 g
KH ₄ PO ₄ (1112408, Kemika, Hrvaška)	0,60 g
destilirana H ₂ O	500 ml

3.2.2.3 Fiziološka raztopina

Sestavine:

- KH₂PO₄ (1112408, Kemika, Hrvaška)

Priprava:

Zatehtali smo 3,4 g KH₂PO₄ in ga raztopili v 100 ml destilirane vode (pH = 7,2). 1,25 ml tako pripravljene raztopine smo razredčili v 1 l destilirane vode. Fiziološko raztopino smo nato razdelili v epruvete po 9 ml, jih zamašili in sterilizirali v avtoklavu 20 min pri temperaturi 121 °C. Epruvete z fiziološko raztopino smo hranili v hladilniku.

3.2.3 Reagenti

3.2.3.1 Reagenti za lizo bakterijskih celic

- Bi-destilirana sterilna voda (H₂O_{KEM})

3.2.3.2 Reagenti za PCR v realnem času z nespecifično metodo določanja pomnožkov

- Power SYBR® Green PCR Master Mix 2x (4367659, Applied Biosystems, ZDA)
 - SYBR® Green 1 barvilo
 - AmpliTaq Gold® DNA-polimeraza
 - Mešanica deoksinukleotid trifosfatov - dNTP (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) z dUTP
 - Pasivna referenca 1
 - Optimizirane komponente pufra
- Par oligonukleotidnih začetnikov za bakterije rodu *Alicyclobacillus* (Connor in sod., 2005)
 - CC16S-F (5' - CGT AGT TCG GAT TGC AGG C - 3') 10 pmol/µl
 - CC16S-R (5' - GTG TTG CCG ACT CTC GTG - 3') 10 pmol/µl
- H₂O_{PCR} (0032 006.159, Eppendorf, Nemčija)

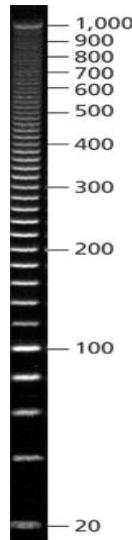
3.2.3.3 Reagenti za PCR v realnem času s specifično metodo določanja pomnožkov

- TaqMan® Univerzal PCR Master Mix (4304437, Applied Biosystems, ZDA)
 - AmpliTaq Gold® DNA-polimeraza
 - AmpErase® UNG, dNTP (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) z dUTP
 - Pasivno referenca 1
 - Optimizirane komponente pufra
- Par oligonukleotidnih začetnikov za bakterije rodu *Alicyclobacillus* (Connor in sod., 2005)
 - CC16S-F (5' - CGT AGT TCG GAT TGC AGG C - 3') 10 pmol/µl
 - CC16S-R (5' - GTG TTG CCG ACT CTC GTG - 3') 10 pmol/µl
- Sonda za bakterije rodu *Alicyclobacillus* (Connor in sod., 2005)
 - CC16S (5' -Fam- CGG AAT TGC TAG TAA TCG C -BHQ- 3') 100 pmol/µl
- H₂O_{PCR} (0032 006.159, Eppendorf, Nemčija)

3.2.3.4 Reagenti za agarozno elektroforezo

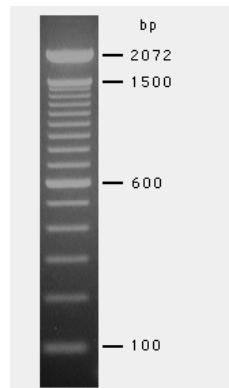
- Pufer TAE 10x (pH = 8,1)
 - 0,4 M raztopina Tris baze (H5131, Promega, ZDA)
 - 0,2 M raztopina ocetne kisline (1.0063.1000, Merck, Nemčija)
 - 0,02 M raztopina Na₂-EDTA (E 5134, Sigma, ZDA)
- Agarozni gel:
 - Agaroza (50014, FMC BioProducts, ZDA)
 - Pufer TAE 0,5x
- Barvilo za nanos pomnožkov na gel 5x (239901, Qiagen, Nemčija)

- Molekularni označevalci dolžin pomnožkov DNA - PCR 20 bp Low Ladder (P1598, Sigma, ZDA)



Slika 9: Velikost fragmentov molekularnega označevalca dolžin pomnožkov na agaroznem gelu (PCR 20 bp Low Ladder, P1598, Sigma, ZDA)

- Molekularni označevalci dolžin pomnožkov DNA - 100 bp DNA Ladder (15628-019, Invitrogen, ZDA)



Slika 10: Velikost fragmentov molekularnega označevalca dolžin pomnožkov na agaroznem gelu (100 bp DNA Ladder, 15628-019, Invitrogen, ZDA)

- Raztopina etidijevega bromida: 0,5 mg/l (E 2028, Sigma, ZDA)

3.2.3.5 Reagenti za izolacijo DNA (Flamm in sod., 1984)

- Raztopina za spiranje kulture SSC:
 - 0,15 M raztopina NaCl
 - 0,015 M raztopina Na-citrat
- Raztopina lizocima:

- 0,01 M raztopina natrijevega fosfata (Sigma, ZDA)
- 20 % (utežni %) raztopina saharoze (Riedel-de Haen, Nemčija)
- Lizocim 4 mg/ml (Boehringer Mannheim, Švica)
- Pufer TE
 - 0,05 M tris baze (H5131, Promega, ZDA)
 - 0,02 M Na₂-EDTA (E 5134, Sigma, ZDA)
- Pufer TE s sarkozinom:
 - 0,05 M tris baze (H5131, Promega, ZDA)
 - 0,02 M Na₂-EDTA (E 5134, Sigma, ZDA)
 - 5 % N-lauroil sarkozina Na sol 35 % (Sigma, ZDA)
- Pufer TE s proteinazo K:
 - 0,05 M tris baze (H5131, Promega, ZDA)
 - 0,02 M Na₂-EDTA (E 5134, Sigma, ZDA)
 - Proteinaza K
- Fenol nasičen z Trisom:
 - Fenol (Gibco BRL, Nemčija)
 - Tris baza (Gibco BRL, Nemčija)
- Kloroform (Riedel-de Haen, Nemčija)
- Raztopina Na-acetata
- 100 % etanol
- 80 % etanol

3.2.3.6 Druge kemikalije

- Raztopina etanola (EtOH): 96 % (vol.), 70 % (vol.) (1.00983.1000, Merck, Nemčija)
- Glicerol (0711901, Kemika, Nemčija)

3.2.4 Živila

Kot živila smo uporabili vzorce pitne vode, vzorce vode z okusom (Za Life, Pivovarna Union) in jabolčnega soka (Fructal).

3.2.5 Laboratorijska oprema

Poleg aparatov, ki so navedeni v preglednici 7, smo pri eksperimentalnem delu uporabljali tudi: digestorij, plinske gorilnike, petrijeve plošče (Labortechnika Golias, Slovenija), laboratorijske steklenice (Duran, Nemčija), merilne valje (Plastbrand, Nemčija), pipetor (Eppendorf, Nemčija), parafilm (PM 992, American National Can), 1,5 ml in 2 ml epruvete (Eppendorf, Nemčija), pincete, cepilne zanke, epruvete, čase, erlenmajerice, steklene palčke, stojala, žlice, Al-folijo.

Preglednica 7: Laboratorijski aparati

APARAT	OZNAKA	PROIZVAJALEC
Aparatura PCR	ABI Prism 7500	Applied Biosystems, ZDA
Avtoklav	Tip 250	Sutjeska, Jugoslavija
Avtomatske pipete in nastavki	1000, 100, 10 (1000µl, 100µl, 10µ)	Eppendorf, Nemčija
Centrifuga	Mini spin PLUS	Eppendorf, Nemčija
Digitalna tehnica	PB1502-S	Mettler Toledo, Švica
Elektroforeza	PowerPac Basic	BioRad, ZDA
Hladilnik	/	LTH, Slovenija
	/	Gorenje Slovenija
Inkubator	I-115C	Kambič, Slovenija
	I-105CK	Kambič, Slovenija
Komora za PCR	Holten Laminar Air	Heto-Holten, Nemčija
Mikrovalovna pečica	Cookgrill 1300	Sanyo, Japonska
Stresalnik	Vibromix 314 EVT	Tehnica, Slovenija
Tehnica	Santorius analytic	Santorius, Nemčija
Vodna kopel	E7805028	Sutjeska, Jugoslavija
Vrtično mešalo	Vibriomix 104EV	Tehnica, Slovenija
Zmrzovalnik (-20°C)	/	LTH, Slovenija

3.3 METODE

3.3.1 Potek eksperimentalnega dela

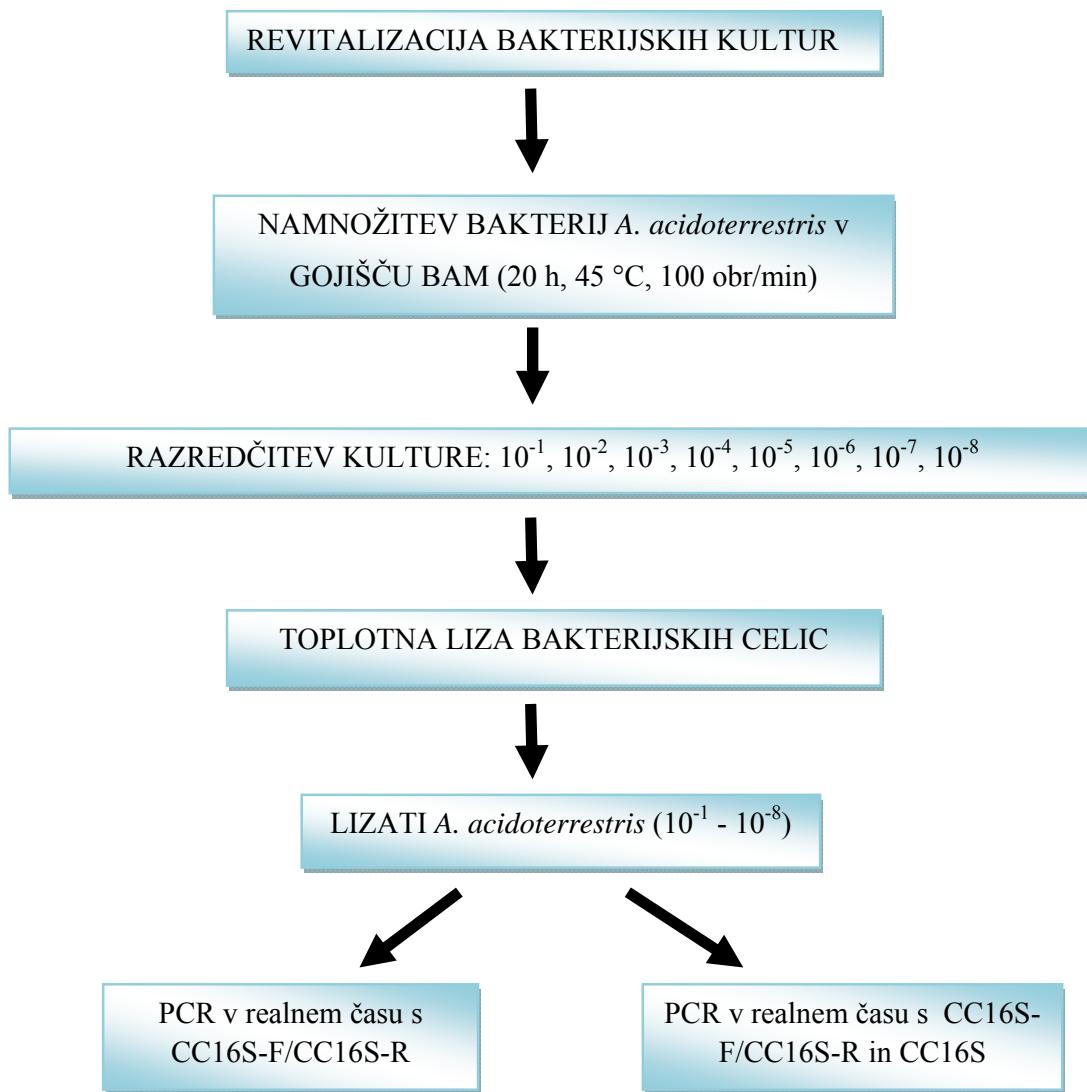
Naše eksperimentalno delo je potekalo v več delih:

- V prvem delu smo DNA bakterij rodu *Alicyclobacillus* pripravili s topotno lizo. Postavili smo protokol PCR v realnem času ter določili občutljivost PCR v realnem času za določanje bakterij rodu *Alicyclobacillus* z parom oligonukleotidnih začetnikov CC16S-F/CC16S-R.
- V drugem delu smo DNA bakterij rodov *Alicyclobacillus* in *Bacillus*, ter vrst *L. monocytogenes* in *S. aureus* pripravili s topotno lizo. Določili smo specifičnost PCR v realnem času za določanje bakterij rodu *Alicyclobacillus* z parom oligonukleotidnih začetnikov CC16S-F/CC16S-R.
- V tretjem delu smo zaradi slabe specifičnosti PCR v realnem času z oligonukleotidnima začetnikoma CC16S-F/CC16S-R dodali sondo CC16S. DNA bakterij rodu *Alicyclobacillus* smo pripravili s topotno lizo. Postavili smo nov protokol PCR v realnem času ter določili občutljivost PCR v realnem času za določanje bakterij rodu *Alicyclobacillus* z parom oligonukleotidnih začetnikov CC16S-F/CC16S-R in sondijo CC16S.

- V četrtem delu smo DNA bakterij rodov *Alicyclobacillus* in *Bacillus* ter vrst *L. monocytogenes* in *S. aureus* pripravili s toplotno lizo. Določili smo specifičnost PCR v realnem času za določanje bakterij rodu *Alicyclobacillus* s parom oligonukleotidnih začetnikov CC16S-F/CC16S-R in sondi CC16S.
- V petem delu smo določili občutljivost metode PCR v realnem času z izolirano DNA bakterij vrste *Alicyclobacillus acidoterrestris* s parom oligonukleotidnih začetnikov CC16S-F/CC16S-R in sondi CC16S.
- V šestem delu smo s PCR v realnem času določali bakterije rodu *Alicyclobacillus* v umetno kontaminiranih živilih (pitna voda, voda z okusom in jabolčni sok). Bakterijsko DNA smo pripravili s toplotno lizo. Določili smo občutljivost PCR v realnem času za določanje bakterij rodu *Alicyclobacillus* s parom oligonukleotidnih začetnikov CC16S-F/CC16S-R in sondi CC16S v živilu.
- V zaključnem delu smo potrdili identifikacijo različnih živilskih sevov rodu *Alicyclobacillus* s PCR v realnem času z parom oligonukleotidnih začetnikov CC16S-F/CC16S-R in sondi CC16S.

3.3.1.1 Določitev občutljivosti PCR v realnem času za določanje bakterij rodu *Alicyclobacillus*

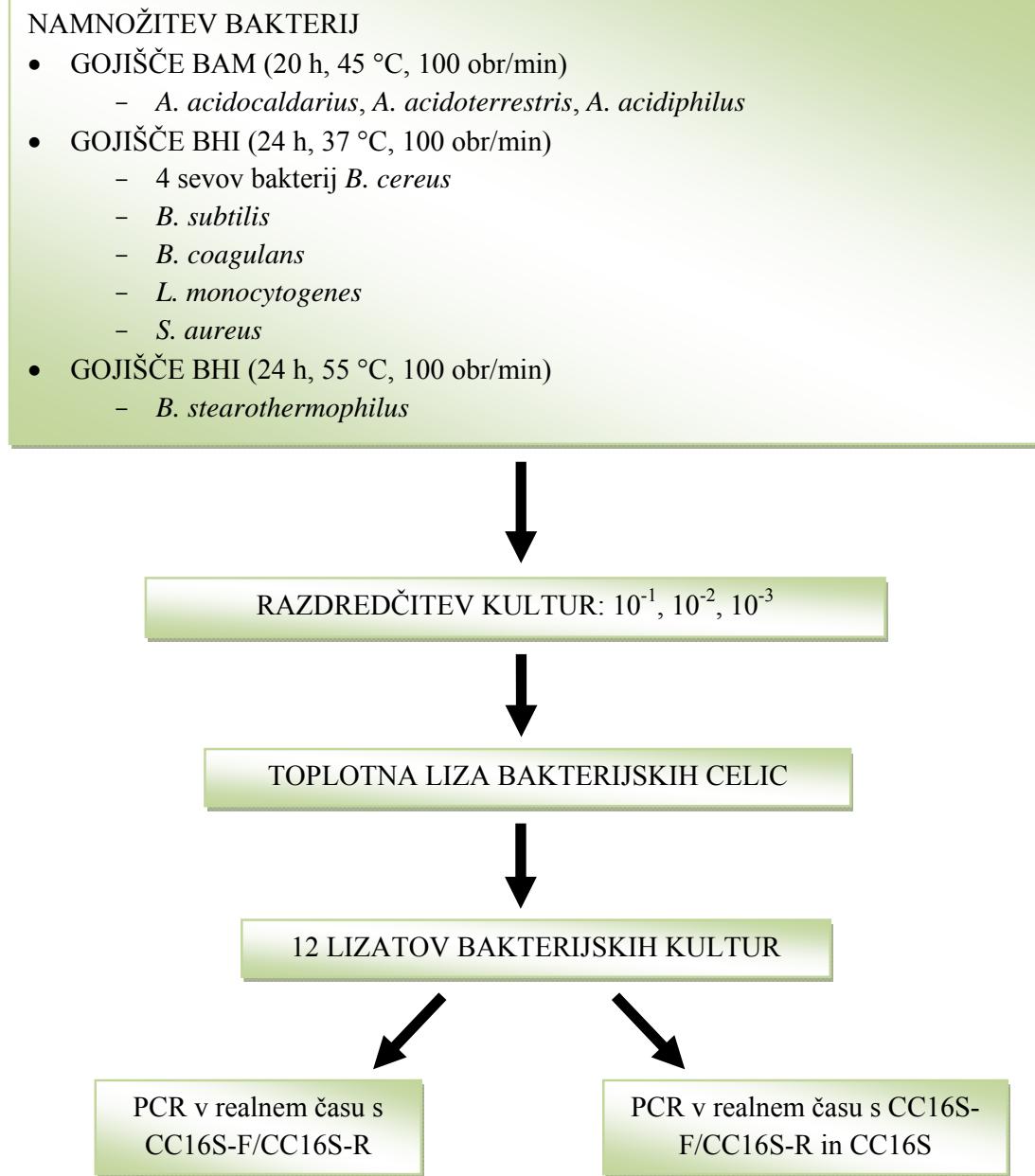
Slika 11 prikazuje glavne stopnje določitve občutljivosti PCR v realnem času z parom oligonukleotidnih začetnikov CC16S-F/CC16S-R ter sonde CC16S za bakterije rodu *Alicyclobacillus*.



Slika 11: Shema glavnih stopenj določitve občutljivosti PCR v realnem času za določanje bakterij rodu *Alicyclobacillus*

3.3.1.2 Določitev specifičnosti PCR v realnem času za določanje bakterij rodu *Alicyclobacillus*

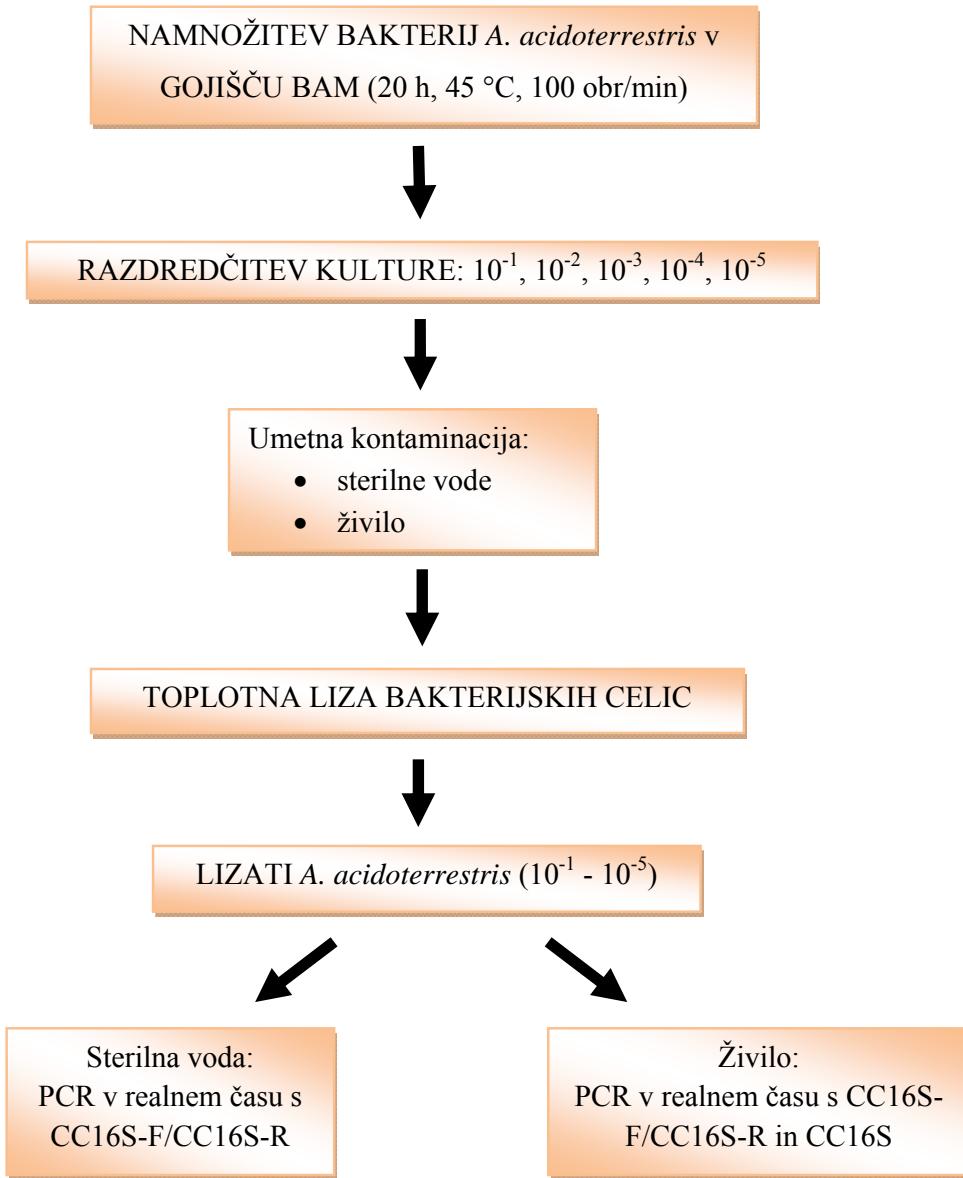
Slika 12 prikazuje glavne stopnje določitve specifičnosti PCR v realnem času z parom oligonukleotidnih začetnikov CC16S-F/CC16S-R ter sonde CC16S za bakterije rodu *Alicyclobacillus*.



Slika 12: Shema glavnih stopenj določitve specifičnosti PCR v realnem času za določanje bakterij rodu *Alicyclobacillus*

3.3.1.3 Določitev občutljivosti PCR v realnem času za določanje bakterij rodu *Alicyclobacillus* v živilu

Slika 13 prikazuje glavne stopnje določanja občutljivosti PCR v realnem času za določanje bakterij rodu *Alicyclobacillus* z parom oligonukleotidnimi začetnikov CC16S-F/CC16S-R in sondno CC16S v sterilni vodi in živilu.



Slika 13: Shema določitve občutljivosti PCR v realnem času za določanje bakterij rodu *Alicyclobacillus* v živilu

3.3.2 Revitalizacija bakterij

Bakterije vrst *A. acidocaldarius*, *A. acidoterrestris*, *A. acidiphilus*, *B. cereus*, *B. cereus*, *B. cereus*, *B. cereus*, *B. subtilis*, *B. coagulans* so bile pred začetkom eksperimentalnega dela zamrznjene v krio-epruvetah z dodatkom glicerola in shranjene pri temperaturi -21 °C.

Postopek za bakterije rodu *Alicyclobacillus*:

Vsebino krio-epruvet, ki smo jo odtajali na sobni temperaturi, smo prelili v 4 ml tekočega selektivnega gojišča BAM, zmešali ter 20 h inkubirali na mešalu (100 obr/min) pri 45 °C. Po končani inkubaciji smo 100 µl kulture prenesli na trdno gojišče AM in ponovno inkubirali 20 h pri 45 °C. Na trdnem gojišču AM so zrasle majhne (2 mm) okrogle kolonije rodu *Alicyclobacillus*, ki so imele značilno beige barvo.

Postopek za bakterije rodu *Bacillus*:

Iz krio-epruvete, ki smo jo odtajali na sobni temperaturi, smo kulturo prenesli s cepilno zanko v 4 ml tekočega ne-selektivnega gojišča BHI, zmešali ter 24 h inkubirali na mešalu (100 obr/min) pri 37 °C. Po končani inkubaciji smo 100 µl kulture prenesli na trdno gojišče TSA in ponovno inkubirali 24 h pri 37 °C.

3.3.3 Namnožitev bakterijskih kultur**Postopek za bakterije rodu *Alicyclobacillus*:**

V 4 ml selektivnega gojišča BAM smo suspendirali izbrano bakterijsko kulturo. Suspenzijo smo nato 20 h inkubirali na mešalu (100 obr/min) pri 45 °C.

Postopek za bakterije rodov *Bacillus*, *Listeria*, *Staphylococcus*:

V 4 ml ne-selektivnega gojišča BHI smo suspendirali izbrano bakterijsko kulturo. Suspenzijo smo nato 24 h inkubirali na mešalu (100 obr/min) pri 37 °C.

Postopek za bakterije vrste *B. stearothermophilus*:

V 4 ml ne-selektivnega gojišča BHI smo suspendirali izbrano bakterijsko kulturo. Suspenzijo smo nato 24 h inkubirali na mešalu (100 obr/min) pri 55 °C.

3.3.4 Umetna kontaminacija vode in živil

Po 20-urni inkubaciji bakterij vrste *A. acidoterrestris* v selektivnem gojišču BAM smo 1 ml suspenzije prenesli v 100 ml sterilne vode, 100 ml vode z okusom Za Life in 100 ml jabolčnega soka. Delali smo v dveh paralelkah.

3.3.5 Določitev števila bakterij z metodo štetja kolonij na trdnem gojišču

V vsaki 20-urni (bakterije rodu *Alicyclobacillus*) in 24-urni kulturi (bakterije rodov *Bacillus*, *Listeria*, *Staphylococcus*) smo število bakterij določili po standardnem postopku (SIST EN ISO 4833 (2003)).

Bakterije rodu *Alicyclobacillus*:

Kulturo smo po 20-urni inkubaciji v gojišču BAM razredčili s fiziološko raztopino (do razredčitve 10^{-7}). 100 µl razredčenega vzorca smo cepili na gojišče AM (v dveh paralelkah) in gojišča nato 20 h inkubirali pri 45 °C.

Bakterije rodov *Bacillus*, *Listeria* in *Staphylococcus*:

Kulturo smo po 24-urni inkubaciji v gojišču BHI razredčili s fiziološko raztopino (do razredčitve 10^{-7}). 100 µl razredčenega vzorca smo cepili na gojišče TSA (v dveh paralelkah) in nacepljena gojišča nato 24 h inkubirali pri 37 °C.

Bakterije vrste *B. stearothermophilus*:

Kulturo smo po 24-urni inkubaciji v gojišču BHI razredčili s fiziološko raztopino (do razredčitve 10^{-7}). 100 µl razredčenega vzorca smo cepili na gojišče TSA (v dveh paralelkah) in nacepljena gojišča nato 24 h inkubirali pri 55 °C.

Po inkubaciji smo na gojiščih prešteli kolonije ter izračunali število bakterij N (cfu/ml). Za gojišča z 15-300 kolonijami smo uporabili enačbo 1:

$$N = \frac{\sum c}{(n_1 + 0,1n_2)} d \quad \dots (1)$$

Legenda:

N ... število mikroorganizmov v cfu/ml

$\sum c$... seštevek vseh kolonij na števnih ploščah

n_1 ... število števnih plošč pri prvi upoštevani razredčitvi

n_2 ... število števnih plošč pri drugi upoštevani razredčitvi

d ... faktor razredčitve pri prvi upoštevani razredčitvi

3.3.6 Priprava bakterijske DNA s topotno lizo bakterijskih celic

Po 20-urni inkubaciji bakterij rodu *Alicyclobacillus* v selektivnem gojišču BAM oziroma po 24-urni inkubaciji bakterij rodov *Bacillus*, *Listeria* in *Staphylococcus* v ne-selektivnsem gojišču BHI smo 1 ml suspenzije prenesli v 1,5 ml epruveto in vsebino centrifugirali 5 min pri 14500 obr/min. Nato smo odstranili supernatant, dodali 100 µl H₂O_{KEM} ter suspenzijo segrevali v vodni kopeli 15 min pri 95 °C. Po končani lizi smo epruvete postavili na led (Klančnik in sod., 2003).

3.3.7 Izolacija DNA

Postopek izolacije bakterijske DNA smo povzeli po Flamuu in sod (1984). Po 20-urni inkubaciji bakterij rodu *Alicyclobacillus* v gojišču BAM smo 2 ml kulture prenesli v 2 ml epruvete. Nato smo vsebino centrifugirali 2 min pri 13000 x g. Po odstranitvi supernatanta, smo peletu dodali 1 ml SSC ter premešali na vrtinčnem mešalu. Nato smo vsebino ponovno centrifugirali 2 min pri 13000 x g. Po odstranitvi supernatanta smo dodali 100 µl raztopine lizocima, premešali ter inkubirali 45 min pri 37 °C v vodni kopeli. Po končani inkubaciji smo dodali 200 µl pufra TE, 100 µl pufra TE s sarkozinom, 100 µl pufra TE s sveže dodano proteinazo K ter ponovno inkubirali 1 h pri 37 °C v vodni kopeli. Po končani inkubaciji smo vsebino 1 min mešali na vrtinčnem mešalu.

Delo smo nadaljevali v digestoriju. Dodali smo 500 µl fenola nasičenega s Trisom in vsebino dobro premešali. Sledilo je 2 min centrifugiranje pri 12000 x g. Nato smo previdno odpipetirali zgornjo vodno fazo z DNA v novo 1,5 ml epruveto in dodali 500 µl kloroform, premešali na vrtičnem mešalu in 2 min centrifugirali pri 12000 x g. Ponovno smo pazljivo odpipetirali zgodnjo vodno fazo z DNA v novo 1,5 ml epruveto, dodali 500 µl kloroform, premešali ter centrifugirali 2 min pri 12000 x g. Nato smo pazljivo odpipetirali zgornjo vodno fazo z DNA v novo 1,5 ml epruveto.

Delo smo nadaljevali izven digestorija. Dodali smo 50 µl Na-acetata in 1 ml 100 % etanola ter dobro premešali. Po 30-minutni inkubaciji pri -20 °C smo vsebino centrifugirali 10 min pri 13000 x g. Nato smo previdno odstranili supernatant, peletu dodali 500 µl 80 % ledenega etanola ter premešali in centrifugirali 5 min pri 13000 x g. Nato smo odstranili supernatant in pelet posušili v aseptični komori na zraku. Na koncu smo peletu dodali 200 µl vode in osnovno raztopino DNA hranili pri -20 °C.

3.3.8 Potek PCR v realnem času

3.3.8.1 Priprava reakcijske mešanice za PCR v realnem času

Za vsak PCR v realnem času smo pripravili novo reakcijsko mešanico. Volumen reakcijske mešanice z dodano DNA za en vzorec je vedno znašal 25 µl. Vsak vzorec smo vedno delali v dveh paralelkah. Za vsako serijo PCR v realnem času smo naredili 2 negativni kontroli (NTC). V vzorce za negativno kontrolo smo v reakcijsko mešanico namesto bakterijske DNA dodali enako količino sterilne, deionizirane, DNA proste vode (H_2O_{PCR}).

Reakcijska mešanica za PCR v realnem času z parom oligonukleotinih začetnikov CC16S-F/CC16S-R:

- Power SYBR® Green PCR Master Mix 2x : 12,5 µl
- Par oligonukleotidnih začetnikov za bakterije rodu *Alicyclobacillus*:
 - CC16S-F: 1,5 µl
 - CC16S-R: 1,5 µl

- H₂O_{PCR}

Reakcijska mešanica za PCR v realnem času z parom oligonukleotidnih začetnikov CC16S-F/CC16S-R ter sondou CC16S:

- *TaqMan®* Univerzal PCR Master Mix : 12,5 µl
- Par oligonukleotidnih začetnikov za bakterije rodu *Alicyclobacillus*:
 - CC16S-F: 1,5 µl
 - CC16S-R: 1,5 µl
- Sonda za bakterije rodu *Alicyclobacillus*:
 - CC16S: 0,375 µl
- H₂O_{PCR}

3.3.8.2 PCR v realnem času

Potek PCR v realnem času s parom oligonukleotidnih začetnikov CC16S-F/CC16S-R:

V vrstične posodice s pokrovčki za izvedbo PCR v realnem času smo dali po 23 µl reakcijske mešanice in 2 µl lizata DNA ter ploščico postavili v posebno držalo v aparatu ABI Prism 7500 in izvedli pomnoževanje DNA z naslednjim časovno-temperaturnim programom:

- **Prva faza:** aktivacija DNA-polimeraze, ki je trajala 2 min pri 50 °C
- **Druga faza:** aktivacija DNA-polimeraze, ki je trajala 10 min pri 95 °C
- **Tretja faza:** ta faza vsebuje 40 ciklov sestavljenih iz:
 - Denaturacije DNA, ki je trajala 15 s pri 95 °C
 - Prileganja oligonukleotidnih začetnikov na specifične dele DNA ter podaljševanja specifičnih oligonukleotidnih začetnikov, ki je trajalo 1 min pri 60°C
- **Četrta faza:** disociacije DNA, ki je sestavljena iz:
 - denaturacije DNA, ki je trajala 15 s pri 95 °C
 - prileganja DNA, ki je trajalo 1 min pri 60 °C.

Potek PCR v realnem času s parom oligonukleotidnih začetnikov CC16S-F/CC16S-R ter sondou CC16S:

V vrstične posodice s pokrovčki smo dali po 23 µl reakcijske mešanice in 2 µl lizata DNA ter jih postavili na posebno držalo v aparatu ABI Prism 7500 in izvedli pomnoževanje DNA z naslednjim časovno-temperaturnim programom:

- **Prva faza:** aktivacija DNA-polimeraze, ki je trajala 2 min pri 50 °C
- **Druga faza:** aktivacija DNA-polimeraze, ki je trajala 10 min pri 95 °C
- **Tretja faza:** ta faza vsebuje 40 ciklov sestavljenih iz:
 - Denaturacije DNA, ki je trajala 15 s pri 95 °C

- Prileganja oligonukleotidnih začetnikov in oligonukleotidne sonde na specifične dele DNA ter podaljševanja specifičnih oligonukleotidnih začetnikov in oligonukleotidne sonde, ki je trajalo 1 min pri 60 °C.

Potek PCR v realnem času s parom oligonukleotidnih začetnikov CC16S-F/CC16S-R ter sondno CC16S (Connor in sod., 2005):

V vrstične posodice s pokrovčki smo dali po 23 µl reakcijske mešanice in 2 µl lizata DNA ter jih postavili na posebno držalo v aparatu ABI Prism 7500 in izvedli pomnoževanje DNA z naslednjim časovno-temperaturnim programom:

- **Prva faza:** aktivacija DNA-polimeraze, ki je trajala 2 min pri 50 °C
- **Druga faza:** aktivacija DNA-polimeraze, ki je trajala 10 min pri 95 °C
- **Tretja faza:** ta faza vsebuje 40 ciklov sestavljenih iz:
 - Denaturacije DNA, ki je trajala 30 s pri 95 °C
 - Prileganja oligonukleotidnih začetnikov in oligonukleotidne sonde na specifične dele DNA ter podaljševanja specifičnih oligonukleotidnih začetnikov in oligonukleotidne sonde, ki je trajalo 45 s pri 55 °C.

3.3.9 Dokazovanje pomnožkov z agarozno gelsko elektroforezo

Pomnožke smo v nekaterih primerih dokazovali tudi z agarozno gelsko elektroforezo. K 8 µl pomnožka smo dodali 2 µl barvila za nanos pomnožkov. Nato smo raztopino nanesli v 1,5 % agarozni gel v pufru TAE 0,5x. Na gel smo nanesli tudi molekularni označevalci pomnožkov DNA (100 bp DNA Ladder). Elektroforeza je potekala pri konstantni napetosti (100 V). Po končani elektroforezi smo gel 10-15 min barvali v raztopini EtBr, ter ga nato opazovali pod UV svetlobo in ga računalniško dokumentirali. Velikost pomnožkov smo odčitali glede na velikost fragmentov molekularnega označevalca. Velikost pomnožka 294 bp je pomenila prisotnost bakterij rodu *Alicyclobacillus*.

3.3.10 Vrednotenje rezultatov PCR v realnem času

Rezultate PCR v realnem času smo vrednotili z naslednjimi parametri:

Vrednost Ct:

Izmerjeno intenziteto fluorescentnega signala smo izrazili z vrednostjo Ct. Vrednost Ct je število ciklov, pri katerem se intenziteta fluorescentnega signala poveča nad 10x standardno deviacijo fluorescence osnovne črte oz. ozadja. Čim več je bilo v vzorcu tarčne DNA, tem hitreje bo naraščala intenziteta fluorescence in manjša je bila vrednost Ct.

Pri naših eksperimentih je bil pozitiven rezultat tista vrednost Ct, ki je bila manjša kot vrednost Ct za negativne kontrole (NTC), negativen rezultat pa vsaka vrednost Ct, ki je bila enaka ali večja od vrednosti Ct za NTC.

Učinkovitost encimske reakcije:

Za določitev učinkovitosti encimske reakcije smo izračunali enačbo standardne krivulje, ki smo jo dobili tako, da smo na os x nanašali logaritem števila bakterij ($N(\log \text{cfu/ml})$), na os y pa vrednosti C_t . Učinkovitost encimske reakcije smo izračunali po enačbi 2 (Pfaffl, 2004).

$$E = 10^{\frac{1}{k}} \quad \dots (2)$$

Legenda:

E ... učinkovitost encimske reakcije

k ... naklon premice

Učinkovitost encimske reakcije je dobra, kadar je naklon premice standardne krivulje (k) med vrednostmi -3,1 in -3,6 in če je izračunana učinkovitost med 1,6 in 2,10 (Pfaffl, 2004).

Standardna deviacija

S standardno deviacijo oz. standardnim odklonom smo izračunali povprečno odstopanje od povprečne vrednosti. Standardno deviacijo smo izračunali po enačbi 3.

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}{N-1}} \quad \dots (3)$$

Izračunali smo SD, ki nam daje \pm odstopanja vrednosti od povprečne vrednosti in območje pozitivnih rezultatov.

Pri nespecifični metodi določanje pomnožkov je območje pozitivnih rezultatov pri $T_m = 83,4 \pm 0,3 \text{ } ^\circ\text{C}$.

Občutljivost PCR v realnem času:

Občutljivost PCR je bila določena kot najnižja koncentracija celic, ki smo jo lahko določili v izbranih razmerah priprave vzorca in izvedbe PCR.

Specifičnost PCR v realnem času:

Specifičnost PCR v realnem času smo določali z bakterijami rodu *Bacillus*, *Listeria*, *Staphylococcus* ter bakterijami rodu *Alicyclobacillus* kot pozitivno kontrolo in smo jo podali kot specifičnost PCR v realnem času za bakterije rodu *Alicyclobacillus*.

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1 PCR V REALNEM ĖASU Z NESPECIFIČNO METODO DOLOČANJA POMNOŽKOV

4.1.1 Optimizacija koncentracije oligonukleotidnih začetnikov CC16S-F/CC16S-R za določanje bakterij rodu *Alicyclobacillus*

Določanje optimalne koncentracije oligonukleotidnih začetnikov CC16S-F/CC16S-R je potekalo tako, da smo vzorcem z oznakami 1, 2, 3 in NTC dodali v reakcijske mešanice za PCR v realnem času različne koncentracije oligonukleotidnih začetnikov CC16S-F/CC16S-R in sicer 50 nM, 100 nM, 300 nM, 450 nM, 600 nM, 900 nM. Vzorci 1-3 so vsebovali desetkratne serijske razredčitve bakterij vrste *A. acidoterrestris*. Vzorec z oznako NTC je bil negativna kontrola, ki je namesto tarčne DNA vseboval vodo (H_2O_{PCR}). Rezultati PCR v realnem času pri različnih koncentracijah oligonukleotidnih začetnikov CC16S-F/CC16S-R so prikazani v preglednici 8.

Kot najboljšo koncentracijo oligonukleotidnih začetnikov CC16S-F/CC16S-R smo glede na vrednost Ct, korelacijskega koeficiente, naklona standardne krivulje ter temperaturo taljenja pomnožka izbrali 600 nM.

V naših rezultatih je bila določena koncentracija oligonukleotidnih začetnikov CC16S-F/CC16S-R 600 nM, kar je primerljivo z že objavljenimi rezultati. Groenewald in Gouws (2008) ter Groenewald in sod. (2009) so uporabili enako koncentracijo oligonukleotidnih začetnikov CC16S-F/CC16S-R 600 nM.

Preglednica 8: Optimizacija PCR v realnem času pri koncentracijah CC16S-F/CC16S-R od 50 nM do 900 nM

C (nM)	Oznaka vzorca	Ct (n=2)	R ²	Naklon / E	Tm (°C) (n=2)
50	1	27,78	/	/	67,8
	2	31,29			83,3
	3	36,58			82,6
	NTC	nezaznavno			78,5
100	1	25,20	/	/	68,9
	2	30,29			83,5
	3	33,07			83,5
	NTC	nezaznavno			69,7
300	1	22,52	0,95	-4,00 / 1,78	83,7
	2	28,10			83,7
	3	30,52			83,7
	NTC	nezaznavno			73,0
450	1	22,96	/	/	82,9
	2	27,92			83,3
	3	29,00			83,3
	NTC	nezaznavno			70,0
600	1	19,65	0,95	-4,48 / 1,67	83,5
	2	25,91			83,7
	3	28,60			83,7
	NTC	nezaznavno			69,8
900	1	20,85	0,85	-4,04 / 1,77	83,7
	2	27,79			83,5
	3	28,93			83,5
	NTC	nezaznavno			69,6

Legenda: C - koncentracija, Ct - poprečna vrednost n paralelk, n - število paralelk, R² - korelacijski koeficient standardne krivulje, E - učinkovitost reakcije, Tm - temperatura taljenja pomnožka kot povprečna vrednost n paralelk, NTC - negativna kontrola

4.1.2 Določanje bakterij rodu *Alicyclobacillus* s PCR v realnem času

Da bi preverili ustreznost encimske reakcije smo PCR v realnem času izvedli s tipskimi sevi bakterij vrst *A. acidocaldarius*, *A. acidoterrestris* in *A. acidiphilus*. Uporabili smo oligonukleotidne začetnike CC16S-F/CC16S-R s koncentracijo 600 nM. DNA smo pripravili z toplotno lizo. Rezultati določanja zgoraj naštetih bakterijskih vrst s PCR v realnem času so prikazani v preglednici 9.

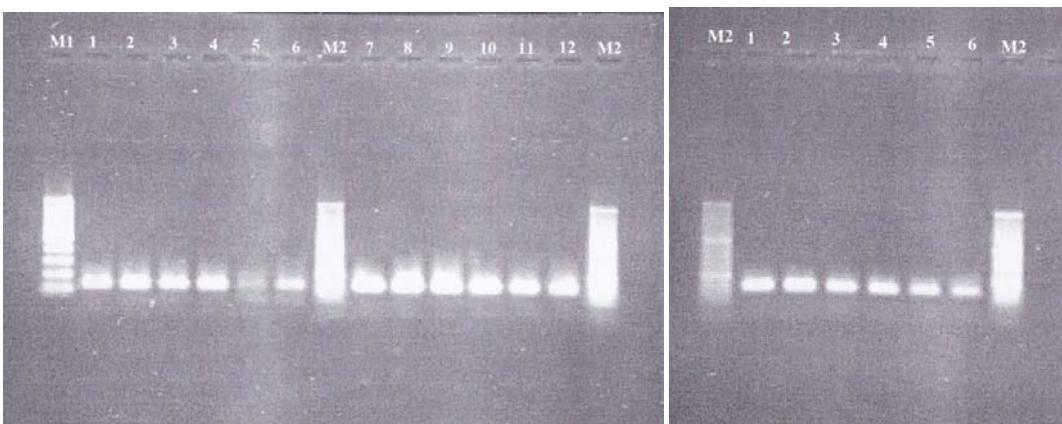
Iz rezultatov v preglednici 9 vidimo, da PCR v realnem času omogoča določitev vseh treh vrst bakterij rodu *Alicyclobacillus*, vendar pa je naklon standardne krivulje oziroma

učinkovitost posamezne reakcije slaba. Dokazovanje pomnožkov bakterij vrste *A. acidocaldarius*, *A. acidoterrestris* in *A. acidiphilus* z gelsko elektroforezo je prikazano na sliki 14.

Preglednica 9: Določanje tipskih sevov bakterij rodu *Alicyclobacillus* s PCR v realnem času

Sev	N ₀ (cfu/ml)	Ct (n=2)	R ²	Naklon / E	Tm (°C) (n=2)
<i>A. acidocaldarius</i> ŽMJ183	100*	27,68	0,98	-4,14 / 1,74	82,9
	10*	30,87			83,1
	1*	35,96			82,9
<i>A. acidoterrestris</i> ŽMJ184	1,09 x 10 ⁶	15,04	0,99	-7,77 / 1,34	83,6
	1,09 x 10 ⁵	23,50			83,3
	1,09 x 10 ⁴	30,58			83,6
<i>A. acidiphilus</i> ŽMJ185	100*	24,38	0,99	-5,03 / 1,58	83,6
	10*	28,95			83,6
	1*	34,43			82,9
NTC	0	nezaznavno	/	/	77,5

Legenda: Ct - poprečna vrednost n paralelk, n - število paralelk, R² - korelacijski koeficient standardne krivulje, E - učinkovitost reakcije, Tm - temperatura taljenja pomnožka kot povprečna vrednost n paralelk, NTC - negativna kontrola, * - ocena



Slika 14: Agarozna gelska elektroforeza pomnožkov bakterij vrst *A. acidocaldarius*, *A. acidoterrestris* (A) in *A. acidiphilus* (B)

Legenda:

(A):

M1: molekularni označevalec pomnožkov DNA (100 bp DNA Ladder)

1 in 2: *A. acidocaldarius*, 100 cfu/ml

3 in 4: *A. acidocaldarius*, 10 cfu/ml

5 in 6: *A. acidocaldarius*, 1 cfu/ml

M2: molekularni označevalec pomnožkov DNA (20bp DNA Ladder)

7 in 8: *A. acidoterrestris*, 1,09 x 10⁶ cfu/ml

9 in 10: *A. acidoterrestris*, 1,09 x 10⁵ cfu/ml

11 in 12: *A. acidoterrestris*, 1,09 x 10⁴ cfu/ml

(B):

M2: molekularni označevalec pomnožkov DNA (20bp DNA Ladder)

1 in 2: *A. acidiphilus*, 100 cfu/ml

3 in 4: *A. acidiphilus*, 10 cfu/ml

5 in 6: *A. acidiphilus*, 1 cfu/ml

Ker je bila učinkovitost posamezne reakcije slaba smo z agarozno gelsko elektroforezo preverili pomnožke posamezne encimske reakcije izvedene z bakterijami vrst *A. acidocaldarius*, *A. acidoterrestris* in *A. acidiphilus*. Agarozna gelska elektroforeza se uporablja za dokazovanje pomnožkov pri klasičnemu PCR in RT-PCR (reverzna transkripcija in PCR). Yamazaki in sod. (1996a) so določili bakterije vrste *A. acidoterrestris* v 1 ml jabolčnega soka z RT-PCR, in sicer brez obogativitve so določili 10^4 - 10^6 cfu/ml in z 15-urno obogativitvijo 2 - 3 cfu/ml.

4.1.3 Občutljivost PCR v realnem času za določanje bakterij rodu *Alicyclobacillus*

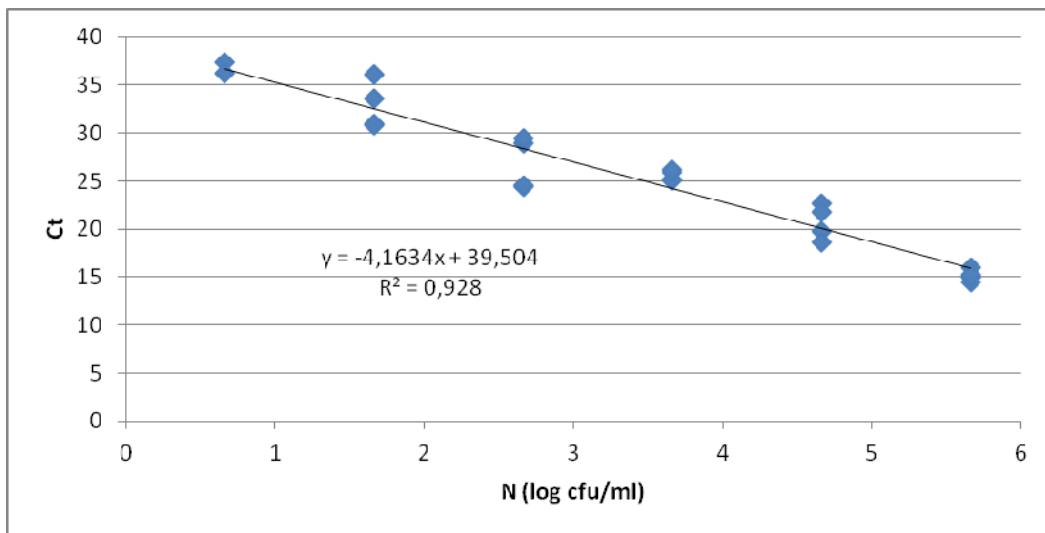
Občutljivost PCR v realnem času smo določali z sevom *A. acidoterrestris*. Uporabili smo 600 nM koncentracijo oligonukleotidnih začetnikov CC16S-F/CC16S-R. DNA smo pripravili z toplotno lizo. Rezultati določanja občutljivosti PCR v realnem času so prikazani v preglednici 10 (prilogi A1 in A3).

Preglednica 10: Občutljivost PCR v realnem času z oligonukleotidnimi začetniki CC16S-F/CC16S-R

Oznaka vzorca	N_0 (cfu/ml) (n=2)	Ct \pm SD (n=4)	Tm (°C) (n=4)	R ²	Naklon / E
1	$4,6 \times 10^5$	$15,18 \pm 0,63$	83,6	0,93	-4,16 / 1,74
2	$4,6 \times 10^4$	$20,74 \pm 1,85$	83,8		
3	$4,6 \times 10^3$	$25,58 \pm 0,55$	83,7		
4	$4,6 \times 10^2$	$26,85 \pm 2,74$	83,7		
5	$4,6 \times 10^1$	$32,90 \pm 2,50$	83,4		
6*	$4,6 \times 10^0$	$36,80 \pm 0,86$	83,5		
7**	$4,6 \times 10^{-1}$	34,34	83,6		
8**	$4,6 \times 10^{-2}$	nezaznavno	71,5		
NTC*	0	nezaznavno	69,8	/	/

Legenda: N_0 (cfu/ml) - povprečna vrednost n paralek, Ct - poprečna vrednost n paralelk, n - število paralek, R² - korelacijski koeficient standardne krivulje, E - učinkovitost reakcije, Tm - temperatura taljenja pomnožka kot povprečna vrednost n paralelk, NTC - negativna kontrola, * - n=2, ** - n=1

Pri vzorcih 1 do 6 so bili rezultati PCR pozitivni, kar pomeni, da je bila občutljivost PCR v realnem času za določanja bakterij rodu *Alicyclobacillus* 4,6 cfu/ml (preglednica 10). Pri vzorcu z oznako 7 smo pozitiven rezultat dobili le enkrat in ga zato nismo upoštevali pri določitvi občutljivosti in izračunu učinkovitosti reakcije, pri vzorcu 8 pa smo videli, da kljub ustrezni vrednosti Ct to ni bil pravi pomnožek, saj je bila temperatura taljenja pomnožka povsem drugačna od temperature taljenja pomnožka značilnega za bakterije rodu *Alicyclobacillus*.



Slika 15: Standardna krivulja PCR v realnem času za določanje bakterij rodu *Alicyclobacillus* pri 600 nM koncentraciji oligonukleotidnih začetnikov CC16S-F/CC16S-R

Standardna krivulja PCR v realnem času za določanje bakterij rodu *Alicyclobacillus* je imela naklon -4,16, kar je izven območja -3,1 do -3,6, medtem ko je bila učinkovitost reakcije 1,74, kar je v območju idealne vrednosti, ki znaša med 1,6 in 2,10 (Pfaffl, 2004). Vrednost R^2 je bila 0,93, kar je dokaj daleč od idealne vrednosti, ki znaša 1 (slika 15). Učinkovitost encimske reakcije je lahko slabša zaradi različnih vzrokov kot je na primer inhibicija reakcije. Pri našem delu smo za pripravo DNA uporabljali toplotno lizo kar pomeni, da smo v samo encimsko reakcijo vnesli poleg DNA tudi veliko celičnih sestavin, ki lahko inhibirajo encimsko reakcijo. Drug možen vzrok je tvorba dimerov med samimi oligonukleotidnimi začetniki.

S PCR v realnem času in oligonukleotidnima začetnikoma CC16S-F/CC16S-R smo določili bakterije rodu *Alicyclobacillus* v koncentraciji do 4,6 cfu/ml, kar je primerljivo z objavljenimi rezultati. Steyn in sod. (2011a) so z enako metodo in enakimi oligonukleotidnimi začetniki dosegli občutljivost PCR metode za bakterije rodu *Alicyclobacillus* 1×10^{-1} cfu/ml. Podobno so tudi Steyn in sod (2011b) z enakimi oligonukleotidnimi začetniki določili vegetativne celice v jabolčnem soku med 1 in 1400 cfu/ml.

4.1.4 Specifičnost oligonukleotidnih začetnikov CC16S-F/CC16S-R za določanje bakterij rodu *Alicyclobacillus* s PCR v realnem času

Specifičnost oligonukleotidnih začetnikov CC16S-F/CC16S-R smo določili tako, da smo izvedli PCR v realnem času s sevom bakterij vrste *A. acidoterrestris* in z 9 sevi sorodnih bakterij rodov *Bacillus*, *Listeria* in *Staphylococcus*. DNA je bila pripravljena z topotno lizo, v reakcijsko mešanico za PCR smo dodali 600 nM oligonukleotidnih začetnikov

CC16S-F/CC16S-R. Rezultati določanja specifičnosti oligonukleotidnih začetnikov CC16S-F/CC16S-R za določanje bakterij rodu *Alicyclobacillus* so prikazani v preglednici 11.

Iz rezultatov vidimo, da oligonukleotidna začetnika CC16S-F/CC16S-R pomnožujeta dele DNA večine testiranih bakterij. Poleg določitve vrednosti Ct za posamezno encimsko reakcijo smo specifičnost encimske reakcije preverjali s temperaturo taljenja pomnožkov. Temperatura taljenja pomnožka pri bakterijah rodu *Alicyclobacillus* je zelo podobna kot pri bakterijah vrst *B. cereus* ŽMJ164, *B. cereus* ŽMJ165, *B. cereus* ŽMJ166, *B. stearothermophilus* ZIM102, *L. monocytogenes* ŽM58.

Vzrok določitve posamezne encimske reakcije kot pozitivne z določitvijo vrednosti Cti je v vezavi fluorogenega barvila SYBR® Green I na vse pomnožke, tako specifične kot nespecifične, kar daje lažno pozitivne rezultate (Applied Biosystems, 2005). Zaradi sorodnosti med bakterijam rodov *Bacillus* in *Alicyclobacillus*, smo v nekaterih primerih dobili lažno pozitivne rezultate z enako temperaturo taljenja pomnožka kot smo jo dosegli pri bakterijah rodu *Alicyclobacillus*.

Preglednica 11: Specifičnost oligonukleotidnih začetnikov CC16S-F/CC16S-R za določanje bakterij rodu *Alicyclobacillus* s PCR v realnem času

Sev	N ₀ (cfu/ml)	Ct (n=2)	Tm (°C) (n=2)
<i>A. acidoterrestris</i> ŽMJ184	4,46 x 10 ⁶	18,59	83,0
	4,46 x 10 ⁵	22,90	83,2
<i>B. cereus</i> ŽMJ91	3,5 x 10 ⁶	22,71	75,0
	3,5 x 10 ⁵	30,21	82,4
<i>B. cereus</i> ŽMJ164	1 x 10 ⁶	39,38	74,4
	1 x 10 ⁵	31,59	82,8
<i>B. cereus</i> ŽMJ165	10 ⁷ *	32,29	82,4
	10 ⁶ *	31,88	83,0
<i>B. cereus</i> ŽMJ166	8 x 10 ⁶	nezaznavno	73,5
	8 x 10 ⁵	32,63	83,1
<i>B. subtilis</i> ŽMJ97	7,5 x 10 ⁶	32,85	75,7
	7,5 x 10 ⁵	35,19	82,4
<i>B. coagules</i> ŽMJ98	6 x 10 ⁶	36,26	80,2
	6 x 10 ⁵	39,03	74,8
<i>B. stearothermophilus</i> ZIM102	3,1 x 10 ⁷	29,95	83,7
	3,1 x 10 ⁶	34,07	83,7
<i>L. monocytogenes</i> ŽM58	2,3 x 10 ⁸	29,79	82,6
	2,3 x 10 ⁷	34,12	82,9
<i>S. aureus</i> ŽM506	2,8 x 10 ⁸	nezaznavno	71,4
	2,8 x 10 ⁷	37,63	75,3
NTC	0	nezaznavno	/

Legenda: Ct - poprečna vrednost n paralelk, n - število paralek, Tm - temperatURA taljenja pomnožka kot povprečna vrednost n paralelk, NTC - negativna kontrola, * - ocena,

4.1.5 Določanje bakterij rodu *Alicyclobacillus* s PCR v realnem času v umetno kontaminirani pitni vodi

Sterilno pitno vodo smo umetno kontaminirali tako, da smo ji dodali 1 ml suspenzije bakterij vrste *A. acidoterrestris*. Uporabili smo oligonukleotidne začetnike CC16S-F/CC16S-R, ki so specifični za bakterije rodu *Alicyclobacillus*. DNA smo pripravili z toplotno lizo. V reakcijsko mešanico za PCR v realnem času smo dodali 600 nM oligonukleotidnih začetnikov.

Naprej smo izvedli predpreizkus direktnega določanja bakterij vrste *A. acidoterrestris* s PCR v realnem času v umetno kontaminirani vodi. Imeli smo dva vzorca in NTC kot negativno kontrolo. Delali smo v dveh paralelkah. Vzorec 1 s koncentracijo celic $6,15 \times 10^3$ cfu/ml je imel povprečno $T_m = 82,7$ °C in vzorec 2 s koncentracijo celic $2,26 \times 10^4$ cfu/ml je imel povprečno $T_m = 83,3$ °C, kar je pozitivni PCR rezultat.

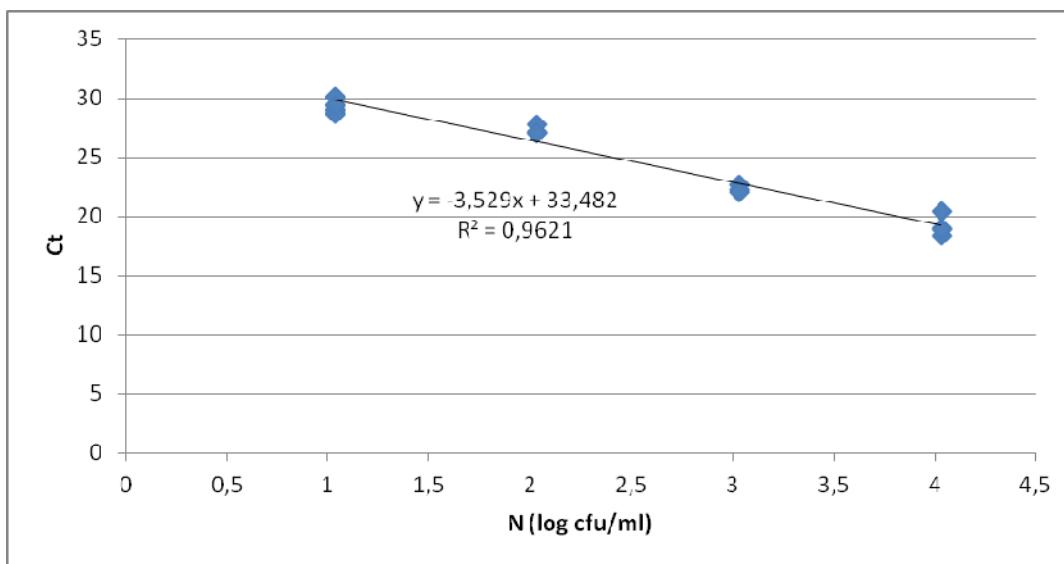
Zaradi dobrega rezultata predpreizkusa pri direktnem določanju bakterij vrste *A. acidoterrestris* smo želeli določili občutljivost PCR v realnem času v umetno kontaminirani vodi. DNA smo pripravili z toplotno lizo, reakcijski mešanici smo dodali 600 nM oligonukleotidnih začetnikov. Rezultati določanja občutljivosti PCR v realnem času za določanje bakterij vrste *A. acidoterrestris* z oligonukleotidnima začetnikoma CC16S-F/CC16S-R v umetno kontaminirani vodi so prikazani v preglednici 12.

Preglednica 12: Občutljivost PCR v realnem času za določanje bakterij rodu *Alicyclobacillus* v umetno kontaminirani vodi

Oznaka vzorca	N_0 (cfu/ml)	Ct (n=4)	R^2	Naklon / E	T_m (°C) (n=4)
1	$1,08 \times 10^4$	19,18	0,96	-3,53 /	83,9
2	$1,08 \times 10^3$	22,41		1,92	83,9
3	$1,08 \times 10^2$	27,29			84,1
4	$1,08 \times 10^1$	29,31			84,2
5	$1,08 \times 10^0$	37,68		/	76,6
NTC	0	nezaznavno	/	/	/

Legenda: Ct - poprečna vrednost n paralelk, n - število paralelk, R^2 - korelacijski koeficient standardne krivulje, E - učinkovitost reakcije, T_m - temperatura taljenja pomnožka kot povprečna vrednost n paralelk, NTC - negativna kontrola

Iz preglednice 12 vidimo da so bili pri vseh vzorcih rezultati pozitivni, razen pri vzorcu 5, kjer je bila koncentracija celic $1,08 \times 10^0$ cfu/ml, je bil rezultat negativen. Občutljivost PCR v realnem času za določanje bakterij rodu *Alicyclobacillus* v umetno kontaminirani vodi je bila $1,08 \times 10^1$ cfu/ml.



Slika 16: Standardna krivulja PCR v realnem času za določanje bakterij rodu *Alicyclobacillus* v umetno kontaminirani vodi

Pri določanju občutljivosti PCR v realnem času za določanje bakterij rodu *Alicyclobacillus* v umetno kontaminirani vodi je bil naklon standardne krivulje -3,53 oziroma učinkovitost reakcije 1,92 zelo dobra (Pfaffl, 2004). Koreacijski koeficient je bil s svojo vrednostjo 0,96 dokaj blizu idealne vrednosti (slika 16).

Pri direktnem določanju bakterij vrste *A. acidoterrestris* s PCR v realnem času smo v pitni vodi določili 10,8 cfu/ml, kar je slabše kot občutljivost PCR v realnem času za določanje čiste kulture bakterij rodu *Alicyclobacillus*, kjer smo določili 4,6 cfu/ml (slika 15, preglednica 10). Naklon (-3,53) in koreacijski koeficient (0,96) standardne krivulje za direktno določanje bakterij vrste *A. acidoterrestris* sta bila boljša kot naklon (-4,16) in koreacijski koeficient (0,93) pri standardni krivulji PCR v realnem času za določanje bakterij rodu *Alicyclobacillus*. Učinkovitost obeh reakcij (1,74 in 1,92) je bila znotraj idealnega območja, ki znaša med 1,6 in 2,10 (Pfaffl, 2004).

4.2 PCR V REALNEM ĒASU S SPECIFIČNO METODO DOLOČANJA POMNOŽKOV

Specifičnost oligonukleotidnih začetnikov CC16S-F/CC16S-R za določanje bakterij rodu *Alicyclobacillus* je bila slaba (preglednica 11) in zato smo se odločili za uporabo sonce CC16S.

4.2.1 Optimizacija koncentracije sonde CC16S za določanje bakterij rodu *Alicyclobacillus*

Določanje optimalne koncentracije sonde CC16S je potekalo tako, da smo vzorcu z oznako 1 in NTC dodali v reakcijske mešanice za PCR v realnem času različne koncentracije sonde CC16S in sicer 50 nM, 100 nM, 150 nM in 200 nM. Poleg različnih koncentracij sonde smo v reakcijski mešanici vedno imeli 600 nM koncentracijo oligonukleotidnih začetnikov CC16S-F/CC16S-R. Vzorec 1 je vseboval bakterije vrste *A. acidoterrestris* in vzorec z oznako NTC je bil negativna kontrola, ki je namesto tarčne DNA vseboval vodo (H_2O_{PCR}). Rezultati PCR v realnem času pri 600 nM oligonukleotidnih začetnikov CC16S-F/CC16S-R in različnih koncentracijah sonde CC16S so prikazani v preglednici 13.

Preglednica 13: Optimizacija PCR v realnem času pri koncentracijah sonde CC16S od 50 nM do 200 nM

C (nM)	Oznaka vzorca	N_0 (cfu/ml)	Ct (n=2)
50	1	$1,34 \times 10^4$	nezaznavno
	NTC	0	nezaznavno
100	1	$1,34 \times 10^4$	39,15
	NTC	0	nezaznavno
150	1	$1,34 \times 10^4$	32,26
	NTC	0	nezaznavno
200	1	$1,34 \times 10^4$	32,19
	NTC	0	nezaznavno

Legenda: C - koncentracija, Ct - poprečna vrednost n paralelk, n - število paralelk, NTC - negativna kontrola

Kot je prikazano v preglednici 13 so bile vrednosti Ct pri 50 nM in 100 nM negativne, pri 200 nM so bile skoraj enake kot pri 150 nM, zato smo kot optimalno koncentracijo sonde CC16S izbrali 150 nM.

Z našim eksperimentom smo določili kot optimalno množino oligonukleotidne sonde CC16S 0,34 nmol, kar je približno 10 x več kot navajajo že objavljeni rezultati. Connor in sod. (2005) so uporabili koncentracijo oligonukleotidne sonde CC16S 0,05 nmol. Podobno so tudi Luo in sod. (2004) uporabili koncentracijo oligonukleotidne sonde 5'-TCRGARGACGTCACCGC-3' 0,03 nmol.

4.2.2 Občutljivost PCR v realnem času za določanje bakterij rodu *Alicyclobacillus*

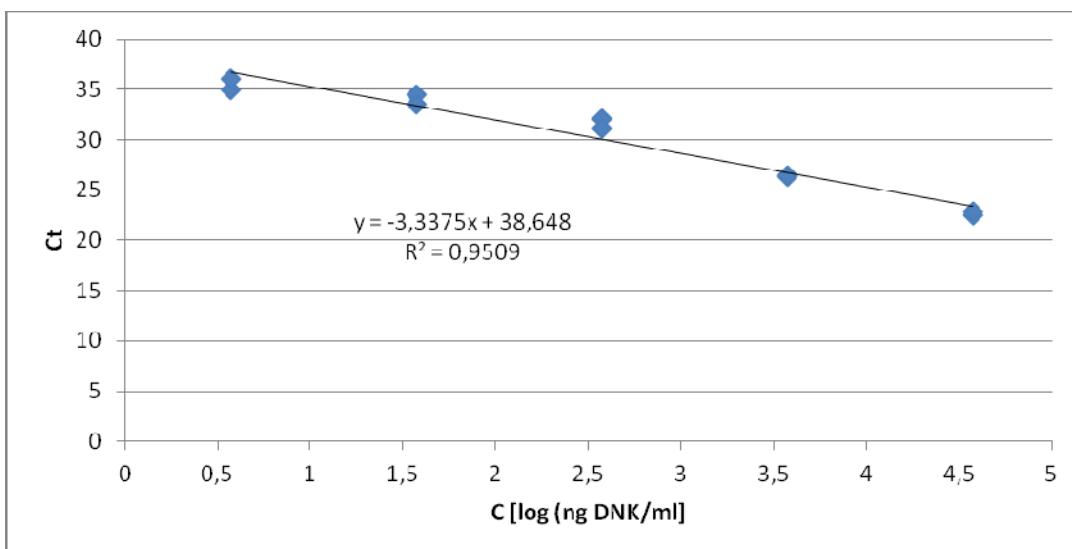
Občutljivost PCR v realnem času smo določali s čisto DNA bakterij vrste *A. acidoterrestris*. Spektrofotometrično določena koncentracija izolirane DNA bakterij vrste *A. acidoterrestris* je bila 37,5 µg/ml. Uporabili smo sondu CC16S s koncentracijo 150 nM in par oligonukleotidnih začetnikov CC16S-F/CC16S-R s koncentracijo 600 nM. DNA smo izolirali po postopku, ki ga navajajo Flamm in sod. (1984). Rezultati določanja občutljivosti PCR v realnem času z čisto DNA so prikazani v preglednici 14 (priloga A2).

Preglednica 14: Občutljivost PCR v realnem času s sondou CC16S za določanje čiste DNA bakterij vrste *A. acidoterrestris*

Oznaka vzorca	Koncentracija DNA (ng/ml)	Ct (n=2) ± SD	R ²	Naklon / E
1	37500	22,67 ± 0,21	0,95	-3,33 / 1,99
2	3750	26,40 ± 0,04		
3	375	31,63 ± 0,72		
4	37,5	34,07 ± 0,67		
5	3,75	35,53 ± 0,74		
6*	0,375	38,38		
NTC	0	nezaznavno	/	/

Legenda: Ct - poprečna vrednost n paralek, n - število paralek, SD - standardna deviacija, NTC - negativna kontrola, R² - koreacijski koeficient standardne krivilje, E - učinkovitost reakcije, * - n=1

Iz preglednice 14 je razvidno, da so bili vzorci od 1 do 5 pozitivni, kar pomeni da smo še uspeli določiti 3,75 ng/ml čiste DNA bakterij vrste *A. acidoterrestris*. Pri vzorcu z oznako 6 smo dobili pozitivni rezultat le enkrat in ga zato nismo upoštevali pri določitvi občutljivosti in izračunu učinkovitosti reakcije.



Slika 17: Standardna krivulja PCR v realnem času za določanje čiste DNA bakterij vrste *A. acidoterrestris*

Koreacijski koeficient standardne krivulje je bil s svojo vrednostjo 0,95 dokaj blizu idealne vrednosti, medtem ko sta bila naklon (-3,33) in učinkovitost (1,99) reakcije zelo dobra (Pfaffl, 2004) (slika 17).

Nato smo določili še praktično občutljivost PCR v realnem času z sevom *A. acidoterrestris*. Uporabili smo sondu CC16S s koncentracijo 150 nM in par oligonukleotidnih začetnikov CC16S-F/CC16S s koncentracijo 600 nM. DNA smo pripravili s topotno lizo. Rezultati določanja občutljivosti PCR v realnem času z sondou CC16S so prikazani v preglednici 15.

Preglednica 15: Občutljivosti PCR v realnem času s sondou CC16S za določanje bakterij rodu *Alicyclobacillus*

Oznaka vzorca	N_0 (cfu/ml)	Ct ($n=2$) \pm SD	R^2	Naklon / E
1	$5,15 \times 10^5$	$24,30 \pm 0,30$	0,93	-4,66 / 1,64
2	$5,15 \times 10^4$	$29,63 \pm 0,05$		
3	$5,15 \times 10^3$	$36,21 \pm 0,68$		
4	$5,15 \times 10^2$	$36,34 \pm 1,83$		
5	$5,15 \times 10^1$	nezaznavno		
6	$5,15 \times 10^0$	nezaznavno		
7	$5,15 \times 10^{-1}$	nezaznavno		
8	$5,15 \times 10^{-2}$	nezaznavno		
NTC	0	nezaznavno	/	/

Legenda: Ct - poprečna vrednost n paralelk, n - število paralek, SD - standardna deviacija, NTC - negativna kontrola, R^2 - koreacijski koeficient standardne krivulje, E - učinkovitost reakcije

Pri vzorcih 1, 2, 3 in 4 so bili rezultati PCR pozitivni, medtem ko so bili rezultati pri vzorci z oznako 5, 6, 7 in 8 negativni, kjer je bila koncentracija celic enaka ali manjša od $5,15 \times 10^1$ cfu/ml. Občutljivost PCR v realnem času s sondou za določanje bakterij vrste *A. acidoterrestris* je bila $5,15 \times 10^2$ cfu/ml.

Da bi povečali občutljivost PCR v realnem času za določanje bakterij rodu *Alicyclobacillus* s sondou CC16S smo spremenili nekatere razmere v encimski reakciji. V fazi denaturacije DNA smo spremenili čas reakcije s tem, da smo ga podvojili. Nato smo v fazi prileganja oligonukleotidnih začetnikov in oligonukleotidne sonde na DNA ter fazi podaljševanja skrajšali čas reakcije iz 1 min na 45 s ter zmanjšali temperaturo iz 60 °C na 55 °C (Connor in sod., 2005). DNA smo pripravili s topotno lizo. V reakcijsko mešanico smo dodali 900 nM oligonukleotidnih začetnikov in 200 nM sonde. Rezultati določanja občutljivosti PCR v realnem času s sondou CC16S s spremenjenimi razmerami PCR so prikazani v preglednici 16.

Preglednica 16: Občutljivost PCR v realnem času s sondom CC16S za določanje bakterij rodu *Alicyclobacillus* s spremenjenimi temperaturno-časovnim programom encimske reakcije

Oznaka vzorca	N_0 (cfu/ml)	Ct ($n=2$) \pm SD	R^2	Naklon / E
1	$1,9 \times 10^6$	$18,80 \pm 0,17$	0,97	$-4,25 / 1,71$
2	$1,9 \times 10^5$	$23,66 \pm 0,03$		
3	$1,9 \times 10^4$	$30,42 \pm 0,51$		
4	$1,9 \times 10^3$	$33,21 \pm 0,03$		
5	$1,9 \times 10^2$	$36,42 \pm 1,34$		
6	$1,9 \times 10^1$	$39,80 \pm 0,18$		
7	$1,9 \times 10^0$	nezaznavno		
8	$1,9 \times 10^{-1}$	nezaznavno		
NTC	0	nezaznavno	/	/

Legenda: Ct - poprečna vrednost n paralelk, n - število paralek, SD - standardna deviacija, NTC - negativna kontrola, R^2 - koreacijski koeficient standardne krivulje, E - učinkovitost reakcije,

Vsi rezultati PCR v realnem času so bili pozitivni, razen pri vzorcih z oznako 7 in 8, kjer nismo zaznali pomnožka, ker je bila koncentracija celic enaka ali manjša od $1,9 \times 10^0$ cfu/ml. Občutljivost PCR v realnem času s sondom CC16S za določanje bakterij rodu *Alicyclobacillus* s spremenjenim temperaturno-časovnim programom encimske reakcije za določanje bakterij vrste *A. acidoterrestris* je bila $1,9 \times 10^1$ cfu/ml.

Glede na dobljene rezultate (preglednice 14, 15 in 16) smo ugotovili, da smo s spremembami razmer pomnoževanja izboljšali občutljivost PCR v realnem času s sondom. Učinkovitost encimske reakcije sicer ni bila idealna, vendar še vedno zadovoljiva saj je bila DNA pripravljena s topotno lizo. Zato smo v nadaljnjih eksperimentih uporabljali oligonukleotidno sondu in spremenjene časovno-temperaturne parametre.

Pri določanju bakterij rodu *Alicyclobacillus* z PCR v realnem času je bila občutljivost $5,15 \times 10^2$ cfu/ml (preglednica 15). Da bi izboljšali občutljivost metode smo povečali koncentracijo oligonukleotidnih začetnikov in sonde ter spremenili temperaturno-časovni program encimske reakcije kot navajajo Connor in sod. (2005). Ugotovili smo, da so tako spremenjene koncentracije kot tudi spremenjen program encimske reakcije primerni za določanje bakterij rodu *Alicyclobacillus*, saj smo izboljšali občutljivost na $1,9 \times 10^1$ cfu/ml.

Tako dobljena občutljivost PCR v realnem času je primerljiva z literaturnimi podatki. Luo in sod. (2004) so razvili PCR v realnem času z sondom *Taq-Man* za gen *shc*, ki je značilen za bakterije rodu *Alicyclobacillus*, za določanje bakterij vrst *A. acidoterrestris* in *A. acidocaldarius* z občutljivostjo <100 cfu/ml. Podobno so tudi Connor in sod. (2005) razvili PCR v realnem času s sodno *Taq-Man* za določanje vseh bakterij rodu *Alicyclobacillus* z enako občutljivostjo (<100 cfu/ml).

4.2.3 Specifičnost PCR v realnem času s sondom CC16S za določanje bakterij rodu *Alicyclobacillus*

Specifičnost PCR v realnem času s sondom CC16S smo določili tako, da smo izvedli PCR v realnem času s 3 sevi bakterij rodu *Alicyclobacillus* in 9 sevi sorodnih bakterij rodov *Bacillus*, *Listeria* in *Staphylococcus*. DNA je bila pripravljena z toplotno lizo, v reakcijsko mešanico za PCR smo dodali 150 nM sonde CC16S in 600 nM oligonukleotidnih začetnikov CC16S-F/CC16S-R. Rezultati določanja specifičnosti sonde CC16S za določanje bakterij rodu *Alicyclobacillus* so prikazani v preglednici 17.

Imeli smo 3 pozitivne rezultate in sicer bakterije rodu *Alicyclobacillus*, pri sorodnih bakterijah rodov *Bacillus*, *Listeria* in *Staphylococcus* so bili rezultati negativni. Specifičnost PCR v realnem času s sondom CC16S za bakterije rodu *Alicyclobacillus* je bila 100 %.

Preglednica 17: Specifičnost sonde CC16S za določanje PCR v realnem času za bakterije rodu *Alicyclobacillus*

Sev	N ₀ (cfu/ml)	Ct (n=2)
<i>A. acidiphilus</i> ŽMJ185	1,7 x 10 ³	34,46
<i>A. acidocaldarius</i> ŽMJ183	4,15 x 10 ³	33,42
<i>A. acidoterrestris</i> ŽMJ184	1,2 x 10 ⁴	39,75
<i>B. cereus</i> ŽMJ91	10 ⁶ *	nezaznavno
<i>B. cereus</i> ŽMJ164	10 ⁶ *	nezaznavno
<i>B. cereus</i> ŽMJ165	10 ⁶ *	nezaznavno
<i>B. cereus</i> ŽMJ166	10 ⁶ *	nezaznavno
<i>B. subtilis</i> ŽMJ97	10 ⁶ *	nezaznavno
<i>B. coagulans</i> ŽMJ98	10 ⁶ *	nezaznavno
<i>B. stearothermophilus</i> ZIM102	10 ⁷ *	nezaznavno
<i>L. monocytogenes</i> ŽM58	10 ⁸ *	nezaznavno
<i>S. aureus</i> ŽM506	10 ⁸ *	nezaznavno
NTC	0	nezaznavno

Legenda: Ct - poprečna vrednost n paralelk, n - število paralek, NTC - negativna kontrola, * - ocena

Rezultati našega določanja specifičnosti PCR v realnem času z oligonukleotidno sondom CC16S so primerljivi z že objavljenimi rezultati. Connor in sod. (2005) so pri določanju specifičnosti oligonukleotidne sonde CC16S dobili pozitivne rezultate pri bakterijah vrst *A. acidocaldarius*, *A. acidoterrestris*, *A. cycloheptanicus* ter sorodne bakterije vrste *Geobacillus stearothermophilus*.

4.2.4 Določanje bakterij rodu *Alicyclobacillus* s PCR v realnem času v umetno kontaminirani vodi z okusom

Vodo z okusom smo kontaminirali tako, da smo ji dodali 1 ml suspenzije bakterij vrste *A. acidoterrestris*. Uporabili smo oligonukleotidne začetnike CC16S-F/CC16S-R (900 nM) in sondi CC16S (200 nM). Program PCR je potekal po spremenjenih razmerah. DNA smo pripravili z topotno lizo. Rezultati določanja bakterij vrste *A. acidoterrestris* s PCR v realnem času v umetno kontaminirani vodi o okusom so prikazani v preglednici 18.

Preglednica 18: Določanje bakterij rodu *Alicyclobacillus* s PCR v realnem času v umetno kontaminirani vodi z okusom

Oznaka vzorca	N ₀ (cfu/ml)	Ct (n=4)
1	1,5 x 10 ²	34,65
2	1,5 x 10 ¹	nezaznavno
NTC	0	nezaznavno

Legenda: Ct - poprečna vrednost n paralelk, n - število paralek, NTC - negativna kontrola

Pri vzorcu 1 je bil rezultat pozitiven, medtem ko je bil pri vzorcu 2 negativen, kjer je bila koncentracija celic 1,5 x 10¹ cfu/ml. Občutljivost določanja bakterij rodu *Alicyclobacillus* s PCR v realnem času v umetno kontaminirani vodi z okusom je bila 1,5 x 10² cfu/ml.

Občutljivost PCR v realnem času za določanje bakterij rodu *Alicyclobacillus* v vodi z okusom (1,5 x 10² cfu/ml) je bila slabša kot občutljivost bakterij rodu *Alicyclobacillus* v pitni vodi (1, 08 x 10¹ cfu/ml), ki je bila določena z nespecifično metodo določanja pomnožkov. Ravno tako je bila občutljivost PCR v realnem času za določanje bakterij rodu *Alicyclobacillus* v vodi z okusom slabša kot praktična občutljivost PCR v realnem času za določanje bakterij rodu *Alicyclobacillus* (1,9 x 10¹ cfu/ml), ki je bila določena z specifično metodo določanja pomnožkov.

Občutljivosti PCR realnem času za določanje bakterij rodu *Alicyclobacillus* v pitni vodi oz. vodi z okusom smo določali v 100 ml vzorca. Razlog za slabšo občutljivost PCR v realnem času za določanje bakterij rodu *Alicyclobacillus* v vodi z okusom je lahko v sestavi pijače, ki ima lahko inhibitorni učinek na encimsko reakcijo.

4.2.5 Določanje bakterij rodu *Alicyclobacillus* s PCR v realnem času v umetno kontaminiranem jabolčnem soku

Jabolčni sok smo kontaminirali tako, da smo ji dodali 1 ml suspenzije bakterij vrste *A. acidoterrestris*. Uporabili smo oligonukleotidne začetnike CC16S-F/CC16S-R (900 nM) in sondi CC16S (200 nM). Program PCR je potekal po spremenjenih razmerah. DNA smo pripravili z topotno lizo. Rezultati določanja bakterij rodu *Alicyclobacillus* s PCR v realnem času v umetno kontaminiranem jabolčnem soku so prikazani v preglednici 19.

Preglednica 19: Določanje bakterij rodu *Alicyclobacillus* s PCR v realnem času v umetno kontaminiranem jabolčnem soku

Oznaka vzorca	N ₀ (cfu/ml)	Ct (n=4)
1	1,47 x 10 ³	36,78
2	1,47 x 10 ²	nezaznavno
3	1,47 x 10 ¹	nezaznavno
NTC	0	nezaznavno

Legenda: Ct - poprečna vrednost n paralek, n - število paralek, NTC - negativna kontrola

Pri PCR v realnem času za določanje bakterij rodu *Alicyclobacillus* v umetno kontaminiranem jabolčnem soku so bili rezultati negativni, razen pri vzorcu z oznako 1, kjer je bil rezultati pozitiven. Občutljivost določanja bakterij rodu *Alicyclobacillus* z PCR v realnem času v umetno kontaminiranem jabolčnem soku je 1,47 x 10³ cfu/ml.

Občutljivost PCR v realnem času za določanje bakterij rodu *Alicyclobacillus* v jabolčnem soku (1,47 x 10³ cfu/ml) je bila slabša tako od občutljivosti PCR v realnem času za določanje bakterij rodu *Alicyclobacillus* v vodi z okusom (1,5 x 10² cfu/ml) kot tudi od praktične občutljivosti PCR v realnem času za določanje bakterij rodu *Alicyclobacillus* (1,9 x 10¹ cfu/ml). Do slabše občutljivost PCR v realnem času za določanje bakterij rodu *Alicyclobacillus* je lahko v sestavi jabolčnega soka, ki ima lahko inhibitorni učinek na encimsko reakcijo.

Tako dobljena občutljivost PCR v realnem času je slabše primerljiva z literaturnimi podatki. Luo in sod. (2004) so določili občutljivost PCR v realnem času z oligonukleotidno sondjo 5'-TCRGARGACGTCACCGC-3' za določanje bakterij rodu *Alicyclobacillus* <1 x 10¹ cfu/ml v 1 ml jabolčnega soka. Podobno so Connor in sod. (2005) določili občutljivost PCR v realnem času z oligonukleotidno sondjo CC16S za določanje bakterij rodu *Alicyclobacillus* <100 cfu/ml pomarančnega soka. Z nespecifično metodo določanja pomnožkov so Steyn in sod. (2011b) določili občutljivost PCR v realnem času z oligonukleotidnimi začetniki CC16S-F/CC16S-R za določanje bakterij rodu *Alicyclobacillus* med 1 in 1,4 x 10² cfu/ml v jabolčnem soku.

4.3 MOLEKULARNA IDENTIFIKACIJA ŽIVILSKIH IZOLATOV RODU *Alicyclobacillus* S PCR V REALNEM ĖASU

Molekularna identifikacija živilskih izolatov rodu *Alicyclobacillus* je potekala tako, da smo izvedli PCR v realnem času za določanje bakterij rodu *Alicyclobacillus* in kot tarčno DNA dodali DNA, ki smo jo pripravili s topotno lizo iz sevov izoliranih iz živil. Uporabili smo oligonukleotidne začetnike CC16S-F/CC16S-R (900 nM) in sondu CC16S (200 nM). Za pozitivno kontrolo smo vzeli vrsto *Alicyclobacillus acidoterrestris* ŽMJ184. Rezultati so prikazani v preglednici 20.

V preglednici 20 so vsi dobljeni rezultati PCR v realnem času pozitivni. Ugotovili smo, da vsi izolati izolirani iz živil pripadajo rodu *Alicyclobacillus*. Gouws in sod. (2005) so za identifikacijo kolonij na gojišču PDA (angl. Potato Dextrose Agar) uporabili metodo PCR z oligonukleotidnimi začetniki F1/R1. Izolate so izolirali iz koncentriranega mangovega soka in gazirane mešanice sokov in s PCR metodo potrdili, da gre za bakterije vrste *A. acidocaldarius*. Podobno so Durak in sod. (2010) za identifikacijo 141 izolatov iz različnih sadnih pijsač uporabili PCR metodo z oligonukleotidnimi začetniki 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' in 5'-GGTATCTAACCTGTTGC-3'. Izolate, ki so so jih izolirali iz jabolčnega soka, soka citrusov, sadnega koncentrata, procesne vode ter zemlje iz sadovnjaka citrusov, so identificirali kot bakterije vrste *A. acidoterrestris* (64), *A. acidocaldarius* (16), *A. acidocaldarius* subsp. *acidocaldarius* (43), *A. fastidiosus* (9), *A. sacchari* (5), *A. tengchongensis* (1), *A. hesperidum* (2), *A. acidiphilus* (1).

Preglednica 20: Molekularna identifikacija živilskih izolatov rodu *Alicyclobacillus* s PCR v realnem času

Sev	N ₀ (cfu/ml)	Ct (n=2)
<i>A. acidoterrestris</i> ŽMJ184	1,0 x 10 ²	30,61
<i>A. acidiphilus</i> ŽMJ209	2,4 x 10 ³	30,62
<i>A. acidocaldarius</i> ŽMJ187	10 ² *	34,81
<i>A. acidoterrestris</i> ŽMJ189	4,5 x 10 ²	30,22
<i>A. cycloheptanicus</i> ŽMJ199	3,0 x 10 ²	31,70
<i>A. hesperidum</i> ŽMJ193	3,3 x 10 ³	32,79
<i>A. hesperidum</i> ŽMJ202	3,7 x 10 ³	32,94
<i>A. mali</i> ŽMJ207	4,6 x 10 ³	30,64
<i>A. sendaiensis</i> ŽMJ191	10 ² *	34,67
<i>A. vulcanalis</i> ŽMJ186	10 ² *	29,48
NTC	/	nezaznavno

Legenda: Ct - poprečna vrednost n paralelk, n - število paralelk, NTC - negativna kontrola, * - ocena

5 SKLEPI

S postavitevijo protokola in uvedbo PCR v realnem času za določanje bakterij rodu *Alicyclobacillus* smo:

- ugotovili, da je par oligonukleotidnih začetnikov CC16S-F/CC16S-R (Connor in sod., 2005) z nespecifično metodo določanja pomnožkov neprimeren za določanje bakterij rodu *Alicyclobacillus* s PCR v realnem času zaradi slabe specifičnosti,
- ugotovili, da so oligonukleotidni začetniki CC16S-F/CC16S-R in oligonukleotidna sonda CC16S primerni za določanje bakterij rodu *Alicyclobacillus* s PCR v realnem času,
- ugotovili, da smo s spremembjo programa encimske reakcije in s spremembjo koncentracij oligonukleotidnih začetnikov CC16S-F/CC16S-R in oligonukleotidne sonde CC16S izboljšali občutljivost določanje bakterij rodu *Alicyclobacillus* s PCR v realnem času na 190 cfu/ml,
- ugotovili, da je specifičnost PCR v realnem času s sondijo CC16S za bakterije rodu *Alicyclobacillus* 100 %,
- določili bakterije rodu *Alicyclobacillus* s PCR v realnem času s oligonukleotidnimi začetniki CC16S-F/CC16S-R in s oligonukleotidno sondijo CC16S v vodi z okusom z občutljivostjo $1,5 \times 10^2$ cfu/ml in v jabolčnem soku z občutljivostjo $1,47 \times 10^3$ cfu/ml.

6 POVZETEK

Bakterije rodu *Alicyclobacillus* so termo-acidofilne, grampozitivne, aerobne in sporogene bakterije. Najdemo jih v zemlji in vodi, kar sta tudi glavna vira kontaminacije z bakterijami rodu *Alicyclobacillus* v proizvodnji sadnih sokov in sadnih koncentratov. So vse pogostejši kvarljivci sadnih in zelenjavnih sokov, saj njihove spore preživijo temperature pasterizacije ter so sposobne rasti v nizkem območju vrednosti pH (2,5-6). Za človeka niso patogene, vendar povzročajo veliko škodo proizvajalcem sadnih sokov in sadnih koncentratov, zaradi tvorbe gvajakola, ki ima neprijetno aroma, zato izdelki niso sprejemljivi za porabnika (Smit in sod., 2011).

Klasične mikrobiološke metode za določanje bakterij rodu *Alicyclobacillus* dolgotrajne in neprimerne za analizo velikega števila vzorcev, saj so rezultati znani šele v 3-7 dneh. Poleg tega za zahtevajo veliko dela, veliko materiala ter veliko časa, zahtevajo tudi morfološko in biokemično identifikacijo. PCR v realnem času je metoda, ki je bolj občutljiva, specifična in predvsem hitra metoda, za določanje različnih bakterij (Steyn in sod., 2011c).

Namen našega dela je postaviti protokol za PCR v realnem času za določanje bakterij rodu *Alicyclobacillus*. Cilji te naloge so bili skrajšati in poenostaviti postopek določanja omenjenih bakterij, povečati specifičnost in občutljivost določanja omenjenih bakterij.

Z nespecifično metodo določanja pomnožkov smo določili občutljivost oligonukleotidnih začetnikov CC16S-F/CC16S-R (Connor in sod., 2005) s PCR v realnem času za določanje bakterij rodu *Alicyclobacillus*, ki je znašala 4,6 cfu/ml. Z enako metodo in enakimi oligonukleotidnimi začetniki smo določali tudi občutljivost PCR v realnem času v 100 ml umetno kontaminirane pitne vode, ki je znašal $1,08 \times 10^1$ cfu/ml. Zaradi slabe specifičnosti smo ugotovili, da je par oligonukleotidnih začetnikov CC16S-F/CC16S-R (Connor in sod., 2005) z nespecifično metodo določanja pomnožkov neprimeren za določanje bakterij rodu *Alicyclobacillus* s PCR v realnem času.

Nato smo z specifično metodo določanja pomnožkov določili 100% specifičnost oligonukleotidnih začetnikov CC16S-F/CC16S-R in oligonukleotidne sonde CC16S (Connor in sod., 2005) in s tem ugotovili, da je oligonukleotidna sonda CC16S primerna za določanje bakterij rodu *Alicyclobacillus* z PCR v realnem času.

Ugotovili smo, da s spremembou temperaturno-časovnega programa encimske reakcije in s spremembou koncentracije oligonukleotidnih začetnikov CC16S-F/CC16S-R (900 nM) in oligonukleotidne sonde CC16S (200 nM) izboljšamo občutljivost določanja bakterij rodu *Alicyclobacillus* s PCR v realnem času iz $5,15 \times 10^2$ cfu/ml na $1,9 \times 10^1$ cfu/ml.

Bakterije rodu *Alicyclobacillus* smo določali tudi v jabolčnem soku in vodi z okusom. Z spremembjo programa encimske reakcije in z spremembjo koncentracije oligonukleotidnih začetnikov CC16S-F/CC16S-R (900 nM) in oligonukleotidne sonde CC16S (200 nM) smo določili bakterije v vodi z okusom z občutljivostjo $1,5 \times 10^2$ cfu/ml in v jabolčnem soku z občutljivostjo $1,47 \times 10^3$ cfu/ml.

Uvedba PCR v realnem času je v primerjavi s klasičnim PCR bolj občutljiva metoda in specifična, hkrati pa tudi skrajša in poenostavi postopek določanja bakterij rodu *Alicyclobacillus*.

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 São Miguel in the Azores. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 50: 451-457

Alpas H., Alma L., Bozoglu F. 2003. Inactivation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* vegetative cells in model system, apple, orange and tomato juicec by high hydrostatic pressure. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 19: 619-623

Álvarez-Rodríguez M. L., Belloch C., Villa M., Uruburu F., Larriba G., Coque J. J. R. 2003. Degradation of vanillic acid and production of guaiacol by microorganisms isolated from cork samples. FEMS Microbiology Letters, 220: 49-55

Applied Biosystems. 2005. Real-time PCR systems: Applied Biosystems 7900HT fast real-time PCR system and 7300/7500 real-time PCR systems: Chemistry guide. Foster City, Applied Biosystems: 2-1 – 2-8

http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_marketing/documents/generaldocuments/cms_041440.pdf (9. jun. 2011)

Arya M., Shergill I. S., Williamson M., Gommersall L., Arya N., Patel H. R. H. 2005. Basic principles of real-time quantitative PCR. Expert Review of Molecular Diagnostics, 5: 209-219

Bahçeci K. S., Acar J. 2007. Modeling the combined effects of pH, temperature and ascorbic acid concentration on the heat resistance of *Alicyclobacillus acidoterrestris*. International Journal of Food Microbiology, 120: 266-273

Baumgart J., Husemann M., Schmid C. 1997. *Alicyclobacillus acidoterrestris*: Vorkommen, Bedeutung und Nachweis in Getränken und Getränkegrundstoffen. Flüssiges Obst, 64: 178-180

Bianchi A., Careri M., Mangia A., Mattarozzi M., Musci M., Concina I., Gobbi E. 2010. Characterisation of the volatile profile of orange juice contaminated with *Alicyclobacillus acidoterrestris*. Food Chemistry, 123: 653-658

Borlinghaus A., Engel R. 1997. *Alicyclobacillus* incidence in commercial apple juice concentrate (AJC) supplies-method development and validation. Fruit Processing, 7: 262-266

Cerny G., Duong H. A., Hennlich W., Miller S. 2000. *Alicyclobacillus acidoterrestris*: influence of oxygen content on growth in fruit juices. Food Australia, 52: 289-291

Cerny G., Hennlich W., Poralla K. 1984. Fruchtsaftverderb durch Bacillen: Isolierung und Charakterisierung des Verderbsregers. Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung, 179: 224-227

Chang S. S., Kang D. H. 2004. *Alicyclobacillus spp.* in the fruit juice industry: History, characteristics, and current isolation/detection procedures. Critical Reviews in Microbiology, 30: 55-74

Chen S., Tang Q., Zhang X., Zhao G., Hu X., Liao X., Chen F., Wu J., Xiang H. 2006. Isolation and characterization of thermo-acidophilic endospore-forming bacteria from the concentrated apple juice-processing environment. Food Microbiology, 23: 439-445

Clark D. 2005. Molecular biology. Amsterdam, Elsevier Science: 634-660

Connor C. J., Luo H., McSpadden G. B. B., Wang H. H. 2005. Development of a real-time PCR-based system targeting the 16S rRNA gene sequence for rapid detection of *Alicyclobacillus spp.* in juice products. International Journal of Food Microbiology, 99: 229-235

Darland G., Brock T. D. 1971. *Bacillus acidocaldarius* sp. nov., an acidophilic thermophilic spore-forming bacterium. Journal of General Microbiology, 67: 9-15

De Carvalho A. A. T., Vanetti M. C. D., Mantovani H. C. 2008. Bovicin HC5 reduces thermal resistance of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in acidic mango pulp. Journal of Applied Microbiology, 104: 1685-1691

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 cycloheptanicus* sp. nov., a new thermoacidophile containing ω -cycloheptane fatty acids. Systematic and Applied Microbiology, 10: 68-73

De Rosa M., Gambacorta A., Minale L., Bu'Lock J. D. 1971. Cyclohexane fatty acids from a thermophilic bacterium. Chemical Communications, 21: 1334a-1334a

Dufresne S., Bousquet J., Boissinot M., Guay R. 1996. *Sulfobacillus disulfidooxidans* sp. nov., a new acidophilic, disulfide-oxidizing, gram-positive, spore-forming bacterium. International Journal of Systematic Bacteriology, 46: 1056-1064

Duong H. A., Jensen N. 2000. Spoilage of iced tea by *Alicyclobacillus*. Food Australia, 52: 292-292

Durak M. Z., Churey J. J., Danyluk M. D., Worobo R. W. 2010. Identification and haplotype distribution of *Alicyclobacillus* spp. from different juices and beverages. International Journal of Food Microbiology, 142: 286-291

Flamm R. K., Hinricks D. J., Thomashow M. F. 1984. Introduction of pAMb1 into *Listeria monocytogenes* by conjugation and homology between *L. monocytogenes* plasmids. Infection and Immunity, 44: 157-161

Gobbi E., Falasconi M., Concina I., Mantero G., Bianchi F., Mattarozzi M., Musci M., Sberveglieri G. 2010. Electronic nose and *Alicyclobacillus* spp. spoilage of fruit juices: An emerging diagnostic tool. Food Control, 21: 1374-1382

Gocmen D., Elston A., Williams T., Parish M., Rouseff R. L. 2005. Identification of medicinal off-flavours generated by *Alicyclobacillus* species in orange juice using GC-olfactometry and GC-MS. Letters in Applied Microbiology, 40: 172-177

Goto K., Matsubara H., Mochida K., Matsumura T., Hara Y., Niwa M., Yamasato K. 2002a. *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., Tanimoto Y., Tamura T., Mochida K., Arai D., Asahara M., Suzuki M., Tanaka H., Inagaki K. 2002b. Identification of thermoacidophilic bacteria and a new *Alicyclobacillus* genomic species isolated from acidic environments in Japan. Extremophiles, 6: 333-340

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 materials, and

emended description of *Alicyclobacillus acidocaldarius*. Microbiology and Culture Collections, 22: 1-14.

Goto K., Mochida K., Kato Y., Asahara M., Fujita R., An S. Y., Kasai H., Yokota A. 2007a. Proposal of six species of moderately thermophilic, acidophilic, endospore-forming bacteria: *Alicyclobacillus contaminans* sp. nov., *Alicyclobacillus fastidiosus* sp. nov., *Alicyclobacillus kakegawensis* sp. nov., *Alicyclobacillus macrosporangioides* sp. nov., *Alicyclobacillus sacchari* sp. nov. and *Alicyclobacillus shizuokensis* sp. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 57: 1276-1285

Goto K., Tanaka T., Yamamoto R., Tokudo H. 2007b. Characteristics of *Alicyclobacillus*. V: *Alicyclobacillus*: Thermophilic acidophilic bacilli. Yokota A., Fujii T., Goto K. (eds.). Tokyo, Springer: 9-48

Goto K., Nishibori A., Wasada Y., Furuhata K., Fukuyama M., Hara M. 2008. Identification of thermo-acidophilic bacteria isolated from the soil of several Japanese fruit orchards. Letters in Applied Microbiology, 46: 289-294

Gouws P. A., Gie L., Pretorius A., Dhansay N. 2005. Isolation and identification of *Alicyclobacillus acidocaldarius* by 16S rDNA from mango juice and concentrate. International Journal of Food Science and Technology, 40: 789-792

Groenewald W. H., Gouws P. A., Witthuhn R. C. 2008. Isolation and identification of species of *Alicyclobacillus* from orchard soil in the Western Cape, South Africa. Extremophiles, 12: 159-163

Groenewald W. H., Gouws P. A., Witthuhn R. C. 2009. Isolation, identification and typification of *Alicyclobacillus acidoterrestris* and *Alicyclobacillus acidocaldarius* strains from orchard soil and the fruit processing environment in South Africa. Food Microbiology, 26: 71-76

Guo X., You X. Y., Liu L. J., Zhang J. Y., Liu S. J., Jiang C. Y. 2009. *Alicyclobacillus aeris* sp. nov., a novel ferrous- and sulfur-oxidizing bacterium isolated from a copper mine. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 59: 2415-2420

Hippchen B., Röll A., Poralla K. 1981. Occurrence in soil of thermo-acidophilic bacilli possessing ω -cyclohexane fatty acids and hopanoids. Archives of Microbiology, 129: 53-55

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

Jensen N. 2000. *Alicyclobacillus* in Australia. Food Australia, 52: 282-285

Jensen N., Varelis P., Whitfield F. B. 2001. Formation of guaiacol in chocolate milk by the psychrotrophic bacterium *Rahnella aquatilis*. Letters in Applied Microbiology, 33: 339-343

Jensen N., Whitfield F. B. 2003. Role of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in the development of a disinfectant taint in shelf-stable fruit juice. Letters in Applied Microbiology, 36: 9-14

Jeršek B. 2009. Higiena živil: laboratorijske vaje za študente živilstva in prehrane. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 79 str.

Jiang C. Y., Liu Y., Liu Y. Y., You X. Y., Guo X., Liu S. J. 2008. *Alicyclobacillus ferrooxydans* sp. nov., a ferrous-oxidizing bacterium from solfataric soil. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 58: 2898-2903

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 thermosulfidooxidans* subsp. *thermotolerans*' strain K1 as *Alicyclobacillus tolerans* sp. nov. and *Sulfobacillus disulfidooxidans* Dufresne 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

Klančnik A., Smole Možina S., Jeršek B. 2003. Vpliv priprave DNA na občutljivost odkrivanja bakterij *Listeria monocytogenes* s PCR. Zbornik Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani. Kmetijstvo, 81-1: 65-73

Komitopoulou E., Boziaris I. S., Davies E. A., Delves-Broughton J., Adams M. R. 1999. *Alicyclobacillus acidoterrestris* in fruit juices and its control by nisin. International Journal of Food Science and Technology, 34: 81-85

Kusano K., Niwa M., Yamasato H. 1997. Kaju yori bunnri sareta tainetsusei kousanseikin no bunriu. Nihon-Seiryoinryo-Kenkyukai, Dai-6-kai Kenkyu Hapyokai. Cit po: Goto K., Tanaka T., Yamamoto R., Tokudo H. 2007b. Characteristics of *Alicyclobacillus*. V: *Alicyclobacillus*: Thermophilic acidophilic bacilli. Yokota A., Fujii T., Goto K. (eds.). Tokyo, Springer: 9-48

Lee S. Y., Gray P. M., Dougherty R. H., Kang D. H. 2004. The use of chlorine dioxide to control *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores in aqueous suspension and apples. International Journal of Food Microbiology, 92: 121-127

Lin M., Al-Holy M., Chang S. S., Huang Y., Cavinato A. G., Kang D. H., Rasco B. A. 2005. Rapid discrimination of *Alicyclobacillus* strains in apple juice by Fourier transform infrared spectroscopy. International Journal of Food Microbiology, 105: 369-376

Lottici C., Previdi M. P., Bolzoni L. 2006. Characterization and study of alicyclobacilli isolated from tomato products. Industria Conserve, 81: 251-267

Luo H., Yousef A. E., Wang H. H. 2004. A real-time polymerase chain reaction-based method for rapid and specific detection of spoilage *Alicyclobacillus* spp. in apple juice. Letters in Applied Microbiology, 39: 376-382

Mackay I. M. 2004. Real-time PCR in the microbiology laboratory. Clinical Microbiology and Infection, 10, 3: 190-212

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 Food Microbiology, 52: 1681-1685

Mavromatis K., Sikorski J., Lapidus A., Del Rio T. G., Copeland A., Tice H., Cheng J. F., Lucas S., Chen F., Nolan M., Bruce D., Goodwin L., Pitluck S., Ivanova N., Ovchinnikova G., Pati A., Chen A., Palaniappan K., Land M., Hauser L., Chang Y. J., Jeffries C. D., Chain P., Meincke L., Sims D., Chertkov O., Han C., Brettin T., Detter J. C., Wahrenburg C., Rohde M., Pukall R., Göker M., Bristow J., Eisen J. A., Markowitz V., Hugenholtz P., Klenk H. P., Kyprides N. C. 2010. Complete genome sequence of *Alicyclobacillus acidocaldarius* type strain (104-IA^T). Standards in Genomic Sciences, 2: 9-18

Mayer F., Czerny M., Grosch W. 1999. Influence of provenance and roast degree on the composition of potent odorants in Arabica coffees. European Food Research and Technology, 209: 242-250

McIntyre S., Ikawa J. Y., Parkinson N., Hanglund J., Lee J. 1995. Characteristics of an acidophilic *Bacillus* strain isolated from shelf-stable juice. Journal of Food Protection, 58: 319-321

McKnight I. C., Eiroa M. N. U., Sant'Ana A. S., Massaguer P. R. 2010. *Alicyclobacillus acidoterrestris* in pasteurized exotic Brazilian fruit juices: Isolation, genotypic characterization and heat resistance. Food Microbiology, 27: 1016-1022

Mohamed E. A. H., ElSersy N. A. 2009. Molecular Characterization of some novel marine *Alicyclobacillus* strains, capable of removing lead from a heavy metal contaminated sea spot. Biotechnology, 8,1: 100-106

Mottram D. S. 1998. Chemical tainting of foods. International Journal of Food Science and Technology, 33: 19-29

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., Harrison M. A., Beuchat L. R. 2007. Evaluation of direct plating methods to enumerate *Alicyclobacillus* in beverages. International Journal of Food Microbiology, 155: 59-69

Nicolaus B., Improta R., Manca M. C., Lama L., Esposito E., Gambacorta A. 1998. *Alicyclobacilli* from an unexplored geothermal soil in Antarctica: Mount Rittmann. Polar Biology, 19: 133-141

Oshima M., Ariga T. 1975. ω -Cyclohexyl fatty acids in acidophilic thermophilic bacteria. Journal of Biological Chemistry, 250: 6963-6968

Pettipher G. L., Osmundson M. E. 2000. Methods for the detection, enumeration and identification of *Alicyclobacillus acidoterrestris*. Food Australia, 52: 293-295

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 juice and fruit juice-containing drinks. Letters in Applied Microbiology, 24: 185-189

Pfaffl M. W. 2004. Quantification strategies in real-time PCR. V: An A-Z manual of quantitative PCR. Bustin S.A. (ed.). La Jolla, IUL Press: 87-112

Pöhlmann C., Wang Y., Humenik M., Heidenreich B., Gereis M., Sprinzl M. 2009. Rapid, specific and sensitive electrochemical detection of foodborne bacteria. Biosensors and Bioelectronics, 24: 2766-2771

Ponchel F. 2006. Real-time PCR using SYBR® Green. V: Real-time PCR. Dorak M. T. (ed.). Oxford, Taylor & Francis Ltd.: 139-154

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

Poralla K., König W. A. 1983. The occurrence of ω -cycloheptane fatty acids in a thermo-acidophilic bacillus. FEMS Microbiology Letters, 16: 303-306

Saunders N. A. 2004. An introduction to real-time PCR. V: Real-time PCR: an essential guide. Edwards K., Logan J., Saunders N. (eds.). London, Health Protection Agency: 1-12

Sawaki T. 2007. Historical background related to *Alicyclobacillus*. V: *Alicyclobacillus: Thermophilic acidophilic bacilli*. Yokota A., Fujii T., Goto K. (eds.). Tokyo, Springer: 6-8

Saxby M. J. 1996. A survey of chemicals causing taints and off-flavours in food. V: Food taints and off-flavours. 2nd ed. Saxby M. J. (ed.). Glasgow, Blackie Academic and Professional: 41-71

Siegmund B., Pöllinger-Zierler B. 2006. Odor threshold of microbially induced off-flavor compounds in apple-juice. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54: 5984-5989

Silva F. M., Gibbs P., Vieira M. C., Silva C. L. M. 1999. Thermal inactivation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores under different temperature, soluble solids and pH conditions for the design of fruit processes. International Journal of Food Microbiology, 51: 95-103

Silva V. F. M., Gibbs P. 2001. *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores in fruit products and design of pasteurization processes. Trends in Food Science & Technology, 12: 68-74

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. 1987. Off-flavour in wine caused by guaiacol. Food Technology in Australia, 38: 31-33

SIST EN ISO 4833: 2003. Mikrobiologija živil in krme - Horizontalna metoda za ugotavljanje števila mikroorganizmov - Tehnika štetja kolonij pri 30 °C. 2003: 20 str.

Smit Y., Cameron M., Venter P., Witthuhn R. C. 2011. *Alicyclobacillus* spoilage and isolation - A review. Food Microbiology, 28: 331-349

Splitstoesser 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

Splitstoesser D. F., Churey J. J. 1996. Unique spoilage organisms of musts and wines. V: Wine spoilage microbiology conference. Toland T., Fugelsang K. C. (eds.). Fresno, California State University: 36-41

Splitstoesser 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., Brittin G., Witthuhn R. C. 2011a. Contamination of pear concentrate by *Alicyclobacillus* from recirculating flume water during fruit concentrate production. World Journal of Microbiology and Biotechnology, doi 10.1007/s11274-011-0694-6: 6 str. (v tisku)

Steyn C. E., Cameron M., Brittin G., Witthuhn R. C. 2011b. Prevention of the accumulation of *Alicyclobacillus* in apple concentrate by restricting the continuous process running time. Journal of Applied Microbiology, 110: 658-665

Steyn C. E., Cameron M., Witthuhn R. C. 2011c. Occurrence of *Alicyclobacillus* in the fruit processing environment - A review. International Journal of Food Microbiology, 147: 1-11

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

Uchino F., Doi S. 1967. Acido-thermophilic bacteria from thermal waters. Agricultural and Biological Chemistry, 31: 817-822

Varlet V., Knockaert C., Prost C., Serot T. 2006. Comparison of odor-active volatile compounds of fresh and smoked salmon. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54: 3391-3401

Walls I., Chuyate R. 1998. *Alicyclobacillus* - historical perspective and preliminary characterization study. Dairy, Food and Environmental Sanitation, 18: 499-503

Walls I., Chuyate R. 2000. Spoilage of fruit juices by *Alicyclobacillus acidoterrestris*. Food Australia, 52: 286-288

Wasserman A. E. 1966. Organoleptic evaluation of three phenols present in wood smoke. Journal of Food Science, 31: 1005-1010

Whitfield F. B. 1998. Microbiology of food taints. International Journal of Food Science and Technology, 33: 31-51

Wisotzkey J. D., Jurtshuk JR. 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, 2: 263-269

Wisse C. A., Parish M. 1998. Isolation and enumeration of sporeforming thermo-acidophilic, rod-shaped bacteria from citrus processing environments. Daily, Food and Environmental Sanitation, 18: 504-509

Yamazaki K., Teduka H., Inoue N., Shinano H. 1996a. Specific primers for detection of *Alicyclobacillus acidoterrestris* by RT-PCR. Letters in Applied Microbiology, 23: 350-354

Yamazaki K., Teduka H., Shinano H. 1996b. Isolation and identification of *Alicyclobacillus acidoterrestris* from acidic beverages. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 60: 543-545

ZAHVALA

Mentorici doc. dr. Barbari Jeršek se iskreno zahvaljujem za vso pomoč in nasvete tako pri laboratorijskem delu kot tudi pri pisanju diplomske naloge ter za odlično mentorstvo.

Prof. dr. Nataši Poklar Ulrich se zahvaljujem za delo recenzenta.

Univ. dipl. živ. tehn. Tanji Rožman se zahvaljujem za pomoč in nasvete pri praktičnemu delu diplomske naloge v laboratoriju.

Univ. dipl. živ. tehn. Lini Burkan se zahvaljujem za pregled diplomske naloge, nasvete in pomoč pri iskanju literature.

Katji Černe iz fotokopirnice Reflect d.o.o. se zahvaljujem za vso pomoč tekom študija ter pri izdelavi diplomske naloge.

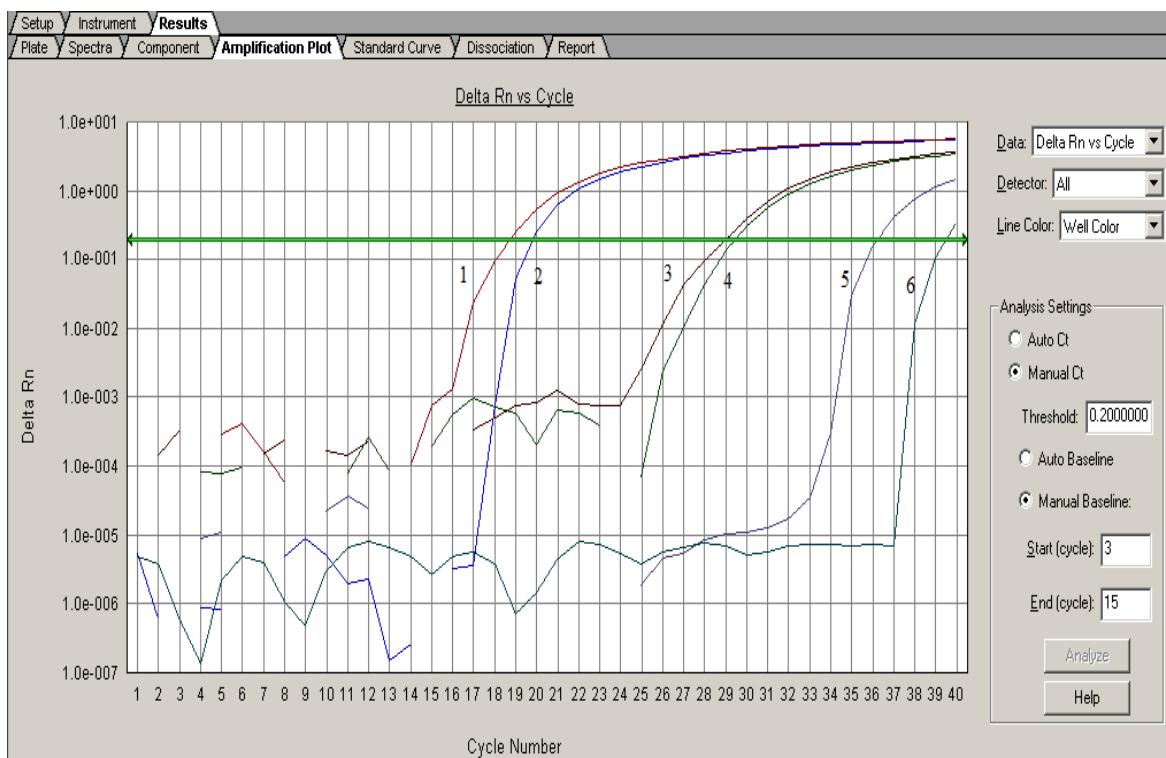
Zahvaljujem se tudi svojemu fantu Tomažu, staršem ter sestri Mojci z družino za vso pomoč, spodbudo in podporo skozi vsa leta študija.

Zahvaljujem se še prijateljicam Timei, Nataliji, Petri, Simoni in Kseniji za vso potrežljivost, razumevanje in spodbudo.

Hvala tudi vsem neimenovanim, ki ste mi stali ob strani.

PRILOGE

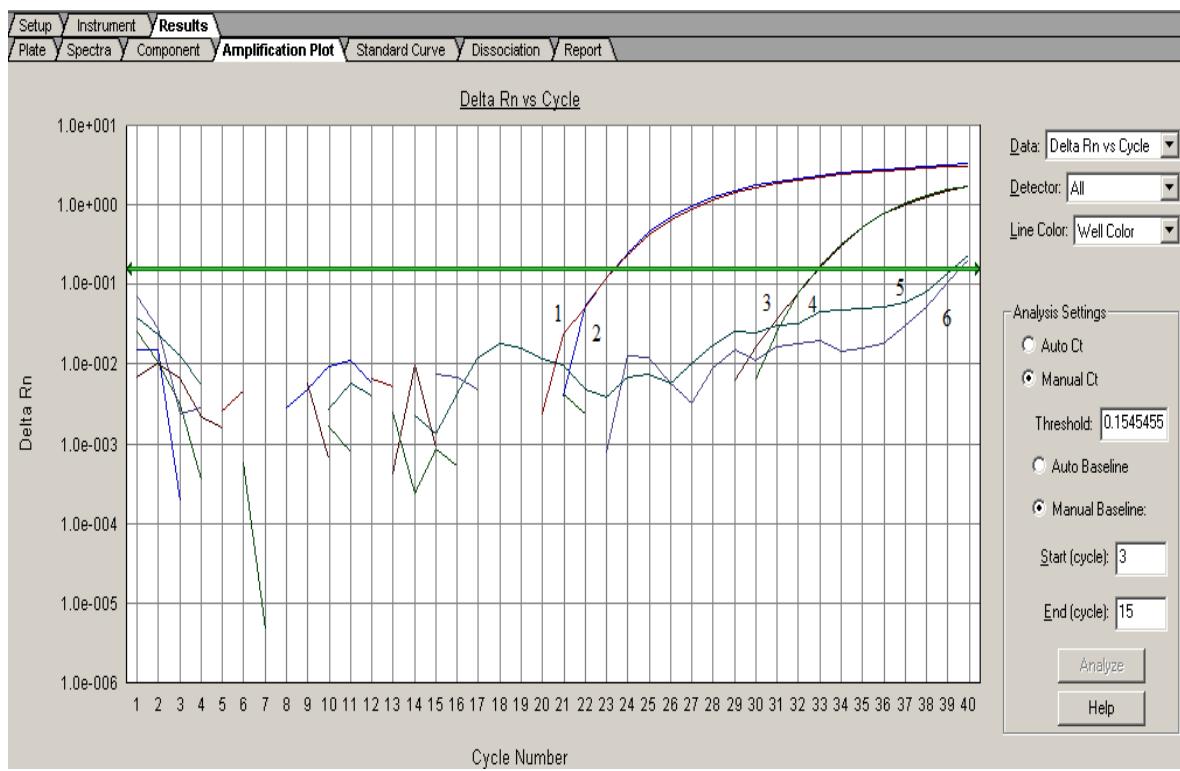
Priloga A: Občutljivost PCR v realnem času za določanje bakterij rodu *Alicyclobacillus* z oligonukleotidnimi začetniki CC16S-F/CC16S-R (600 nM)



Legenda:

- 1 in 2 - vzorec 2: *A. acidoterrestris* $4,6 \times 10^4$ cfu/ml
- 3 in 4 - vzorec 4: *A. acidoterrestris* $4,6 \times 10^2$ cfu/ml
- 5 in 6 - vzorec 6: *A. acidoterrestris* $4,6 \times 10^0$ cfu/ml

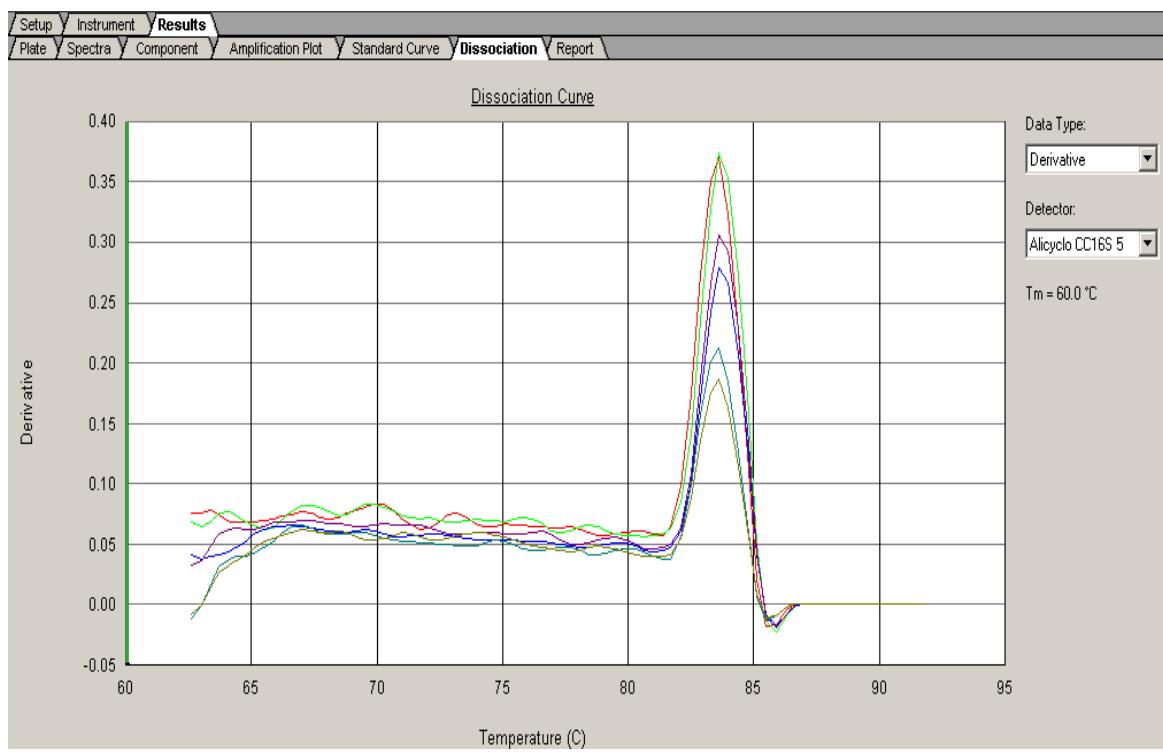
Priloga B: Občutljivost PCR v realnem času za določanje bakterij rodu *Alicyclobacillus* z oligonukleotidnimi začetniki CC16S-F/CC16S-R (900 nM) in s sondo CC16S (200 nM) ter s spremenjenimi temperaturno-časovnim programom encimske reakcije.



Legenda:

- 1 in 2 - vzorec 2: *A. acidoterrestris* $1,9 \times 10^5$ cfu/ml
- 3 in 4 - vzorec 4: *A. acidoterrestris* $1,9 \times 10^3$ cfu/ml
- 5 in 6 - vzorec 6: *A. acidoterrestris* $1,9 \times 10^1$ cfu/ml

Priloga C: Temperature taljenja pomnožkov dobljenih s PCR v realnem času za določanje bakterij rodu *Alicyclobacillus* z oligonukleotidnimi začetniki CC16S-F/CC16S-R (600 nM)



Legenda:

Rdeči in zeleni signal - vzorec 1: *A. acidoterrestris* $4,6 \times 10^5$ cfu/ml

Vijolični in modri signal - vzorec 3: *A. acidoterrestris* $4,6 \times 10^3$ cfu/ml

Turkizeni in zeleno rjav signal - vzorec 5: *A. acidoterrestris* $4,6 \times 10^1$ cfu/ml